

Міністерство освіти та науки України  
Запорізький національний університет

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**МАКСЄВА ЛЮДМИЛА ВАЛЕРІЇВНА**

УДК 611.771.018.1:612.112.9:616-001.4-003.93-092.9:599.323.4]:57.048

ДИСЕРТАЦІЯ

**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ  
КЛІТИН ШКІРИ ПРИ ЗАГОЄННІ РАН ЩУРІВ В УМОВАХ  
ХРОНІЧНОГО СОЦІАЛЬНОГО СТРЕСУ**

091 – Біологія, освітньо-наукова програма «Біологія»

09 Біологія

Подається на здобуття ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_Л.В. Макєєва

Наукові керівники:

**Фролов Олександр Кирилович**, доктор медичних наук, професор;

**Алієва Олена Геннадіївна**, кандидат біологічних наук, доцент

Запоріжжя – 2026

## АНОТАЦІЯ

Макєєва Л.В. **Морфофункціональні особливості імунокомпетентних клітин шкіри при загоєнні ран щурів в умовах хронічного соціального стресу.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія – Запорізький національний університет МОН України, Запоріжжя, 2026.

Хронічний стрес є фактором, що може призводити до порушення загоєння рани. Проте клітинні та молекулярні механізми, через які реалізується стрес-індукований вплив на загоєння ран шкіри, зокрема роль імунокомпетентних клітин та оксидативного стресу, залишаються недостатньо вивченими.

В експерименті на щурах лінії Wistar модель хронічного соціального стресу (ХСС) відтворювали шляхом соціальної ізоляції та психоемоційного впливу протягом 21 доби. Наявність стресу підтверджували тестом «відкрите поле», стан серотонінової системи імуноферментним визначенням концентрації білка-транспортера серотоніну (Slc6a4). Для оцінки перебігу ранового процесу (на 1, 3, 7, 14 і 30 дні загоєння ран) використовували морфометричні (площа ушкодженої ділянки), гістологічні (кількісна динаміка мастоцитів, макрофагів, лімфоцитів, нейтрофілів, еозинофілів) та імуногістохімічні методи дослідження крайової зони різаної рани шкіри щурів з використанням маркерів імунокомпетентних клітин (CD3, CD4, CD8, CD20, CD68) проліферації (Ki-67), васкуляризації (CD34), факторів регенерації (PDGFR $\beta$ , CGRP), апоптозу (Bcl-2, каспази 3, 9), ендогенної цитопротекції (SOX2, HIF-1 $\alpha$ ), антиоксидантного захисту та аутофагії (NRF2, LC3B, p62).

Результати виявили суттєву затримку репараційних процесів. Так, на 14-ту добу експерименту незагоєна площа дефекту у тварин, які зазнали впливу ХСС складала ще 53,3% порівняно з 17,5% у контрольній групі. На морфологічному рівні цьому передували затримка епітелізації, формування грануляційної тканини та зниження чисельності судин в 1,6 рази саме на піку фази проліферації (7 доба).

Окрему увагу в роботі приділено дослідженню кількісної динаміки імунікомпетентних клітин. Виявлено, що ще до нанесення рани ХСС провокував аномальну мобілізацію мастоцитів (їх кількість зростала вдесятеро, до 9,47 клітин/0,01 мм<sup>2</sup>) та еозинофілів як наслідок попереднього нейрогенного запалення шкіри. На всіх етапах загоєння ран фіксувався дефіцит макрофагів (CD68<sup>+</sup>), лімфоцитів (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>) та нейтрофілів.

Встановлено, що хронічний соціальний стрес суттєво порушує молекулярно-клітинні механізми репаративної регенерації шкіри. Імуногістохімічний аналіз показав зниження проліферативної та регенераторної активності клітин (зменшення експресії Ki-67, SOX2, PDGFR $\beta$ ) і порушення нейрогенної регуляції запалення (дисбаланс експресії CGRP). Одночасно відзначено посилення апоптозу (підвищення експресії каспази-3 на тлі зниження Bcl-2) та порушення аутофагічних і цитопротекторних механізмів (зниження HIF-1 $\alpha$ , NRF2, LC3B і підвищення p62). Отримані результати свідчать про пригнічення клітинної проліферації, посилення апоптотичних процесів і виснаження механізмів ендогенної цитопротекції, що призводить до уповільнення та порушення репаративної регенерації шкіри.

Робота доводить, що ХСС формує стійку патологічну систему імуні-нейро-ендокринних змін. Центральна ланка цієї системи — порушення переходу від стадії запалення до проліферації, яке реалізується через дисрегуляцію міграції та функції імунікомпетентних клітин на двох рівнях.

На системному рівні — стійкий дефіцит лімфоцитів, макрофагів і нейтрофілів у зоні рани протягом усього ранового процесу. На регіонарному рівні — стресорна гіперактивація мастоцитів з посиленою дегрануляцією та ініціацією нейрогенного запалення, яке частково стримується адитивним підвищенням інфільтрації еозинофілів.

Паралельно відбувається посилення та пролонгація апоптозу на тлі дефіциту антиапоптотичного захисту, пригнічення транскрипційної активності та зниження експресії факторів ендогенної цитопротекції. Сукупність цих механізмів унеможливорює повноцінну репаративну регенерацію та зумовлює

хронізацію загоєння різаної рани шкіри.

### **Наукова новизна отриманих результатів**

Розширено та доповнено уявлення про вплив хронічної соціально-конфліктної ситуації на головний мозок: кількісно підтверджено порушення серотонінергічної системи (цитозольна концентрація білка-транспортера серотоніну знижується вдвічі,  $p < 0,0001$ ). Вперше встановлено патогенетичний зв'язок між цими центральними змінами та периферичними процесами: показано, що дезадаптивна інформація передається на периферію, запускаючи каскад нейрохімічних і гормональних порушень. Наслідком є посилення та пролонгація апоптозу, зниження транскрипційної активності й експресії факторів ендогенної цитопротекції, а також дисбаланс лейкоцитів у прирановій зоні. Сукупність цих змін у кінцевому підсумку зумовлює погіршення загоєння різаної рани шкіри.

У ході даного дослідження доповнено уявлення про патогенез порушення процесів репаративної регенерації шкіри після різаної рани в умовах хронічного соціального стресу: показано, що цей процес пов'язаний з активацією та пролонгацією апоптозу на тлі дефіциту антиапоптичних факторів (Bcl-2), деривацією механізмів ендогенної цитопротекції (статистично значуща зменшена експресія маркерів адаптації до ішемії – HIF-1 $\alpha$ , і антиоксидантного захисту – NRF2) та падінням регенераторного потенціалу тканин рани за статистично значущою зменшеною експресією маркерів проліферації (Ki-67), прогеніторних клітин (SOX2), фібробластів (PDGFR $\beta$ ).

Вперше встановлено, що в умовах ХСС погіршення репаративної регенерації шкіри супроводжується пригніченням процесів аутофагії в прирановій зоні, зокрема доведено блокування її фінальної стадії (зафіксовано накопичення маркерного білка p62 на тлі змін експресії LC3B). Це доводить наявність глибоких порушень механізмів внутрішньоклітинного очищення та виживання клітин в умовах стрес-індукованого пошкодження, що стає додатковим чинником хронізації раньового процесу.

Уточнено роль мастоцитів як клітин, що контролюють клітинний та гуморальний гомеостаз: вперше встановлено, що їх реакція в умовах хронічного

соціального стресу призводить до нейрогенного запалення, яке сприяє депонуванню мастоцитів в шкірі ще до нанесення рани для його нівелювання, а їх збільшення в кінці спостереження за репаративним періодом на 30-й день є компенсаторною реакцією в процесі ремодуляції. Також в перше встановлено, що кількісне зменшення мастоцитів в процесі загоєння рани компенсувалось збільшенням щільності й розмірів самих клітин, а також активністю екстрацелюлярної дегрануляції в позаклітинній матрикс ПВСТ.

На підставі проведеного експериментального дослідження вперше встановлено, що активна дегрануляція мастоцитів в позаклітинній матрикс ПВСТ при ініціюванні ними підвищеної запальної реакції супроводжувалась багаторазовим, порівняно з контролем, збільшенням кількості еозинофілів, направленим на регулювання її ступеня.

Доповнено існуючі дані щодо міжклітинних взаємодій: макрофаги і лімфоцити, як клітини імунної системи, що визначають морфогенетичні зміни в шкірі, мали сильні кореляційні залежності у фізіологічних умовах ( $r = 0,96$ ) і не втрачали цей зв'язок й в умовах ХСС ( $r = 0,97$ ). Також виявлено спільну участь нейтрофілів і еозинофілів в регуляції запальної реакції, яка проявлялась сильній кореляційній залежності в групі контролю ( $r = 0,98$ ), а також в процесі загоєння ран. Показники площі ран контрольної групи мали значні кореляційні залежності з нейтрофілами ( $r = 0,59$ ) і еозинофілами ( $r = 0,52$ ), а в дослідній групі показники площі рани помірно корелювали з нейтрофілами ( $r = 0,55$ ).

Експериментальне дослідження вперше встановило наявність стійких кореляційних зв'язків між ІКК групи резидентного тканинного типу (еозинофіли – мастоцити,  $r = 0,61$ ) та групи імунних клітин системного рівня імунологічного реагування (макрофаги – лімфоцити,  $r = 0,96$ ), тоді як виражене гальмування міграції клітин групи системного рівня в зону репарації при ХСС висвітлене спектром зворотних кореляційних залежностей: мастоцити і нейтрофіли ( $r = -0,56$ ), мастоцити і лімфоцити ( $r = -0,52$ ), мастоцити і макрофаги ( $r = -0,56$ ), еозинофіли і макрофаги ( $r = -0,54$ ).

## **Практичне значення отриманих результатів**

Результати проведеного дослідження розширюють теоретичні уявлення щодо ролі ХСС у механізмах порушеної репаративної регенерації шкіри. Отримані результати мають фундаментальне значення в біології та медицині та уточнюють клітинні та молекулярні механізми ранозагоювань, та відкривають нові мішені для фармакологічної модуляції репаративної регенерації шкіри після поранення. Результати дослідження обґрунтовують застосування фармакологічних агентів для покращення васкуляризації приранової зони, а також пригнічення апоптозу та імунокорекції як нові напрямки у комплексній медикаментозній терапії прогресування рани.

Результати дослідження впроваджено в навчальний процес і наукову діяльність: кафедри гістології, цитології та ембріології, кафедри патологічної анатомії і судової медицини, кафедри патологічної фізіології, кафедри анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету; кафедри гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; кафедри медичної біології, фармакогнозії, ботаніки та гістології Дніпровського державного медичного університету; кафедри фармакогнозії Івано-Франківського національного медичного університету.

## **Особистий внесок здобувача**

Під час підготовки та роботи над дисертацією авторка особисто здійснила критичний аналіз літературних джерел за темою дисертації. Під керівництвом наукових керівників було сформульовано мету та завдання роботи, а також проведено планування дослідження. Експериментальні дослідження виконано особисто авторкою. Дисертанткою особисто було проведено статистичну обробку цифрових даних, проаналізовано отримані результати, складено таблиці та рисунки, підготовлено та написано розділи роботи. У співпраці з науковими керівниками було здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, а також сформовано висновки з дисертації. Авторка не запозичувала ідеї та/або результати роботи інших співавторів у сумісних публікаціях.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 14 наукових праць, зокрема 4 наукові статті, три з яких індексуються у міжнародній наукометричній базі Scopus. Із них 1 стаття опубліковані у виданні, що належать до I квартилю, одна – до III квартилю, одна – до IV квартилю. Також 1 стаття опублікована в українському журналі категорії Б. Окрім того, опубліковано 10 тез доповідей у збірниках матеріалів науково-практичних конференцій.

### **Апробація результатів дисертації**

Основні положення та результати дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на: 85-й Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2025» (м. Запоріжжя, 15–16 травня 2025 р.); V Міжнародній науковій конференції «Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century» (м. Київ, 29–30 квітня 2025 р.); Міжнародній науково-практичній конференції здобувачів вищої освіти і молодих вчених «Актуальні проблеми розвитку сучасної науки: виклики та перспективи» (м. Запоріжжя, 2025 р.); 84-й Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2024» (м. Запоріжжя, 23–24 травня 2024 р.); VII Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (м. Запоріжжя, 2024 р.); VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (м. Дніпро, 6–8 листопада 2024 р.); Регіонарній науково-практичній конференції «Молода наука – 2023» (м. Запоріжжя, 2023 р.); IV Міжнародній науковій конференції «Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century» (м. Київ, 22–23 вересня 2022 р.); 83-й Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2023» (м. Запоріжжя, 25–26 травня 2023 р.); 82-й Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2022» (м. Запоріжжя, 17 травня 2022 р.); V Всеукраїнській науково-

практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (м. Дніпро, 20–22 жовтня 2021 р.).

*Ключові слова:* імунна система, регенерація тканин, стрес, різана рана, апоптоз, гіпоксія, волосяні фолікули, кореляційні зв'язки, лімфоцити, макрофаги, мастоцити.

## ANNOTATION

*Makyeyeva L.V.* **Morphofunctional features of skin immunocompetent cells during wound healing in rats under chronic social stress.** – Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

Thesis for obtaining the scientific degree of the Doctor of Philosophy in the specialty 091 «Biology» – Zaporizhzhia National University, Zaporizhzhia, 2026.

Chronic stress is a systemic factor that can lead to impaired wound healing. However, the cellular and molecular mechanisms through which stress-induced effects on skin wound healing are realized, in particular the role of immunocompetent cells and oxidative stress, remain insufficiently studied.

In an experiment on Wistar rats, the model of chronic social stress (CSS) was reproduced by social isolation and psycho-emotional exposure for 21 days. The presence of stress was confirmed by the “open field” test, and the state of the serotonergic system was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay determining the concentration of the serotonin transporter protein (Slc6a4). To evaluate the course of the wound process (on days 1, 3, 7, 14 and 30 of wound healing), morphometric (area of the damaged region), histological (quantitative dynamics of mast cells, macrophages, lymphocytes, neutrophils, eosinophils) and immunohistochemical methods of studying the marginal zone of a cut skin wound in rats were used with markers of immunocompetent cells (CD3, CD4, CD8, CD20, CD68), proliferation (Ki-67), vascularization (CD34), regeneration factors (PDGFR $\beta$ , CGRP), apoptosis (Bcl-2, caspases 3, 9), endogenous cytoprotection (SOX2, HIF-1 $\alpha$ ), antioxidant defense and autophagy (NRF2, LC3B, p62).

The results revealed a significant delay in reparative processes. Thus, on the 14th day of the experiment, the unhealed defect area in animals exposed to CSS still constituted 53.3% compared with 17.5% in the control group. At the morphological level, this was preceded by delayed epithelialization, formation of granulation tissue and a 1.6-fold decrease in the number of vessels precisely at the peak of the proliferation

phase (day 7).

Particular attention in the work was paid to the study of the quantitative dynamics of immunocompetent cells. It was found that even before wounding, CSS provoked abnormal mobilization of mast cells (their number increased tenfold, up to 9.47 cells / 0.01 mm<sup>2</sup>) and eosinophils as a consequence of previous neurogenic inflammation of the skin. At all stages of wound healing, a deficiency of macrophages (CD68<sup>+</sup>), lymphocytes (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>) and neutrophils was recorded.

It was established that chronic social stress significantly disrupts the molecular and cellular mechanisms of reparative skin regeneration. Immunohistochemical analysis showed a decrease in proliferative and regenerative activity of cells (reduced expression of Ki-67, SOX2, PDGFR $\beta$ ) and impairment of neurogenic regulation of inflammation (imbalance of CGRP expression). At the same time, an increase in apoptosis was noted (increased expression of caspase-3 against the background of decreased Bcl-2) as well as disturbances in autophagic and cytoprotective mechanisms (decreased HIF-1 $\alpha$ , NRF2, LC3B and increased p62). The obtained results indicate suppression of cellular proliferation, intensification of apoptotic processes and depletion of endogenous cytoprotection mechanisms, which leads to slowing and impairment of reparative skin regeneration.

The work proves that chronic social stress forms a stable pathological system of immuno-neuro-endocrine changes. The central link of this system is the disruption of the transition from the inflammation stage to proliferation, which is realized through dysregulation of migration and function of immunocompetent cells at two levels.

At the systemic level — a persistent deficiency of lymphocytes, macrophages and neutrophils in the wound area throughout the entire wound process. At the regional level — stress-induced hyperactivation of mast cells with enhanced degranulation and initiation of neurogenic inflammation, which is partially restrained by an additive increase in eosinophil infiltration.

In parallel, intensification and prolongation of apoptosis occurs against the background of deficiency of anti-apoptotic protection, suppression of transcriptional activity and decreased expression of endogenous cytoprotection factors. The

combination of these mechanisms makes full reparative regeneration impossible and causes chronicity of cut skin wound healing.

### **Scientific novelty of the obtained results**

The understanding of the impact of chronic social conflict situations on the brain has been expanded and supplemented: disruption of the serotonergic system has been quantitatively confirmed (the cytosolic concentration of the serotonin transporter protein decreases twofold,  $p < 0.0001$ ). For the first time, a pathogenetic link has been established between these central changes and peripheral processes: it has been shown that maladaptive information is transmitted to the periphery, triggering a cascade of neurochemical and hormonal disturbances. The consequences include enhanced and prolonged apoptosis, reduced transcriptional activity and expression of endogenous cytoprotection factors, as well as leukocyte imbalance in the peri-wound zone. Together, these changes ultimately lead to impaired healing of cutaneous incised wounds.

In the course of this study, the understanding of the pathogenesis of impaired reparative skin regeneration following an incised wound under conditions of chronic social stress has been supplemented: it has been shown that this process is associated with the activation and prolongation of apoptosis against a background of deficiency of anti-apoptotic factors (Bcl-2), deviation of endogenous cytoprotection mechanisms (statistically significant reduced expression of markers of adaptation to ischemia — HIF-1 $\alpha$ , and antioxidant defense — NRF2), and a decline in the regenerative potential of wound tissue, evidenced by statistically significant reduced expression of proliferation markers (Ki-67), progenitor cells (SOX2), and fibroblasts (PDGFR $\beta$ ).

For the first time, it has been established that under conditions of chronic social stress, impaired reparative skin regeneration is accompanied by suppression of autophagy processes in the peri-wound zone; specifically, blockade of its final stage has been demonstrated (accumulation of the marker protein p62 was recorded alongside changes in LC3B expression). This proves the presence of profound disturbances in the mechanisms of intracellular clearance and cell survival under stress-induced damage, which becomes an additional factor in the chronification of the wound process.

The role of mast cells as regulators of cellular and humoral homeostasis has been refined: for the first time, it has been established that their response under conditions of chronic social stress leads to neurogenic inflammation, which promotes mast cell deposition in the skin even prior to wound infliction as a counterbalancing mechanism, while their increase at the end of the observation period on day 30 of the reparative phase represents a compensatory response during remodulation. It has also been established for the first time that the quantitative reduction of mast cells during wound healing was compensated by an increase in the density and size of the cells themselves, as well as by the activity of extracellular degranulation into the extracellular matrix of the loose connective tissue.

Based on the experimental study conducted, it has been established for the first time that active degranulation of mast cells into the extracellular matrix of the dense connective tissue, upon their initiation of an enhanced inflammatory response, was accompanied by a manifold increase — compared to controls — in the number of eosinophils, directed at regulating the degree of that response.

Existing data on intercellular interactions have been supplemented by demonstrating that macrophages and lymphocytes, as the principal cells of the immune system governing morphogenetic changes in the skin, exhibited strong correlational dependencies under physiological conditions ( $r = 0.96$ ) and did not lose this relationship under conditions of chronic social stress ( $r = 0.97$ ). A joint involvement of neutrophils and eosinophils in the regulation of the inflammatory response was also identified, manifesting as a strong correlational dependency in the control group ( $r = 0.98$ ), as well as during wound healing. Wound area indices in the control group showed significant correlational dependencies with neutrophils ( $r = 0.59$ ) and eosinophils ( $r = 0.52$ ), while in the experimental group, wound area indices showed moderate correlation with neutrophils ( $r = 0.55$ ).

The experimental study established for the first time the presence of stable correlational relationships between immune competent cells of the resident tissue type (eosinophils – mast cells,  $r = 0.61$ ) and the group of immune cells of the systemic level of immunological response (macrophages – lymphocytes,  $r = 0.96$ ), whereas

pronounced inhibition of migration of systemic-level cells into the zone of repair under chronic social stress was reflected by a spectrum of inverse correlational dependencies: mast cells and neutrophils ( $r = -0.56$ ), mast cells and lymphocytes ( $r = -0.52$ ), mast cells and macrophages ( $r = -0.56$ ), eosinophils and macrophages ( $r = -0.54$ ).

### **Practical significance of the obtained results**

The results of the conducted study expand theoretical ideas about the role of chronic social stress in the mechanisms of impaired reparative skin regeneration. The obtained results are of fundamental importance in biological and medical sciences, clarify the cellular and molecular mechanisms of wound healing, and open new targets for pharmacological modulation of reparative skin regeneration after injury. The results of the study substantiate the use of pharmacological agents to improve vascularization of the periwound area, as well as suppression of apoptosis and immunocorrection as new directions in the complex drug therapy of wound progression.

The results of the study have been implemented into the educational process and scientific activity of: the Department of Histology, Cytology and Embryology, the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, the Department of Pathological Physiology, the Department of Human Anatomy, Operative Surgery and Topographic Anatomy of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University; the Department of Histology, Cytology and Embryology of Danylo Halytsky Lviv National Medical University; the Department of Medical Biology, Pharmacognosy, Botany and Histology of Dnipro State Medical University; the Department of Pharmacognosy of Ivano-Frankivsk National Medical University.

### **Personal contribution of the applicant**

During preparation and work on the dissertation, the author personally carried out a critical analysis of literature sources on the topic of the dissertation. Under the supervision of the scientific advisors, the aim and objectives of the work were formulated and the research planning was performed. The experimental studies were carried out personally by the author. The applicant personally performed statistical processing of digital data, analyzed the obtained results, compiled tables and figures, and prepared and wrote the sections of the work. In cooperation with the scientific

advisors, analysis and generalization of the obtained results were performed and conclusions of the dissertation were formulated. The author did not borrow ideas and/or results of other co-authors in joint publications.

**Publications.** Based on the materials of the dissertation, 14 scientific papers have been published, including 4 scientific articles, three of which are indexed in the international scientometric database Scopus. Among them, 1 article was published in a journal belonging to the I quartile, one – to the III quartile, and one – to the IV quartile. In addition, one article was published in a Ukrainian journal of category B. Besides that, 10 abstracts of reports were published in the proceedings of scientific and practical conferences.

### **Approbation of the dissertation results**

The main provisions and results of the dissertation were presented and discussed at: the 85th All-Ukrainian scientific and practical conference of young scientists and students with international participation “Current Issues of Modern Medicine and Pharmacy – 2025” (Zaporizhzhia, May 15–16, 2025); the V International scientific conference “Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century” (Kyiv, April 29–30, 2025); the International scientific and practical conference of higher education applicants and young scientists “Current Problems of the Development of Modern Science: Challenges and Prospects” (Zaporizhzhia, 2025); the 84th All-Ukrainian scientific and practical conference of young scientists and students with international participation “Current Issues of Modern Medicine and Pharmacy – 2024” (Zaporizhzhia, May 23–24, 2024); the VII International scientific and practical conference “Modern Problems of Biology, Ecology and Chemistry” (Zaporizhzhia, 2024); the Eighth All-Ukrainian scientific and practical conference with international participation “Theory and Practice of Modern Morphology” (Dnipro, November 6–8, 2024); the Regional scientific and practical conference “Young Science – 2023” (Zaporizhzhia, 2023); the IV International scientific conference “Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century” (Kyiv, September 22–23, 2022); the 83rd All-Ukrainian scientific and practical conference of young scientists and students with international participation “Current Issues of Modern

Medicine and Pharmacy – 2023” (Zaporizhzhia, May 25–26, 2023); the 82nd All-Ukrainian scientific and practical conference of young scientists and students with international participation “Current Issues of Modern Medicine and Pharmacy – 2022” (Zaporizhzhia, May 17, 2022); the Fifth All-Ukrainian scientific and practical conference with international participation “Theory and Practice of Modern Morphology” (Dnipro, October 20–22, 2021).

**Keywords:** *immune system, tissue regeneration, stress, excisional wound, apoptosis, hypoxia, hair follicles, correlations, lymphocytes, macrophages, mast cells.*

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Makyeyeva L, Belenichev I, Aliyeva O, Frolov O, Petakh P, Kamyshnyi O. Impact of chronic social stress on molecular markers of skin regeneration during experimental excisional wounding. *Front Immunol.* 2025;16:1656214. doi:10.3389/fimmu.2025.1656214
2. Makyeyeva LV, Frolov OK, Aliyeva OG. Morphometric changes in rat periwound skin during healing of excisional wounds after exposure to chronic social stress. *Innov Biosyst Bioeng.* 2025;9(1):13–25. doi:10.20535/ibb.2025.9.1.310092
3. Makyeyeva L, Frolov O, Aliyeva O. Functional changes in skin mast cells during surgical wound healing in rats after the influence of chronic social stress. *Fitoterapiia Chasopys.* 2024;(2):36–46. doi:10.32782/2522-9680-2024-2-36
4. Makyeyeva LV, Aliyeva OG, Frolov OK. Quantitative characteristics of mast cells in the course of wound healing in rats with chronic social stress. *Acta Biol Ukrainica.* 2021;(1):34–41.
5. Makyeyeva LV, Frolov OK, Aliyeva OG. Morphological changes in rat dermis after exposure to chronic social stress. *Теорія та практика сучасної морфології: матеріали VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю; 6–8 листоп. 2024; Дніпро: ДДМУ; 2024. 181 с.*
6. Makyeyeva L. Neuroimmune skin remodeling in response to chronic social stress in rats. In: *Збірник тез Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми розвитку сучасної науки: виклики та перспективи»; 2025; Запоріжжя: ЗНУ; 2025. 604 с.*
7. Makyeyeva L, Frolov O. The impact of chronic social stress on the morphogenetic function of mast cells during skin wound healing in rats. *Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century: Abstracts book of the V International Scientific Conference; 29–30 квіт. 2025; Kyiv; 2025. 97 p.*

8. Maquyeva L. Chronic social stress drives neuroimmune alterations in rat skin via CGRP and mast cell dynamics. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2025: збірник тез доповідей 85 Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю; 15–16 трав. 2025; Запоріжжя: ЗДМФУ; 2025. 358 с.*

9. Maquyeva LV, Frolov OK, Aliyeva OG. Changes in the connective tissue component of the rat periwound skin area during healing. *Сучасні проблеми біології, екології та хімії: матеріали VII Міжнародної науково-практичної конференції; 2024; Запоріжжя: СоруArt; 2024. 318 с.*

10. Maquyeva L. Changes in the connective tissue component of the rat periwound skin area during healing after the influence of social chronic stress. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2024: збірник тез доповідей 84 Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю; 23–24 трав. 2024; Запоріжжя: ЗДМФУ; 2024. 216 с.*

11. Maquyeva LV. Amount of mast cells as a prognostic marker of wound healing outcome. *Молода наука-2023: збірник наукових праць студентів, аспірантів, докторантів і молодих вчених; 2023; Запоріжжя: ЗНУ; 2023. Т. 3. 399 с.*

12. Maquyeva L, Frolov O, Aliyeva O. The role of mast cells in the healing of skin wounds in rats after the influence of chronic social stress. *Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century: Abstracts book of the IV International Scientific Conference; 22–23 верес. 2022; Kyiv; 2022. p. 14.*

13. Maquyeva LV. Shifts in morphofunctional characteristics of mast cells in the skin of rats during wound healing after the influence of chronic social stress. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2022: збірник тез доповідей науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів; 17 трав. 2022; Запоріжжя: ЗДМУ; 2022. С. 77.*

14. Maquyeva LV, Frolov OK, Aliyeva OG, Gromokovska TS. Morphological changes in the skin epithelium of rats during inflammatory stage of wound healing under the influence of chronic social stress. *Теорія та практика*

сучасної морфології: матеріали V Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю; 20–22 жовт. 2021; Дніпро: ДДМУ; 2021. 181 с.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ.....	23
ВСТУП.....	25
РОЗДІЛ 1 РАНОВИЙ ПРОЦЕС.....	34
1.1 Фази ранового процесу.....	35
1.1.1 Фаза запалення .....	36
1.1.2 Фаза проліферації.....	38
1.1.3 Фаза ремоделювання.....	42
1.2. Участь імунокомпетентних клітин в загоєнні ран.....	44
1.2.1 Роль нейтрофілів в загоєнні ран .....	44
1.2.2 Роль макрофагів в загоєнні ран.....	47
1.2.3 Роль мастоцитів в загоєнні ран .....	49
1.2.4 Роль лімфоцитів в загоєнні ран.....	53
1.3. Вплив стресового фактору на перебіг ранового процесу .....	56
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	61
2.1 Експериментальні тварини.....	61
2.2 Експериментальна модель хронічного соціального стресу.....	62
2.3 Тест «Відкрите поле».....	64
2.4 Забір біологічного матеріалу та моделювання рани.....	64
2.5 Морфометричні дослідження.....	65
2.6 Імуногістохімічні та імуноферментні дослідження.....	67
2.7 Статистичний аналіз .....	72
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	74
3.1 Результати тесту «Відкрите поле» та оцінка стану серотонінергічної трансмисії аміноспецифічної системи головного мозку.....	74
3.2 Морфологічні характеристики шкіри в процесі загоєння різаних ран в після впливу ХСС.....	75

3.2.1 Морфологічні особливості загоєння різаних ран після впливу ХСС .....	75
3.2.2 Морфометричні особливості шарів шкіри щурів під час загоєння ран після впливу ХСС.....	77
3.2.3 Оцінка проліферативної активності в різних шарах шкіри щурів під час загоєння ран після впливу ХСС .....	83
3.2.4 Особливості васкуляризації шкіри щурів під час загоєння ран після впливу ХСС.....	86
3.3 Участь клітин вродженого та набутого імунітету системного типу (нейтрофіли, макрофаги, лімфоцити) в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС.....	88
3.3.1 Кількісна динаміка нейтрофілів в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС.....	88
3.3.2 Кількісна динаміка макрофагів під час загоєння різаних ран після впливу ХСС.....	89
3.3.2.1 Кількісна динаміка CD68 <sup>+</sup> клітин під час загоєння різаних ран після впливу ХСС.....	92
3.3.3 Кількісна динаміка лімфоцитів в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС .....	95
3.3.3.1 Кількісна динаміка CD3 <sup>+</sup> лімфоцитів в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС.....	98
3.3.3.2 Кількісна динаміка CD8 <sup>+</sup> лімфоцитів в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС.....	100
3.3.3.3 Кількісна динаміка CD4 <sup>+</sup> лімфоцитів в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС.....	102
3.3.3.4 Кількісна динаміка індексу CD4/CD8 в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС.....	104
3.3.3.5 Кількісна динаміка CD20 <sup>+</sup> лімфоцитів в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС.....	106
3.4 Участь клітин вродженого імунітету резидентного тканинного типу (мастоцити, еозинофіли) в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС..	108

3.4.1 Кількісна і функціональна динаміка мастоцитів у процесі з загоєння різаних ран після впливу ХСС.....	108
3.4.2 Кількісна динаміка еозинофілів під час загоєння різаних ран після впливу ХСС.....	113
3.5 Кореляційний аналіз залученості імунокомпетентних клітин в процес ранозагоювання в умовах ХСС.....	116
3.6 Імуногістохімічні маркери молекулярно-клітинних взаємодій в процесі загоєння різаних ран в умовах ХСС.....	116
3.6.1 Динаміка маркерів апоптозу в процесі загоєння різаних ран після впливу ХСС.....	116
3.6.2 Динаміка маркерів ендогенної цитопротекції в процесі загоєння різаних ран після впливу ХСС.....	121
3.6.3 Динаміка експресії транскрипційних факторів в процесі загоєння різаних ран після впливу ХСС.....	126
РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	137
4.1 Динаміка морфометричних змін приранової зони шкіри шурів при загоєнні різаної рани після впливу ХСС.....	139
4.2 Участь клітин вродженого та набутого імунітету системного типу (нейтрофіли, макрофаги, лімфоцити) приранової зони шкіри шурів у загоєнні різаної рани після впливу ХСС.....	145
4.3 Участь клітин вродженого тканинного (регіонарного типу): мастоцитів та еозинофілів приранової зони шкіри шурів у загоєнні різаної рани після впливу ХСС.....	165
4.4 Взаємозв'язок між кількісними показниками імунокомпетентних клітин та репарацією шкіри після впливу хронічного соціального стресу.....	171
4.5 Особливості молекулярно-клітинних взаємодій в процесі загоєння різаних ран в умовах ХСС.....	176
ВИСНОВКИ.....	183
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	186
ДОДАТОК А1.....	217

	22
ДОДАТОК А2.....	218
ДОДАТОК А3.....	219
ДОДАТОК А4.....	220
ДОДАТОК А5.....	221
ДОДАТОК А6.....	222
ДОДАТОК А7.....	223
ДОДАТОК А8.....	224
ДОДАТОК А9.....	225
ДОДАТОК А10.....	226
ДОДАТОК А11.....	227
ДОДАТОК А12.....	228
ДОДАТОК А13.....	229
ДОДАТОК А14.....	230
ДОДАТОК А15.....	231
ДОДАТОК А16.....	232
ДОДАТОК А17.....	233
ДОДАТОК А18.....	234
ДОДАТОК А19.....	235
ДОДАТОК А20.....	236
ДОДАТОК А21.....	238
ДОДАТОК А22.....	240
ДОДАТОК Б1 .....	243
ДОДАТОК Б2 .....	244
ДОДАТОК Б3 .....	245
ДОДАТОК Б4 .....	246
ДОДАТОК Б5 .....	247
ДОДАТОК Б6 .....	248
ДОДАТОК Б7 .....	249
ДОДАТОК В.....	250
ДОДАТОК Г .....	253

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ

АКТГ – адренокортикотропний гормон

АФК – активні форми кисню

Bcl-2 – білок В-клітинної лімфоми 2 (B-cell lymphoma 2)

CD – кластер диференціювання (Cluster of Differentiation)

CGRP – пептид, пов'язаний з геном кальцитоніну (Calcitonin Gene-Related Peptide)

ДАВ – 3,3'-діамінобензидин (3,3'-Diaminobenzidine)

DAMPs – молекули, асоційовані з ушкодженням (Damage-Associated Molecular Patterns)

ГГН – гіпоталамо-гіпофізарно-надниркова (вісь)

ГК – глюкокортикоїди

FGF – фактор росту фібробластів (

HDN – нейтрофіли нормальної щільності

HIF-1 $\alpha$  – фактор, індукований гіпоксією 1-альфа (Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha)

ІКК – імунокомпетентні клітини

ІЛ (ІЛ) – інтерлейкін (Interleukin)

Ki-67 – антиген Ki-67 (білок-маркер клітинної проліферації)

КТРГ – кортикотропін-релізінг-гормон

LC3B – легкий ланцюг 3 білка, асоційованого з мікротрубочками 1A/1B (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3)

ММП (MMP) – матриксні металопротеїнази (Matrix Metalloproteinases)

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини

NETs – нейтрофільні позаклітинні пастки (Neutrophil Extracellular Traps)

NRF2 – ядерний фактор еритроїдного походження 2 (Nuclear factor erythroid 2-

related factor 2)

p62 (SQSTM1) – секвестосома 1 (Sequestosome 1)

PAMPs – молекули, асоційовані з патогенами (Pathogen-Associated Molecular Patterns)

PBS – фосфатно-сольовий буфер (Phosphate Buffered Saline)

PDGF – фактор росту тромбоцитарного походження (Platelet-Derived Growth Factor)

PDGFR $\beta$  – рецептор тромбоцитарного фактора росту бета (Platelet-Derived Growth Factor Receptor beta)

ПКМ – позаклітинний матрикс

ПОМК – проопіомеланокортин

PI – регуляторний індекс (співвідношення CD4/CD8)

SOX2 – транскрипційний фактор SOX2 (SRY-box transcription factor 2)

TGF- $\beta$  – трансформуючий фактор росту бета (Transforming Growth Factor beta)

TNF- $\alpha$  – фактор некрозу пухлин альфа (Tumor Necrosis Factor alpha)

VEGF – судинний ендотеліальний фактор росту (Vascular Endothelial Growth Factor)

ХСС – хронічний соціальний стрес

ШІНЕ – шкірна імунна нейроендокринна (система)

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Вивчення тенденцій та закономірностей відновлення органів та тканин після ушкодження серед різних вікових груп населення як в Україні так і в світі в цілому являє собою складову в плануванні стратегії розвитку медичної науки. В останні роки спостерігається загальна стійка тенденція поглиблення теоретичних знань та впровадження результатів фундаментальних наукових досліджень у клінічну практику. Проте вони спрямовані у більшій мірі на корекцію наслідків, а не причин та провідних механізмів ураження органів за умов дії патологічних чинників.

Одним із найбільш часто ушкоджуваних органів є шкіра [1-3]. Шкіра є найбільшим органом тіла і органом первинного імунного захисту, попереджуючим проникнення бактерій, вірусів та інших екзогенних антигенів [4, 5] і обмежуючим переміщення води в та з тіла [6].

Після травмування, шкіра потребує відновлення гомеостазу, цілісності структури і функціональної компетенції шкіри [7-9]. Загоєння ран протікає за динамічної взаємодії імунокомпетентних клітин, резидентних клітин, компонентів позаклітинного матриксу і розчинних медіаторів. Процес загоєння, як правило, ділиться на три послідовні фази, що перехресуються: судинна реакція, запалення, проліферація і ремоделювання. Якщо рани не прогресують своєчасним і впорядкованим чином, вони перетворюються в хронічні, незагойні рани, які є постійно зростаючою проблемою охорони здоров'я [10-13]. Хронічні рани вражають до 5% населення розвинених країн у 2025 році, з глобальним ринком догляду за ранами на рівні 18–22 млрд доларів США, що пов'язано із зростанням через діабет, венозну недостатність і старіння. Хронічні рани — виразки стопи, венозні виразки, пролежні — є глобальною медичною проблемою: вони вражають 1–2% населення, а лише в США щорічно реєструється понад 6,5 мільйона випадків. [14, 15]. У зв'язку зі зростаючою

кількістю операційних втручань різко зростає необхідність післяопераційного догляду за раною. Невідкладна допомога при гострих ранах має велике значення не тільки в умовах війни, але і під час стихійних лих, терористичних атак, нещасних випадках.

Багато факторів можуть призвести до порушення загоєння рани. В загальних умовах, фактори, що впливають на загоєння можна розділити на місцеві та системні. Місцеві фактори безпосередньо впливають на характеристики самої рани, в той час як системними факторами є загальний стан здоров'я або хвороби, стан особистості, які впливають на загоєння ран. Багато з цих факторів пов'язані, і системні чинники діють через місцеві ефекти, що впливають на загоєння ран. До системних факторів відносять: стрес, статеві гормони, хвороби (діабет, жовтяниця, уремія, фібрози), імуноскомпроментовані стани (онкологічні захворювання, СНІД, променева терапія), алкоголізм та паління, ожиріння та харчування [16].

Найбільш розповсюдженим системним фактором є стрес. До стресу схильна будь-яка людина незалежно від займаної посади, положення в суспільстві і матеріального достатку. За статистикою, у 2024 році 62% респондентів у 31 країні повідомили, що стрес впливає на їх повсякденне життя принаймні раз, із піковим показником 76% у Туреччині та найнижчим – 44% у Японії. Майже 79% людей регулярно відчують стрес, а 40% вважають його відчутним [17, 18]. У 2024 році 87% українців пережили щонайменше одну стресову ситуацію, що є найгіршим показником за весь період спостережень КМІС з 2000 року (порівняно з 52% у 2013 році), з середньою кількістю 2–3 видів стресу на особу [19].

Останніми роками стало зрозуміло, що стрес може значно сповільнювати загоєння [20, 21]. Так, за різними даними відсоток сповільнення загоєння ран коливається від 24 до 60% [21-23].

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційна робота є фрагментом планової ініціативної науково-дослідної теми кафедри гістології цитології та ембріології Запорізького державного медичного

університету «Імуноморфологічні особливості внутрішніх органів при дії ендотеліальних екзогенних чинників на організм» (2018–2022 рр., № держреєстрації: 0118U004250). Дисертантка є співвиконавицею зазначеної теми. У межах виконання наукової роботи здобувачкою особисто проведено експериментальні дослідження. Також дисертантка є відповідальним виконавцем держбюджетного проєкту МОН України «Розроблення засобу для стимулювання процесів репаративної регенерації при пораненнях та загоєння ран» (2025-2027 рр., № 0125U000690).

**Мета дослідження:** визначити кількісну динаміку клітин вродженого та набутого імунітету та з'ясувати роль репаративних медіаторів, факторів апоптозу, ендогенної цитопротекції в механізмах імунної дисрегуляції репарації шкіри щурів при загоєнні різаних ран в умовах хронічного соціального стресу.

**Задачі дослідження:**

1. Дослідити вплив 21-денного моделювання хронічного соціального стресу на поведінкові реакції щурів (орієнтовно-дослідницьку активність та психоемоційний стан), а також на стан серотонінергічної трансмісії головного мозку за рівнем експресії білка-транспортера серотоніну (Slc6a4).

2. Вивчити макроскопічні та гістоморфометричні особливості перебігу ранового процесу, зокрема зміни товщин шарів шкіри (епідермісу, дерми) та стану васкуляризації при загоєнні різаної рани шкіри в нормі та в умовах ХСС.

3. Оцінити кількісну динаміку імунокомпетентних клітин системного регуляторного рівня (нейтрофілів, макрофагів, лімфоцитів) у різні фази ранового процесу в нормі та за умов хронічного соціального стресу.

4. Оцінити кількісну динаміку клітин вродженого тканинного (регіонарного типу) (еозинофілів і мастоцитів) у взаємозв'язку з активністю та типами дегрануляції мастоцитів на різних стадіях ранового процесу в нормі та в умовах ХСС.

5. Визначити взаємозв'язок між кількісними показниками імунокомпетентних клітин та репараційною динамікою шкіри за умов ХСС.

6. Визначити зміни молекулярно-клітинних механізмів репаративної

регенерації шкіри (за маркерами Ki-67, SOX2, PDGFR $\beta$ , CGRP) на різних стадіях ранового процесу в нормі та в умовах хронічного соціального стресу.

7. Встановити динаміку інтенсивності апоптозу в крайовій зоні ран шкіри при загоєнні різаної рани в нормі та в умовах ХСС шляхом оцінки експресії проапоптотичних (каспаза-3, каспаза-9) та антиапоптотичних (Bcl-2) факторів.

8. Проаналізувати стан механізмів ендогенної цитопротекції (NIF-1 $\alpha$ , NRF2) та динаміку процесів аутофагії (за маркерами p62 та LC3B) у клітинах крайової зони шкіри при регенерації різаної рани в нормі та за умов ХСС.

9. З'ясувати та узагальнити патогенетичний зв'язок між індукованими хронічним соціальним стресом нейрохімічними, гормональними й імунними порушеннями та погіршенням загоєння різаної рани шкіри.

**Об'єкт дослідження** – закономірності ремоделяційних процесів в різаній рані в умовах хронічного соціального стресу.

**Предмет дослідження** – кількісні та функціональні зміни імунокомпетентних клітин, молекулярних маркерів апоптозу, ендогенної цитопротекції та репаративної активності клітин приранової зони в процесі загоєння ран шкіри в умовах хронічного соціального стресу.

### **Наукова новизна проведеної роботи**

Розширено та доповнено уявлення про вплив хронічної соціально-конфліктної ситуації на головний мозок: кількісно підтверджено порушення серотонінергічної системи (цитозольна концентрація білка-транспортера серотоніну знижується вдвічі,  $p < 0,0001$ ). Вперше встановлено патогенетичний зв'язок між цими центральними змінами та периферичними процесами: показано, що дезадаптивна інформація передається на периферію, запускаючи каскад нейрохімічних і гормональних порушень. Наслідком є посилення та пролонгація апоптозу, зниження транскрипційної активності й експресії факторів ендогенної цитопротекції, а також дисбаланс лейкоцитів у прирановій зоні. Сукупність цих змін у кінцевому підсумку зумовлює погіршення загоєння різаної рани шкіри.

У ході даного дослідження доповнено уявлення про патогенез порушення

процесів репаративної регенерації шкіри після різаної рани в умовах хронічного соціального стресу: показано, що цей процес пов'язаний з активацією та пролонгацією апоптозу на тлі дефіциту антиапоптичних факторів (Bcl-2), деривацією механізмів ендогенної цитопротекції (статистично значуща зменшена експресія маркерів адаптації до ішемії – HIF-1 $\alpha$ , і антиоксидантного захисту – NRF2) та падінням регенераторного потенціалу тканин рани за статистично значущою зменшеною експресією маркерів проліферації (Ki-67), прогеніторних клітин (SOX2), фібробластів (PDGFR $\beta$ ).

Вперше встановлено, що в умовах хронічного соціального стресу погіршення репаративної регенерації шкіри супроводжується пригніченням процесів аутофагії в прирановій зоні, зокрема доведено блокування її фінальної стадії (зафіксовано накопичення маркерного білка p62 на тлі змін експресії LC3B). Це доводить наявність глибоких порушень механізмів внутрішньоклітинного очищення та виживання клітин в умовах стрес-індукованого пошкодження, що стає додатковим чинником хронізації раньового процесу.

Уточнено роль мастоцитів як клітин, що контролюють клітинний та гуморальний гомеостаз: вперше встановлено, що їх реакція в умовах хронічного соціального стресу призводить до нейрогенного запалення, яке сприяє депонуванню мастоцитів в шкірі ще до нанесення рани для його нівелювання, а їх збільшення в кінці спостереження за репаративним періодом на 30-й день є компенсаторною реакцією в процесі ремодуляції. Також вперше встановлено, що кількісне зменшення мастоцитів в процесі загоєння рани компенсувалось збільшенням щільності й розмірів самих клітин, а також активністю екстрацелюлярної дегрануляції в позаклітинний матрикс ПВСТ.

На підставі проведеного експериментального дослідження вперше встановлено, що активна дегрануляція мастоцитів в позаклітинний матрикс ПВСТ при ініціюванні ними підвищеної запальної реакції супроводжувалась багаторазовим, порівняно з контролем, збільшенням кількості еозинофілів, направленим на регулювання її ступеня.

Доповнено існуючі дані щодо міжклітинних взаємодій, показавши, що макрофаги і лімфоцити, будучи головними клітинами імунної системи, що визначають морфогенетичні зміни в шкірі, мали сильні кореляційні залежності у фізіологічних умовах ( $r = 0,96$ ) і не втрачали цей зв'язок й в умовах ХСС ( $r = 0,97$ ). Також виявлено спільну участь нейтрофілів і еозинофілів в регуляції запальної реакції, яка проявлялась сильній кореляційній залежності в групі контролю ( $r = 0,98$ ) (між показниками контрольної групи), а також в процесі загоєння ран. Показники площі ран контрольної групи мали значні кореляційні залежності з нейтрофілами ( $r = 0,59$ ) і еозинофілами ( $r = 0,52$ ), а в дослідній групі (групі дослідження) показники площі рани помірно корелювали з нейтрофілами ( $r = 0,55$ ).

Експериментальне дослідження вперше встановило наявність стійких кореляційних зв'язків між ІКК групи резидентного тканинного типу (еозинофіли – мастоцити,  $r = 0,61$ ) та групи імунних клітин системного рівня імунологічного реагування (макрофаги – лімфоцити,  $r = 0,96$ ), тоді як виражене гальмування міграції клітин групи системного рівня в зону репарації при ХСС висвітлене спектром зворотних кореляційних залежностей: мастоцити і нейтрофіли ( $r = 0,56$ ), мастоцити і лімфоцити ( $r = -0,52$ ), мастоцити і макрофаги ( $r = -0,56$ ), еозинофіли і макрофаги ( $r = -0,54$ ).

### **Практичне значення отриманих результатів**

Результати проведеного дослідження розширюють теоретичні уявлення щодо ролі ХСС у механізмах порушеної репаративної регенерації шкіри. Отримані результати мають фундаментальне значення в біології та медицині та уточнюють клітинні та молекулярні механізми ранозагоювань, та відкривають нові мішені для фармакологічної модуляції репаративної регенерації шкіри після поранення. Результати дослідження обґрунтовують застосування фармакологічних агентів для покращення васкуляризації приранової зони, а також пригнічення апоптозу та імунокорекції як нові напрямки у комплексній медикаментозній терапії прогресування рани.

Результати дослідження впроваджено в навчальний процес і наукову

діяльність: кафедри гістології, цитології та ембріології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету; кафедри патологічної анатомії і судової медицини Запорізького державного медико-фармацевтичного університету; кафедри патологічної фізіології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету; кафедри анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету; кафедри гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; кафедри медичної біології, фармакогнозії, ботаніки та гістології Дніпровського державного медичного університету; кафедри фармакогнозії Івано-Франківського національного медичного університету.

### **Особистий внесок здобувача**

Під час підготовки та роботи над дисертацією авторка особисто здійснила критичний аналіз літературних джерел за темою дисертації. Під керівництвом наукових керівників було сформульовано мету та завдання роботи, а також проведено планування дослідження. Експериментальні дослідження виконано особисто авторкою. Дисертанткою особисто було проведено статистичну обробку цифрових даних, проаналізовано отримані результати, складено таблиці та рисунки, підготовлено та написано розділи роботи. У співпраці з науковими керівниками було здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, а також сформовано висновки з дисертації. Авторка не запозичувала ідеї та/або результати роботи інших співавторів у сумісних публікаціях.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 14 наукових праць, зокрема 4 наукові статті, три з яких індексуються у міжнародній наукометричній базі Scopus. Із них 1 стаття опубліковані у виданні, що належать до першого квартилю, одна – до третього квартилю, одна – до четвертого квартилю. Також одна стаття опублікована в українському журналі категорії Б. Окрім того, опубліковано 10 тез доповідей у збірниках матеріалів науково-практичних конференцій.

### **Апробація результатів дисертації**

Основні положення та результати дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на: 85-й Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2025» (м. Запоріжжя, 15–16 травня 2025 р.); V Міжнародній науковій конференції «Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century» (м. Київ, 29–30 квітня 2025 р.); Міжнародній науково-практичній конференції здобувачів вищої освіти і молодих вчених «Актуальні проблеми розвитку сучасної науки: виклики та перспективи» (м. Запоріжжя, 2025 р.); 84-й Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2024» (м. Запоріжжя, 23–24 травня 2024 р.); VII Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (м. Запоріжжя, 2024 р.); Восьмій Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (м. Дніпро, 6–8 листопада 2024 р.); Регіонарній науково-практичній конференції «Молода наука – 2023» (м. Запоріжжя, 2023 р.); IV Міжнародній науковій конференції «Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century» (м. Київ, 22–23 вересня 2022 р.); 83-й Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2023» (м. Запоріжжя, 25–26 травня 2023 р.); 82-й Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2022» (м. Запоріжжя, 17 травня 2022 р.); П'ятій Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (м. Дніпро, 20–22 жовтня 2021 р.).

### **Публікації**

За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових праць, зокрема 4 наукові статті, три з яких індексуються у міжнародній наукометричній базі Scopus. Із них 1 стаття опубліковані у виданні, що належать до першого

квартилю, одна – до третього квартилю, одна – до четвертого квартилю. Також одна стаття опублікована в українському журналі категорії Б. Окрім того, опубліковано 11 тез доповідей у збірниках матеріалів науково-практичних конференцій.

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертаційна робота викладена державною мовою на 254 сторінках машинописного тексту та складається з анотації, списку друкованих праць, вступу, 4 розділів: огляду літератури, матеріалів та методів, власних досліджень, а також загальних висновків, списку використаних джерел (з яких кирилицею – 4, латиницею – 308) та додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 156 сторінок друкованого тексту. Роботу ілюстровано 7 таблицями та 44 рисунками.

## РОЗДІЛ 1

### РАНОВИЙ ПРОЦЕС (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Фізіологічне підтримання структурної цілісності епідермісу забезпечується пулом клітин із низьким ступенем диференціювання, які локалізуються переважно в базальному шарі інтерфолікулярного епідермісу, між волосяними фолікулами. Саме ця клітинна популяція відповідає за безперервне оновлення епідермального шару в умовах тканинного гомеостазу. Водночас справжні епідермальні стовбурові клітини, а також клітини їхнього резервного пулу, у тонкій шкірі зосереджені в анатомічно спеціалізованій ніші — зоні ложа волосяного фолікула [24]. Для ідентифікації цих клітин використовують низку молекулярних маркерів, зокрема р63, нестін, фолістатін та інші. Вказана популяція стовбурових клітин є мультипотентною та бере участь у відновленні епідермісу, сальних залоз і волосяних фолікулів. За умов ушкодження шкірного покриву ці клітини активуються, мігрують із фолікулярної ніші у напрямку епідермісу країв рани та виступають основним клітинним джерелом процесів епітелізації ранової поверхні [25].

Регенерація дермального шару в фізіологічних умовах реалізується завдяки координованим процесам проліферації, диференціювання та секреторної активності фібробластів, які формують міжклітинний матрикс і забезпечують механічні властивості тканини. Джерелом поповнення фібробластичної популяції можуть бути не лише резидентні клітини дерми, але й низькодиференційовані клітини периваскулярного походження, зокрема перицити та адвентиціальні клітини судинної стінки [26]. У відповідь на ушкодження дерми або дію механічних чинників, таких як розтягування тканин, відбувається формування фенотипово та функціонально відмінної клітинної популяції — міофібробластів. Саме ці клітини відіграють провідну роль у

репаративній регенерації, забезпечуючи синтез компонентів грануляційної тканини та скорочення ранового дефекту. Джерелами утворення міофібробластів вважаються стовбурові клітини червоного кісткового мозку, перицити, а також резидентні фібробласти дерми. Репаративна регенерація дерми є нерозривно пов'язаною з процесами ангиогенезу, що забезпечує формування нової мікросудинної мережі та адекватне трофічне забезпечення регенеруючої тканини [27,28].

Клітинна проліферація, мітотична активність і диференціювання кератиноцитів, фібробластів та міофібробластів, так само як і формування нових кровоносних судин, перебувають під складним багаторівневим контролем нейромедіаторів, гормональних сигналів, біологічно активних речовин і факторів росту [29]. Зокрема, епідермальний фактор росту (EGF) та фактор росту кератиноцитів активують проліферативну активність і міграційні властивості кератиноцитів, що є важливим для відновлення епідермального покриву [29-31]. Трансформуючий фактор росту  $\beta$  (TGF $\beta$ ), навпаки, інгібує проліферацію та диференціювання кератиноцитів, водночас посилюючи синтетичну та секреторну активність фібробластів і міофібробластів [32]. Фактор росту фібробластів (FGF) стимулює розмноження фібробластів і продукцію ними компонентів позаклітинного матриксу, тоді як фактор росту тромбоцитарного походження (PDGF) відіграє ключову роль у формуванні та проліферації міофібробластів [33]. Фактор росту ендотелію судин (VEGF) активує проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин, забезпечуючи неоангіогенез і подальший ріст судинної мережі [29].

### **1.1 Фази ранового процесу**

Пошкодження шкіри веде до активації ранового процесу. Загоєння ран є складним, еволюційно сформованим процесом, що ґрунтується на взаємодії молекулярних і клітинних регуляторних механізмів, згаданих вище, які реалізуються як на локальному, так і на системному рівнях. Цей процес

відбувається у трьох взаємопов'язаних фазах, які частково перекриваються: гемостазу/запалення, проліферації та диференціювання і ремоделювання.

Кожна з фаз характеризується реалізацією певних процесів за участю різних клітин. Їх участь синхронізована в просторі і часі, контролюється системними і локальними факторами і супроводжується структурними і біохімічними змінами [8,34-38].

### **1.1.1 Фаза запалення**

Процес загоєння ран шкіри ініціюється одразу після порушення цілісності тканин з фази гемостазу, що характеризується формуванням первинного фібринового тромбу [39]. Ця структура виконує не лише механічну функцію зупинки кровотечі, але й слугує резервуаром біологічно активних молекул, що вивільняються з активованих тромбоцитів [39,40]. Тромбоцити, таким чином, виступають як первинні джерела сигнальних медіаторів, що запускають каскад репаративних подій [40]. Серед основних молекул особливе значення мають PDGF та TGF- $\beta$  [41]. Ці фактори росту створюють первинний хемоатрактантний та мітогенний градієнт, який є критично важливим для залучення, активації та проліферації стромальних клітин у ділянці пошкодження [39]. Одночасно TGF- $\beta$ , що вивільняється тромбоцитами та згодом макрофагами, ініціює подальшу секрецію факторів росту, створюючи сигнальний каскад [32,42]. Вивільнені з тромбоцитів фактори росту PDGF та TGF- $\beta$  діють на резидентні клітини дерми, індукуючи їхню активацію та залучення до репарації [43]. PDGF є мітогеном для клітин мезенхімального походження, зокрема фібробластів та гладком'язових клітин, а також медіатором залучення мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) до зони ураження, тоді як TGF- $\beta$ 1 та TGF- $\beta$ 2 відіграють центральну роль у міграції фібробластів з країв рани до її центру [44]. Ці сигнали також активують ендотеліоцити та перицити, що є необхідною передумовою для подальшого ангиогенезу [45]. Паралельно відбувається первинна реакція епідермального шару: кератиноцити, розташовані на краю рани, починають мігрувати для

закриття дефекту, що стимулюється, зокрема, трансформуючим фактором росту-альфа (TGF- $\alpha$ ), який вивільняється прозапальними клітинами, такими як макрофаги [46].

Одночасно з цим, вивільнення з пошкоджених клітин асоційованих з пошкодженням молекулярних патернів (DAMPs) та присутність асоційованих з патогенами молекулярних патернів (PAMPs) активують рецептори розпізнавання патернів, зокрема Toll-подібні рецептори (TLRs), на поверхні резидентних клітин шкіри та інфільтруючих імунних клітин, що формально ініціює фазу запалення [47,48]. Першими прибувають до місця ураження нейтрофіли [49-51]. Вони виконують функцію очищення рани від сторонніх часток і мікроорганізмів та вивільняють низку прозапальних цитокінів, таких як інтерлейкін-1 (IL-1), інтерлейкін-6 (IL-6) і TNF- $\alpha$ , які посилюють запальну відповідь і залучають інші імунні клітини [50]. Нейтрофіли також здатні до утворення позаклітинних пасток (NETs) — сіткоподібних структур з ДНК, гістонів та гранулярних білків, що знерухомлюють та вбивають патогени, але при надмірному утворенні можуть сприяти хронізації запалення та погіршенню загоєння, зокрема у діабетичних ранах [49,50,52].

Сенсорна іннервація шкіри відіграє важливу роль у координації репарації [53]. При пошкодженні з нервових закінчень вивільняються нейропептиди, зокрема кальцитонін-ген-зв'язаний пептид (CGRP) та субстанція P (SP) [54,55]. CGRP стимулює проліферацію кератиноцитів та ендотеліоцитів, тим самим сприяючи ре-епітелізації та ангиогенезу [56]. Субстанція P, у свою чергу, посилює синтез та вивільнення кератиноцитами IL-1, IL-6 та TGF- $\alpha$ , впливаючи на локальну запальну відповідь [57].

Гуморальна регуляція також має значний вплив, зокрема через дію статевих гормонів [58,59]. Естрогени позитивно впливають на загоєння, активуючи кератиноцити, що може бути частково пов'язано зі зниженням експресії інгібіторного фактора міграції макрофагів [58]. Навпаки, андрогени, зокрема 5 $\alpha$ -дигідротестостерон, можуть сповільнювати процес загоєння, пригнічуючи міграційну здатність кератиноцитів [59]. Рання епітелізація є

результатом складної та динамічної мережі міжклітинних взаємодій, особливо між кератиноцитами та фібробластами дерми, що перебувають у стані постійного сигнального діалогу [60]. TGF- $\beta$ 1 демонструє контекстно-залежну плейотропію, одночасно стимулюючи фібротичне відкладення матриксу через диференціацію міофібробластів, у той час як його активність реципрокно модулюється факторами, що походять від кератиноцитів, такими як стратифін, створюючи тісно контрольовану регуляторну вісь, яка диктує перехід від проліферації до ремоделювання [61]. Крім того, клітини в рані адаптуються до стресових умов мікрооточення, таких як гіпоксія, за допомогою внутрішньоклітинних механізмів [62]. TGF- $\beta$ 1, що секретується мезенхімальними стромальними клітинами в умовах гіпоксії, може індукувати аутофагію в кератиноцитах [63]. Цей процес забезпечує цілісність мігруючого епітеліального фронту, дозволяючи кератиноцитам виживати та функціонувати в про-фібротичних та часто гіпоксичних умовах, що одночасно генеруються стромальними клітинами в рановому ложі, що є необхідним для успішного завершення епітелізації [64]. Таким чином, сукупність паракринних сигналів, системних впливів та клітинно-автономних відповідей керує процесом закриття епітеліального дефекту на ранніх стадіях загоєння [61,62].

### **1.1.2 Фаза проліферації**

Проліферативна фаза загоєння рани є комплексним, високооркестрованим процесом, що характеризується інтенсивною клітинною активністю, спрямованою на відновлення тканинної цілісності, де головну роль відіграє реепітелізація, [63]. Активація кератиноцитів, що проявляється у вигляді посиленої проліферації та спрямованої міграції, є фундаментальною передумовою для відновлення епідермального бар'єра [63, 64]. Цей процес модулюється мережею сигнальних молекул, серед яких домінують фактори росту родини EGF, що функціонують як ліганди для відповідних рецепторів, активуючи низхідні кіназні каскади, які стимулюють клітинний цикл. Зокрема,

TGF- $\alpha$  та гепарин-зв'язувальний EGF-подібний фактор виступають потужними індукторами як мітотичної активності, так і міграції кератиноцитів [64, 65]. Окрім цього, значний внесок у регуляцію епітелізації роблять нейротрофіни; фактор росту нервів (NGF), експресований кератиноцитами, сприяє реепітелізації шляхом стимуляції їхньої проліферації та захисту від апоптозу [66]. Ця цитопротекторна та стимулююча дія реалізується за аутокринним механізмом, в якому NGF, секретований самими кератиноцитами, активує відповідні рецептори на їхній власній поверхні для посилення регенеративного потенціалу [66].

Сигнали від активованого епідермісу ініціюють паралельні процеси в дермі, де основну функцію виконують фібробласти, які мігрують до ранового локусу, проліферують та синтезують компоненти ПКМ, формуючи таким чином основу для грануляційної тканини. Їхня проліферація та міграція опосередковуються PDGF, зокрема PDGF-BB як потужним мітогеном для фібробластів, та TGF- $\beta$ 1. У специфічному мікрооточенні рани фібробласти починають фенотипову трансформацію з активацією ранніх маркерів, таких як ED-A сплайс-варіант фібронектину, що готує основу для подальшої диференціації [67,68].

Формування повноцінної грануляційної тканини є метаболічно залежним процесом, що вимагає неоваскуляризації для забезпечення адекватного транспорту кисню та поживних речовин, а отже, ангиогенез є невід'ємним компонентом проліферативної фази [69,70]. Цей процес утворення нових судин модулюється цитокінами, що вивільняються, зокрема, макрофагами, серед яких провідну роль відіграють TGF- $\beta$ , FGF та судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF) [69,70]. PDGF-BB також демонструє проангіогенні властивості, стимулюючи ріст і міграцію ендотеліоцитів судин та сприяючи формуванню нових судинних відгалужень [71]. Регуляція ангиогенезу має і нейрогенний компонент: сенсорні нейрони через вивільнення кальцитонін-ген-зв'язаного пептиду (CGRP) здатні модулювати функції ендотеліоцитів, зокрема,

посилювати продукцію оксиду азоту (NO), що індукує вазодилатацію та покращує перфузію тканини [72].

Клітинний склад ранового локусу збагачується залученням стовбурових та малодиференційованих клітин, які забезпечують додатковий регенеративний потенціал [8]. Так, стовбурові клітини волосяного фолікула, що експресують CD34, слугують резервуаром для репопуляції епідермісу [73]. У процес загоєння активно залучаються і МСК, міграція яких до місця пошкодження стимулюється, серед іншого, PDGF, що вкотре підкреслює його центральну координуючу роль [74]. Дія МСК реалізується переважно через паракринні механізми; наприклад, мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку в умовах гіпоксії, характерної для ранового середовища, посилюють секрецію TGF- $\beta$ 1 через HIF-1 $\alpha$ -залежний шлях, що дозволяє їм дистанційно модулювати клітинні відповіді в оточуючих тканинах [75].

Динамічні взаємодії між різними типами клітин формують регуляторну мережу, що координує узгоджений перебіг репаративних процесів [8]. Так, кератиноцити, що експресують SOX2, здатні паракринно стимулювати ангиогенез, що підтверджується експериментальним підвищенням щільності CD31-позитивних судин [76]. Ця міжклітинна комунікація також проявляється у здатності МСК в умовах гіпоксії через секрецію TGF- $\beta$ 1 індукувати процес аутофагії в кератиноцитах [77]. Модулюючу роль у цій мережі відіграють і імунні клітини; розчинні медіатори, що вивільняються макрофагами, стимулюють як активність фібробластів, так і процеси неоваскуляризації, інтегруючи імунну відповідь з тканинною реконструкцією [78].

Синтез та реорганізація ПКМ є основою для формування механічно стабільної рубцевої тканини [79]. Активовані фібробласти під впливом PDGF та TGF- $\beta$ 1 продукують нові компоненти ПКМ, зокрема колаген III типу, що згодом заміщується на колаген I типу, та фібронектин, які формують грануляційну тканину [80,81]. Водночас відбувається керована деградація тимчасового матриксу, опосередкована матриксними металопротеїназами (ММП), які вивільняються фібробластами та макрофагами і забезпечують розщеплення

колагену [82]. TGF- $\beta$ 1 виконує подвійну регуляторну функцію в цьому процесі: стимулюючи синтез компонентів ПКМ, він одночасно інгібує продукцію ММП, що зміщує баланс у бік накопичення колагенових волокон та стабілізації новоутвореної тканини [80].

Феномен клітинної пластичності, яскравим прикладом якого є активація фібробластів, відіграє вирішальну роль у адаптації клітин до мінливих і стресових умов ранового середовища [83]. Важливим цитопротекторним механізмом, що забезпечує клітинний гомеостаз та функціональну активність у гіпоксичному та бідному на поживні речовини мікрооточенні, є аутофагія, яка підтримує виживання клітин та уможливорює їхню фенотипову пластичність [84]. У кератиноцитах цей процес може бути індукований через активацію Toll-подібних рецепторів (TLR2/6), що призводить до експресії білка p62 та формування аутофагосом [63]. Аутофагія може бути запущена і паракринними сигналами, як-от TGF- $\beta$ 1, що секретується гіпоксичними МСК, що демонструє інтеграцію метаболічних та сигнальних шляхів у регуляції долі клітини [77]. Ключовими молекулярними маркерами, що свідчать про активацію аутофагії, є конверсія білка LC3 та рекрутування Beclin-1 [85].

Процеси проліферативної фази перебувають під контролем багаторівневої системи регуляції, що включає як локальні, так і системні механізми [86]. Ця система поєднує швидкі, локалізовані ефекти нейропептидів, що вивільняються з периферичних нервових закінчень, із повільнішими, системними та часто антагоністичними впливами циркулюючих стероїдних гормонів. Сенсорна іннервація через вивільнення нейропептидів здатна безпосередньо впливати на клітинні процеси в рані [86]. Зокрема, субстанція P (SP) може посилювати синтез прозапальних цитокінів та TGF- $\alpha$  кератиноцитами, тоді як CGRP стимулює їхню проліферацію [56,87]. Системна гуморальна регуляція здійснюється стероїдними гормонами, які чинять протилежні ефекти: естрогени позитивно впливають на репарацію через активацію кератиноцитів, тоді як андрогени, навпаки, знижують міграційну здатність цих клітин, що може сповільнювати епітелізацію [88].

### 1.1.3 Фаза ремоделювання

Фаза ремоделювання ранового процесу розпочинається після завершення формування грануляційної тканини і характеризується поступовим закриттям рани, що призводить до зменшення її поверхні [89]. Центральною морфологічною та функціональною подією цього етапу є диференціація локальних дермальних фібробластів у міофібробласти, які забезпечують механічне стягування країв дефекту [67]. Міофібробласти є транзиторним клітинним типом, головним молекулярним маркером якого є  $\alpha$ -SMA. Міофібробласти мають властивість до скорочення [8,67,89,90]. Для формування фізіологічного, зрілого рубця необхідно щоб після завершення процесу загоєння та відновлення цілісності тканини ця клітинна популяція зазнала апоптозу [89-91]. Походження міофібробластів у рані є гетерогенним. Окрім локальних дермальних фібробластів, які вважаються їхнім основним джерелом, попередниками можуть слугувати й більш спеціалізовані популяції стромальних клітин [91]. До них належать фібробласти, асоційовані з волосяними фолікулами, зокрема клітини дермальної папіли та дермальної піхви, які володіють значним регенеративним потенціалом [89,90]. Крім того, у процес залучаються циркулюючі клітини-фіброцити, які мігрують із кровотоку в зону ушкодження, де вони набувають міофібробластичного фенотипу [89,90]. Регуляція активації стромальних клітин модулюється різноманітними сигнальними молекулами. Наприклад, IL-6, ключовий прозапальний цитокін, демонструє подвійну роль у фазі ремоделювання. Залежно від контексту та концентрації, він може як індукувати, так і пригнічувати експресію  $\alpha$ -SMA у фібробластах [90].

Функціональна активність міофібробластів жорстко контролюється молекулярними та механічними факторами мікрооточення [89-92]. Одним із найпотужніших індукторів диференціації фібробластів у міофібробласти є TGF- $\beta$ , що секретується у латентній формі та активується через взаємодію з клітинними інтегринами через RGD-послідовність. PDGF-BB доповнює регуляцію, посилюючи синтез колагену через фібробласти, надмірна експресія

якого асоційована з патологічними рубцями (гіпертрофічними та келоїдними) через неконтрольоване накопичення ПКМ [41]. Механічне напруження створює петлю позитивного зворотного зв'язку: підвищена жорсткість матриксу стимулює диференціацію та виживання міофібробластів за участю TGF- $\beta$ , підсилюючи контракцію та ущільнення рубцевої тканини [93].

Ремоделювання ПКМ є основою для формування механічно міцного рубця. Цей процес характеризується поступовим заміщенням колагену III типу на колаген I типу, що підвищує міцність загоєної шкіри до ~80% від інтактної. Динаміка синтезу та деградації ПКМ регулюється балансом між MMP та їхніми інгібіторами (TIMP). Порушення балансу з надлишком MMP (включаючи MMP-9) та дефіцитом TIMP характерне для хронічних ран, призводячи до деградації фібронектину та факторів росту [89,91].

На стадії ремоделювання щільна капілярна мережа регресує, формуючи аваскулярний рубець. Макрофаги сприяють кліренсу апоптотичних ендотеліоцитів. Перицити стабілізують судини, але можуть диференціюватись у міофібробласти, ілюструючи фенотипову пластичність строми [67,89].

Успішне ремоделювання створює умови для завершальної реепітелізації. Міграція кератиноцитів регулюється сигналами з дерми, включаючи TGF- $\beta$ 1, що індукує мікроРНК-21 для прискорення закриття дефекту (при фізіологічному рівні). Надмірна експресія мікроРНК-21 затримує загоєння в хронічних ранах [67].

Локальні процеси ремоделювання в рані інтегровані в системні регуляторні мережі, зокрема нейроендокринні та гуморальні. Одним із таких нейропептидів є CGRP, який чинить стимулюючий вплив на проліферацію дермальних клітин та синтез колагену. Значущість цього механізму підтверджується експериментальними даними: фармакологічне блокування рецепторів до CGRP або хімічна деплеція CGRP-позитивних нервових волокон за допомогою капсаїцину призводить до їх скорочення на 70–80%, суттєво уповільнює загоєння ран та пригнічує процеси неоваскуляризації [67].

## 1.2. Участь імунокомпетентних клітин в загоснні ран

### 1.2.1 Роль нейтрофілів в загоснні ран

Нейтрофіли представляють собою гетерогенну популяцію клітин вродженого імунітету, здатну адаптувати свої функції залежно від стану тканини та сигналів мікрооточення. Сучасні дані підтверджують їхню гетерогенність і наявність різних функціональних підтипів, які відрізняються морфологічними, транскрипційними та фенотиповими характеристиками [49-52]. Серед виділених підтипів виділяють нейтрофіли нормальної щільності (HDN), низької щільності (LDN), сенесцентні нейтрофіли, активовані та N1/N2 [49,51,52,94]. Класичними є нейтрофіли нормальної щільності, які циркулюють у периферичній крові та першими реагують на ушкодження тканин. Вони характеризуються сегментованим ядром із 2–5 частин, гранулярною цитоплазмою, що містить протеолітичні ферменти, та здатністю продукувати АФК. Ці нейтрофіли мігрують у зону ушкодження, здійснюють фагоцитоз мікроорганізмів і клітинного детриту, дегрануляцію та формування NETs, що забезпечує локальний захист від інфекції.[49]

Існує також популяція нейтрофілів низької щільності, яка формується у відповідь на запалення та включає як незрілі, так і фенотипово змінені зрілі клітини. Морфологічно LDN мають менш сегментоване ядро (часто бобоподібне або кільцеподібне), цитоплазма містить зменшену кількість специфічних гранул і збільшену кількість азурофільних гранул, що відображає їхній активний стан.[50,95,96]. Ці нейтрофіли беруть участь у регуляції запальної відповіді, пригніченні надмірної активації Т-лімфоцитів та модуляції активності макрофагів, що дозволяє координувати перехід від гострого запалення до фази регенерації.[49,50] LDN можуть продукувати низькі рівні АФК, виділяти ІЛ-10 та інші протизапальні цитокіни, а також формувати NETs у специфічних умовах [95].

Функціонально виділяють прозапальні нейтрофіли N1, які продукують ІЛ-6, ІЛ-15, TNF- $\alpha$  та АФК і домінують на ранніх етапах запалення. Вони мають

високополяризовану цитоплазму з великими азурофільними гранулами та сегментоване ядро. А також виділяють про-регенеративні нейтрофіли N2, які з'являються пізніше під впливом місцевих протизапальних факторів. Про-регенеративні нейтрофіли N2 відрізняються більш округлим або бобоподібним ядром та менш щільною гранулярною цитоплазмою, що відображає їхню менш агресивну, регуляторну функцію. Вони продукують аргіназу-1, IL-10, VEGF та TGF- $\beta$ , сприяючи ангиогенезу, проліферації фібробластів і поляризації макрофагів з прозапального M1 на репаративний M2 [49,52,97]. Вони також виділяють протеолітичні ферменти, включаючи еластазу, катепсин G та MMP-8 і MMP-9, забезпечуючи очищення рани від мікробів і некротичних тканин [49,51,52]. Окрім цих основних фенотипів, існують також сенесцентні нейтрофіли, які після виконання захисної функції здатні повернутися у кровотік або кістковий мозок, впливаючи на дозрівання нових нейтрофілів і підтримуючи їхню гіперреактивність. Морфологічно вони схожі на HDN, але часто мають ознаки старіння: більш конденсоване ядро, зменшену гранулярність і змінений профіль поверхневих маркерів [49,51,98]. Додатково виділяють нейтрофіли з експресією поверхневих маркерів CD177 та OLFM4, які специфічно продукують NETs, а також субпопуляції, здатні взаємодіяти з T-клітинами через T-клітинні рецептори  $\alpha\beta$ , що впливає на секрецію IL-8 і захист від апоптозу. [49,50]

У процесі загоєння різаних ран нейтрофіли є першими клітинами, які реагують на ушкодження, забезпечуючи фагоцитоз патогенів і некротичних тканин, дегрануляцію та утворення NETs.

На початковій фазі запалення HDN та прозапальні N1-нейтрофіли швидко мігрують у пошкоджену ділянку під впливом хемокінів та сигналів від ушкоджених клітин [49-51]. Ці клітини забезпечують фагоцитоз патогенів і некротичних залишків, дегрануляцію з викидом протеолітичних ферментів (еластаза, катепсин G, матриксні металопротеїнази MMP-8 та MMP-9) та активне утворення NETs, які утримують мікроорганізми в зоні рани, обмежуючи поширення інфекції [49,51,52].

Одночасно LDN на ранній фазі регулюють активність імунної системи: вони пригнічують надмірну активацію Т-лімфоцитів, виділяють протизапальні цитокіни та модулюють активність макрофагів, що дозволяє запобігти надмірному ушкодженню тканин [50,95,96]. Взаємодія LDN із макрофагами сприяє формуванню більш контрольованого прозапального середовища, що зменшує ризик хронізації запалення.

На фазі регенерації відбувається фенотипова пластичність нейтрофілів. Частина N1-нейтрофілів змінює свій профіль на про-регенеративний N2, який продукує аргіназу-1, IL-10, VEGF та TGF- $\beta$ , стимулюючи ангіогенез, проліферацію фібробластів і поляризацію макрофагів із прозапального M1 на репаративний M2 [49,52,97].

Водночас активаційно-модифіковані нейтрофіли залишають ушкоджену тканину та повертаються у кровотік або кістковий мозок, де вони впливають на дозрівання нових нейтрофілів, підтримуючи їхню гіперреактивність і готовність до ефективною відповіді при повторних ушкодженнях [49,51,98].

LDN у фазі регенерації продовжують регулювати запалення, забезпечуючи координацію між різними імунними клітинами. Вони сприяють ремоделюванню тканин і зменшенню ушкоджувальної активності прозапальних нейтрофілів [95,96]. N2-нейтрофіли та субпопуляції з експресією CD177 та OLFM4 підтримують ангіогенез та стабілізацію матриксу шляхом виділення VEGF і TGF- $\beta$ , а також сприяють елімінації надлишкових АФК, що забезпечує захист від оксидативного стресу [49,50,95].

На фазі епітелізації нейтрофіли забезпечують регуляцію остаточного загоєння. Тут N2-нейтрофіли й активаційно-модифіковані підтипи сприяють стимуляції кератиноцитів, координації проліферації фібробластів та формуванню нових судинних мереж [49,52,97,99]. NETs на цьому етапі менш агресивні, але зберігають сигнальні функції для підтримки ангіогенезу та активації антигенпрезентуючих клітин, а також взаємодії з Т- та В-лімфоцитами, що забезпечує баланс між вродженим і адаптивним імунітетом [49,50,52,95,100].

Таким чином, нейтрофіли різних підтипів демонструють фазо-залежну активність: HDN та N1 домінують на ранній фазі запалення для очищення рани і контролю інфекції, LDN і N2 беруть активну участь у переході до регенерації, а активаційно-модифіковані нейтрофіли підтримують дозрівання нових клітин і координують завершальні етапи загоєння [49-52,94].

### **1.2.2 Роль макрофагів в загоєнні ран**

Макрофаги як антиген-презентуючі клітини імунної системи, координують процеси загоєння ран, взаємодіючи з іншими клітинами тканин та модулюючи запальні й репаративні відповіді [101,102]. У нормальному загоєнні ран макрофаги демонструють високу гетерогенність та пластичність, що дозволяє їм адаптувати свою функцію залежно від стадії рани та мікрооточення [103,104]. Сучасні дослідження виділяють основні підтипи макрофагів: класично активовані макрофаги M1, альтернативно активовані макрофаги M2 та спеціалізовані макрофаги, які відповідають за ефероцитоз апоптотичних клітин та сприяють завершенню запалення й репарації [105].

Макрофаги M1 проявляють прозапальний фенотип, продукують високі рівні цитокінів TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  та IL-6 та активно фагоцитують патогени на ранніх етапах загоєння [101,102]. Вони швидко реагують на PAMP/DAMP-сигнали та ініціюють хемотаксис інших імунних клітин. M2 макрофаги, навпаки, мають протизапальну та репаративну функцію, індукуються цитокінами Th2, такими як IL-4 та IL-13, та продукують аргіназу-1 та RELM $\alpha$ , що сприяє ремоделюванню матриксу і диференціації фібробластів у міофібробласти [101,102]. Різниця між субпопуляціями M2 полягає в локалізації та швидкості активації: резидентні макрофаги швидко активуються, підтримують стійку репаративну функцію, тоді як рекрутовані з крові — більш пластичні та можуть адаптуватися до змін у мікросередовищі [102,105]. Спеціалізовані макрофаги активуються на етапі переходу від запалення до регенерації, ефективно видаляють апоптотичні

клітини та підтримують сприятливе середовище для проліферації та ремоделювання [101,105].

Різні тканини містять як резидентні макрофаги, так і макрофаги, що рекрутуються з моноцитів крові. Резидентні макрофаги є довгоживучими, здатні до самопоновлення та швидко реагують на пошкодження, тоді як моноцитарні макрофаги з крові беруть участь переважно у фазі проліферації та ремоделювання [103,104].

На гістологічних препаратах макрофаги можна відрізнити за формою клітин, наявністю фагоцитарних вакуолей і маркерів. Макрофаги M1 зазвичай круглі або плоскі, з великими вакуолями, експресують iNOS та CD86, і переважають на ранніх стадіях гострого запалення, коли необхідне швидке видалення патогенів та некротичних клітин [101,102].

Макрофаги M2 мають подовжену форму, щільну цитоплазму та експресують CD206, Arg1 і RELM $\alpha$ . Вони локалізуються в зоні проліферації та ранньої стадії ремоделювання, контактують з фібробластами та ендотеліальними клітинами, стимулюючи синтез колагену та ангиогенез [101,102,105]. Субпопуляції M2 різняться за активністю: подвійно позитивні Arg1+/Retnla+ здатні інтенсивніше стимулювати ремоделювання ПКМ, тоді як однопозитивні виконують більш локалізовані функції [102,105].

Разрешальні макрофаги гістологічно великі, містять фрагменти поглинених апоптотичних тіл, експресують Axl і Mertk, продукують IL-10 та TGF- $\beta$ . Вони з'являються у фазі переходу від запалення до регенерації, забезпечуючи ефективне очищення тканин та підготовку до стабільного ремоделювання [101,105].

На етапі гострого запалення домінують M1 макрофаги, які фагоцитують бактерії і некротичні тканини, продукують прозапальні цитокіни та хемокіни, залучаючи додаткові імунні клітини [101,102]. M1 мають короткий термін життя, швидко реагують на пошкодження та сигнали патогенів [102].

У фазі проліферації поступово зменшується кількість M1, активуються M2, які продукують цитокіни Th2 і стимулюють проліферацію фібробластів, ангиогенез і синтез ПКМ [101,102,105].

Резидентні M2 швидко реагують на локальні сигнали та забезпечують стабільну репаративну функцію, тоді як рекрутовані M2 більш адаптивні та модифікують свій фенотип залежно від мікросередовища [103,104].

У фазі ремоделювання M2 та спеціалізовані макрофаги підтримують ремоделювання тканин, зменшують запалення, активують міофібробласти та стабілізують матрикс [101,102,105]. Синергія цитокінів Th2 та ефероцитоз апоптотичних клітин забезпечує завершення відновлення, а механічні сигнали ПКМ підтримують форму M2 і активацію репаративних генів [102,105].

Таким чином, макрофаги діють послідовно та взаємодіють між собою: M1 забезпечують ініціацію запалення та очистку рани, M2 стимулюють відновлення тканин, а спеціалізовані макрофаги завершують фазу очищення, готуючи тканини до стабільного ремоделювання [101-105].

### **1.2.3 Роль мастоцитів в загоєнні ран**

Мастоцити є вродженими імунними клітинами мезенхімального походження, які постійно присутні в шкірі і швидко реагують на ушкодження. У процесі загоєння ран вони демонструють виражену гетерогенність, що зумовлено як їхнім тканинним походженням, так і функціональною пластичністю у відповідь на зміну мікрооточення рани [106,107]. Сучасна класифікація мастоцитів у контексті репарації базується не лише на класичних гістохімічних критеріях, але й на функціональних характеристиках, профілі медіаторів та часовій участі в різних фазах репаративного процесу [13,108].

Найбільш поширеним підходом є поділ мастоцитів на дві основні популяції залежно від їх локалізації та ферментного складу гранул: сполучнотканинні мастоцити та мукозальні мастоцити. У шкірі, яка є основною тканиною при дослідженні загоєння ран, переважають сполучнотканинні

мастоцити, що характеризуються високим вмістом триптази, хімази, карбоксипептидази А3 та гепарину [106,109]. Саме ця популяція відіграє провідну роль у регуляції судинної проникності, активації ендотелію та рекрутуванні інших імунних клітин у зоні ушкодження [107].

Поряд із класичним морфологічним поділом у сучасних роботах усе частіше застосовується функціональна класифікація мастоцитів відповідно до фаз загоєння ран. У цьому контексті виділяють мастоцити з переважно прозапальним фенотипом, які активуються на ранніх етапах після ушкодження, та мастоцити з регуляторно-репаративними властивостями, активні на пізніших стадіях [108,110]. Прозапально орієнтовані мастоцити характеризуються швидкою дегрануляцією та вивільненням гістаміну, протеаз і факторів активації комплементу, що сприяє ініціації запалення та притоку нейтрофілів і моноцитів у рану [13,106].

На відміну від них, мастоцити з репаративним фенотипом демонструють змінений профіль секреції, з підвищеним синтезом факторів росту, зокрема TGF- $\beta$ , VEGF та PDGF, а також протизапальних цитокінів, які підтримують проліферацію фібробластів, ангіогенез і ремоделювання позаклітинного матриксу [109,111]. Важливо, що ці фенотипи не є жорстко фіксованими, а формуються динамічно залежно від сигналів мікрооточення, включно з цитокінами, механічними властивостями матриксу та взаємодією з іншими імунними клітинами [107,112].

Окрему увагу в сучасних дослідженнях приділяють концепції фенотипової пластичності мастоцитів, згідно з якою одна й та сама клітина може змінювати свій функціональний профіль у межах однієї рани. Такі мастоцити здатні переходити від ранньої прозапальної активності до участі в регуляції завершення запалення та підтримці репаративних процесів без необхідності рекрутування нових клітин із крові [108,110,113]. Це відрізняє мастоцити від багатьох інших імунних клітин і підкреслює їхню унікальну роль як модуляторів фаз загоєння ран.

У шкірі мастоцити локалізуються переважно в дермі, концентруючись навколо кровоносних судин, нервових волокон та волосяних фолікулів, що визначає їхню здатність швидко реагувати на ушкодження та модулювати судинні й запальні реакції [106,107]. У нормальних умовах ці клітини мають округлу або овальну форму, чітко окреслену мембрану та цитоплазму, заповнену численними електронно-щільними гранулами, багатими на біологічно активні медіатори [108,109].

На ранніх етапах загоєння, а саме фазі гострого запалення, гістологічно спостерігається активація та дегрануляція мастоцитів у зоні ушкодження. Дегранульовані мастоцити характеризуються зменшенням кількості щільних гранул, появою вакуолей у цитоплазмі та нерівномірним розподілом секреторних включень [13,106]. Такий морфологічний стан відображає масивне вивільнення гістаміну, серинових протеаз, факторів активації ендотелію та медіаторів запалення, що забезпечує підвищення судинної проникності, набряк тканин і рекрутинг нейтрофілів та моноцитів [107].

У фазі запалення мастоцити часто локалізуються безпосередньо поблизу пошкоджених судин і в зоні міжклітинного матриксу, який зазнає деградації. Це супроводжується тісним контактом мастоцитів з ендотеліальними клітинами та компонентами ПКМ, зокрема колагеновими волокнами, що піддаються протеолітичному ремоделюванню [108,110]. Така просторова організація дозволяє мастоцитам ефективно впливати на міграцію інших імунних клітин і формування запального мікрооточення рани.

Під час переходу до фази проліферації фенотип мастоцитів змінюється. Кількість повністю дегранульованих клітин зменшується, натомість з'являються клітини з частково збереженими гранулами та ознаками відновлення секреторного апарату [109,111]. У цей період мастоцити демонструють подовжену або веретеноподібну форму, що відображає їхню адаптацію до зміненої архітекtonіки тканини та зростаючої щільності клітин проліферативної зони [107,112]. Їх локалізація зміщується ближче до ділянок активного ангиогенезу та скупчень фібробластів.

У фазі проліферації мастоцити часто виявляються в безпосередньому контакті з новоутвореними капілярами, що корелює з їх здатністю продукувати ангіогенні фактори та регулювати стабілізацію судинної мережі [107,109]. Збереження гранулярного апарату в цей період дозволяє клітинам здійснювати контрольовану, а не масивну секрецію медіаторів, що сприяє підтримці репаративних процесів без надмірної запальної реакції [110,113].

У фазі ремоделювання мастоцити представлені меншою кількістю активованих форм, однак вони зберігають стратегічну локалізацію в ділянках перебудови ПКМ. Їх цитоплазма містить помірну кількість гранул, а клітини набувають більш спокійного морфологічного вигляду, що відповідає регуляторній ролі на цьому етапі [106,111]. У цей період мастоцити беруть участь у контролі активності фібробластів і міофібробластів, а також у балансі між синтезом і деградацією колагену.

Мастоцити є гетерогенними за фенотипом, що визначає їх фазоспецифічну роль у загоєнні ран. Відомо, що існують як класично активовані мастоцити (МСТ, багаті на триптазу), так і МСТС, багаті на хімази та триптазу, що визначає їх здатність продукувати різні набори медіаторів і протеаз [106,107]. На етапі запалення основну роль відіграють клітини з високим вмістом гістаміну та протеаз — вони швидко дегранулюють і забезпечують рекрутинг нейтрофілів, підвищення судинної проникності та локальну імунну активацію [13,108]. Вони формують мікросередовище, сприятливе для швидкого видалення ушкоджених клітин і патогенів.

На фазі проліферації переважають мастоцити, які здатні частково зберігати гранули і регулювати секрецію медіаторів у помірному режимі. Їх основна функція полягає у підтримці ангіогенезу та стимуляції фібробластів. Через контакт із новоутвореними капілярами та фібробластами ці клітини виділяють фактори росту, такі як VEGF та FGF, а також цитокіни, що модулюють проліферативну активність інших клітин [107,109]. Морфологічно такі клітини часто мають подовжену форму та локалізуються поблизу судин, що оптимізує їх вплив на ангіогенез та позаклітинний матрикс [110,111].

У фазі ремоделювання та зрілого рубцювання мастоцити демонструють більш спокійний фенотип, з частково збереженими гранулами та мінімальною секрецією медіаторів. Вони беруть участь у регуляції балансу між синтезом і деградацією колагену, впливають на міофібробласти та стабілізують судинну мережу [106,112,113]. Такий фенотип дозволяє запобігати хронічному запаленню і формує оптимальну структуру рубцевої тканини.

Таким чином, функціональна гетерогенність мастоцитів є основним механізмом їх участі у загоєнні ран. Перехід від класично активованих фенотипів на ранніх етапах до регуляторних форм у фазі ремоделювання забезпечує контрольовану координацію запальних та репаративних процесів. Цей фазоспецифічний фенотиповий спектр дозволяє мастоцитам виконувати регуляторну роль в тканинній репарації, поєднуючи активацію імунної відповіді та підтримку структурної реконструкції [106-113].

#### **1.2.4 Роль лімфоцитів в загоєнні ран**

Лімфоцити є клітинами адаптивної ланки імунної системи, що беруть участь не лише в антиген-специфічному захисті, але й у регуляції репаративних процесів у тканинах, зокрема у шкірі. У процесі загоєння ран лімфоцити представлені кількома функціонально та фенотипово відмінними групами, кожна з яких залучається до різних фаз регенерації [11,114,115]. У контексті шкірних ран доцільно виділяти три основні групи лімфоцитів: Т-лімфоцити, В-лімфоцити та вроджені лімфоїдні клітини.

Т-лімфоцити є найбільш дослідженою групою в контексті загоєння ран. Залежно від типу Т-клітинного рецептора їх поділяють на  $\alpha\beta$ -Т-клітини та  $\gamma\delta$ -Т-клітини.  $\alpha\beta$ -Т-клітини включають  $CD4^+$  Т-хелпери,  $CD8^+$  цитотоксичні Т-клітини, а також регуляторні Т-клітини (Treg), що експресують FOXP3 [114,115]. Окрему групу становлять нетрадиційні  $\alpha\beta$ -Т-клітини, зокрема інваріантні НКТ-клітини та МАІТ-клітини, які поєднують риси адаптивного й вродженого імунітету та реагують на ліпідні або метаболітні антигени [114].

$\gamma\delta$ -Т-клітини представлені специфічними субпопуляціями, що локалізуються переважно у шкірі. В епідермісі мишей домінують дендритні епідермальні  $\gamma\delta$ -Т-клітини, тоді як у дермі присутні фенотипово відмінні  $\gamma\delta$ -популяції, що виконують як про-, так і антизаживлювальні функції [11,114,115].

В-лімфоцити традиційно асоціюються з гуморальним імунітетом, проте сучасні дані свідчать про їхню активну участь у загоєнні шкірних ран. У шкірі виявляються як наївні, так і активовані В-клітини, а також регуляторні В-лімфоцити, здатні модулювати запальну відповідь та впливати на активність макрофагів і фібробластів [11,116].

До третьої групи належать вроджені лімфоїдні клітини, які не мають антиген-специфічних рецепторів, але швидко реагують на сигнали пошкодження тканин. Серед них у загоєнні ран найбільше значення мають НК-клітини, ILC2 та ILC3, кожна з яких активується на різних етапах регенерації [11,112].

Гістологічна характеристика лімфоцитів у рані ґрунтується на їхній локалізації, морфології, щільності інфільтрації та фенотиповій експресії маркерів, що відображає функціональний стан клітин [11,114]. У ранній запальній фазі більшість лімфоцитів локалізується у дермі, переважно в периваскулярних зонах та на межі з ушкодженими структурами.

$\alpha\beta$ -Т-клітини у фазі запалення зазвичай мають округлу форму, щільне ядро з вузьким обідком цитоплазми та обмежену рухливість у тканині.  $CD8^+$  Т-клітини часто локалізуються поблизу зон клітинного детриту, що відповідає їхній цитотоксичній функції, тоді як  $CD4^+$  Т-клітини розташовуються дифузніше та контактують з антигенпрезентуючими клітинами [114,115]. Трег-клітини з'являються пізніше та гістологічно асоціюються з ділянками згасаючого запалення, що відображає їхню імуномодулюючу роль [114].

$\gamma\delta$ -Т-клітини епідермісу мають дендритоподібну у спокійному стані, однак після ушкодження вони швидко змінюють форму, набуваючи округлого вигляду та втрачаючи дендритні відростки. Така морфологічна перебудова пов'язана з активацією клітин та їх здатністю до продукції факторів росту, що стимулюють проліферацію кератиноцитів [11,114,115]. Дермальні  $\gamma\delta$ -Т-клітини, навпаки,

демонструють більшу морфологічну різноманітність, що відповідає їхній функціональній гетерогенності.

В-лімфоцити гістологічно виявляються у дермі у вигляді невеликих округлих клітин з інтенсивно забарвленим ядром. У фазі проліферації їх кількість зростає, особливо поблизу зон активного фібробластичного ремоделювання, що свідчить про їхню участь у регуляції матриксного синтезу [11,116]. При цьому В-клітини не формують класичних лімфоїдних агрегатів, а розподіляються дифузно.

Вроджені лімфоїдні клітини мають менш виражені морфологічні маркери, однак НК-клітини можна ідентифікувати за більшими розмірами та наявністю гранул у цитоплазмі. У фазі запалення вони локалізуються поблизу судин та зон мікробної контамінації, тоді як ILC2 і ILC3 з'являються переважно у фазі проліферації, асоціюючись з епітеліальними та стромальними клітинами [11,112].

Функціональна активність лімфоцитів у загоєнні ран є фазозалежною та визначається балансом між про- та протизапальними сигналами. У фазі гострого запалення домінують CD8<sup>+</sup> Т-клітини, НК-клітини та частина  $\gamma\delta$ -Т-клітин, які сприяють елімінації ушкоджених і потенційно інфікованих клітин, а також формуванню первинної імунної відповіді [112,114,115]. Разом з тим надмірна активність цих клітин може призводити до посилення тканинного ушкодження.

У перехідній фазі ключову роль відіграють CD4<sup>+</sup> Т-клітини та регуляторні Т-клітини, які модулюють активність макрофагів, зменшують рівень запалення та сприяють переходу до проліферативної фази [11,114]. Виснаження Treg призводить до затримки загоєння та надмірної інфільтрації імунних клітин, що підкреслює їхню роль у контролі імунної відповіді.

$\gamma\delta$ -Т-клітини епідермісу виконують унікальну функцію, стимулюючи проліферацію та міграцію кератиноцитів шляхом секреції факторів росту та цитокінів. Вони є особливо важливими для реепітелізації та раннього відновлення бар'єрної функції шкіри [11,114,115]. У той самий час окремі

дермальні  $\gamma\delta$ -популяції можуть чинити протилежний ефект, гальмуючи загоєння, що свідчить про складну внутрішню регуляцію цієї групи клітин.

В-лімфоцити сприяють загоєнню ран шляхом регуляції запальної відповіді та опосередкованого впливу на фібробласти й ангіогенез. Підвищення їхньої активності асоціюється з прискореним закриттям ран і покращеним формуванням матриксу, тоді як їх дефіцит супроводжується затримкою регенерації [11,116].

Вроджені лімфоїдні клітини виконують допоміжну, але важливу роль. НК-клітини, хоча й беруть участь у захисті від інфекцій, у стерильних умовах можуть уповільнювати загоєння. Натомість ILC2 та ILC3 сприяють проліферації клітин, рекрутуванню макрофагів та ангіогенезу, що робить їх значущими для ефективного відновлення тканин [11,112].

### **1.3. Вплив стресового фактору на перебіг ранового процесу**

Системна фізіологічна відповідь на хронічний стрес характеризується персистуючою дисрегуляцією гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової (ГГН) осі, що є центральним механізмом порушення гомеостазу [16,117]. Тривала активація цієї осі призводить до стійкого підвищення рівня ключових медіаторів стресу, зокрема кортикотропін-рилізинг-гормону (КТРГ), адренкортикотропного гормону (АКТГ) та кортизолу, що руйнує нормальні фізіологічні механізми негативного зворотного зв'язку [117,118]. Наслідком цього нейроендокринного зсуву є розвиток стану глюкокортикоїдної резистентності, за якого парадоксальним чином знижується протизапальна функція кортизолу, водночас посилюються інші метаболічні порушення [119]. Цей системний дисбаланс має глибокі імунологічні наслідки; зокрема, під хронічним впливом ГК та катехоламіни зміщують баланс Т-хелперів у бік Th2-опосередкованого гуморального імунітету [120,121]. Такий зсув пригнічує Th1-залежні клітинні імунні реакції, які є необхідними для ефективною елімінації патогенів та адекватної репарації тканин, що встановлює прямий причинно-

наслідковий зв'язок між системними нейроендокринними змінами та подальшим порушенням локального імунного середовища в ділянці пошкодження [16,122].

Шкіра є не лише пасивним органом-мішенню для системних медіаторів стресу, але й має власний периферійний еквівалент ГГН-осі, що дозволяє їй автономно реагувати на стресорні впливи та, що більш важливо, локально регулювати системну стресову відповідь [120,121]. Клітини шкіри, включно з кератиноцитами та фібробластами, здатні локально синтезувати та секретувати стресові гормони й експресувати відповідні до них рецептори [123,124]. Зокрема, ці клітини продукують сигнальні пептиди, ідентичні до гіпоталамічних та гіпофізарних, і експресують рецептори до них, такі як рецептор до КТРГ першого типу (CRH-R1), та меланокортинові рецептори до продуктів деградації проопіомеланокортину (ПОМК), як-от АКТГ [120,123,124]. Активація CRH-R1 у кератиноцитах та фібробластах стимулює експресію гену ПОМК з подальшою секрецією АКТГ та кортикостероїдів, що замикає локальну стрес-регуляторну петлю [120]. Ця автономна система, що функціонує як локальна вісь КТРГ-ПОМК-АКТГ-кортикостероїди, дозволяє шкірі ініціювати локальну відповідь, безпосередньо впливаючи на процеси запалення, клітинної проліферації та функціональної активності імунних клітин у мікрооточенні рани, створюючи порочне коло, яке модулює функцію резидентних мастоцитів [123].

Мастоцити, розташовані поблизу кровоносних судин та нервових закінчень, функціонують як первинні сенсори та ефектори в мікросередовищі рани [107,125]. Їхня роль є критичною на початковій, запальній фазі ранового процесу, коли у відповідь на пошкодження відбувається їхня швидка дегрануляція з вивільненням потужного арсеналу преформованих медіаторів, що включає гістамін, триптазу, хімазу та прозапальні цитокіни, такі як фактор некрозу пухлин альфа (TNF- $\alpha$ ) [126]. Гострий стрес, опосередкований КТРГ, викликає значну дегрануляцію тучних клітин, що призводить до підвищення судинної проникності та ініціює запальну відповідь [36,127]. Натомість хронічний стрес змінює популяційний склад та реактивність цих клітин, що призводить до дисрегуляції початкового запального каскаду та подальшого

ангіогенезу [127]. Медіатори, що вивільняються мастоцитами, безпосередньо впливають на репаративні процеси: триптаза стимулює проліферацію ендотеліальних клітин, тоді як інші фактори активують фібробласти, пов'язуючи функцію мастоцитів як з неоваскуляризацією, так і з ремоделюванням позаклітинного матриксу [128,129]. Таким чином, індукована стресом дисрегуляція активності мастоцитів, зокрема змінена судинна проникність та порушені хемокінові градієнти, порушує тонко скоординований запуск процесу загоєння та створює неоптимальне середовище для подальшої інфільтрації лейкоцитів, закладаючи основу для дисфункції нейтрофілів та макрофагів [110].

Нейтрофіли, як перша хвиля інфільтруючих лейкоцитів, є необхідними для антимікробного захисту шляхом вивільнення протеаз та активних форм кисню [130,131]. Хоча належне функціонування нейтрофілів є необхідним для очищення рани від детриту, хронічний стрес викликає дисрегуляцію запальної фази в цілому, порушуючи фагоцитарну функцію нейтрофілів і тим самим підвищуючи ризик інфекції [20,132]. Центральними ж регуляторами процесу загоєння виступають макрофаги, що характеризуються високою фенотиповою пластичністю, зокрема здатністю до поляризації від прозапального фенотипу M1 до прорепаративного M2 [101,133]. Цей перехід від M1 до M2, який є необхідним для завершення запальної фази та початку проліферації, індукується фагоцитозом апоптичних нейтрофілів [134,135]. Наявні дані переконливо свідчать, що хронічний стрес є фактором, який порушує цю фенотипову поляризацію [121]. Механістично, стійкий помірний рівень TNF- $\alpha$ , характерний для хронічного запалення, сприяє виживанню нейтрофілів, а не їх апоптозу, усуваючи таким чином основний тригер для переключення макрофагів на фенотип M2 [134]. Це призводить до того, що макрофаги залишаються у прозапальному M1-стані та продовжують секретувати цитокіни, такі як TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  та IL-6, що підтримує хронічне запалення, яке є визначальною характеристикою ран, що не загоюються [121,136]. Це порушення резолюції запалення створює мікросередовище, яке безпосередньо пригнічує активність

стромальних клітин і перешкоджає нормальному розвитку наступної фази - проліферативної [112,136].

Хронічний стрес також суттєво впливає на внесок адаптивної імунної системи у загоєння ран, змінюючи динаміку лімфоцитарних популяцій [122,137]. Експериментальні дані свідчать про те, що тривалий стрес пригнічує загальну проліферацію лімфоцитів [120,138]. Ці локальні зміни є віддзеркаленням системного, глюкокортикоїд-опосередкованого зсуву в бік домінантної Th2-відповіді, що компрометує клітинно-опосередкований імунітет (Th1), необхідний для ефективного та контрольованого репаративного процесу [16,120]. Таке порушення веде до менш ефективного імунного нагляду та модуляції процесів у рановому ложі, створюючи дисрегульоване імунне середовище, яке не здатне адекватно підтримувати перехід до регенерації тканин [121,122].

Пролонговане запальне середовище, регульоване M1-макрофагами в умовах хронічного стресу, руйнівню впливає на функцію стромальних клітин, [101]. Фібробласти, відповідальні за синтез та ремоделювання позаклітинного матриксу, зокрема колагену, що забезпечує структурну цілісність новоутвореної тканини, демонструють знижену активність [117]. Персистуючий прозапальний цитокіновий фон, багатий на TNF- $\alpha$  та IL-1 $\beta$ , разом із пригніченими рівнями факторів росту, таких як PDGF та FGF, інгібує проліферацію, міграцію та секреторну активність фібробластів, що призводить до недостатнього формування грануляційної тканини [121]. Крім того, стрес може знижувати активність матриксних металопротеїназ (ММП), які необхідні для деградації позаклітинного матриксу та забезпечення міграції клітин, що додатково уповільнює процес репарації [118].

На молекулярному рівні хронічний стрес сприяє формуванню проапоптичного середовища в рані, що призводить до надмірної загибелі клітин і вносить свій внесок у загальну затримку загоєння [139]. Водночас порушується аутофагія — фундаментальний клітинний процес, відповідальний за підтримку гомеостазу та рециклінг пошкоджених органел [140,141]. Аутофагія відіграє

складну, контекстно-залежну роль у загоєнні: хоча вона може бути захисним механізмом, що сприяє, наприклад, міграції кератиноцитів, її дисрегуляція тісно пов'язана з патофізіологією хронічних ран [140,142]. Експериментальні дані свідчать, що як посилення, так і пригнічення аутофагії може мати різноспрямовані ефекти, вказуючи, що ведучою патологією є саме дисрегуляція аутофагічного потоку, а не його проста наявність чи відсутність [140,141]. В умовах стресу та в моделях хронічних ран спостерігається зміна експресії ключових маркерів аутофагії, таких як LC3, Beclin-1 та адаптерного білка p62/SQSTM1 [143]. Це свідчить про порушення нормального аутофагічного потоку, що негативно впливає на такі клітинні функції, як проліферація та міграція, і є однією з ключових ланок у патогенезі стрес-індукованого порушення регенерації тканин [144].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Експериментальні тварини

Дослідження було проведено на 180 самцях щурів лінії Wistar віком 12–13 місяців та масою 210–230 г. Тварин отримано з розплідника Асоціації ветеринарної медицини, ТОВ «Біомодельсервіс» (м. Київ, Україна). Перед початком експерименту кожного щура оглянув кваліфікований ветеринар для оцінки загального стану здоров'я. Після цього тварин витримували у 10-денному карантині.

Утримання щурів здійснювали в полікарбонатних клітках розміром 550 × 320 × 180 мм, накритих оцинкованими сталевими кришками (660 × 370 × 140 мм) та обладнаних скляними поїлками. У кожній клітці розміщували не більше п'яти тварин. Кожна клітка мала індивідуальний ідентифікаційний номер і була встановлена на відповідному стелажі.

Мікроклімат у приміщенні для утримання тварин підтримували в таких межах: температура 20–24°C, відносна вологість 30–70%, світловий режим — 12 годин світла та 12 годин темряви. Щури мали необмежений доступ до стандартного лабораторного корму виробництва «Фенікс» (Україна) та питної води, що надходила з міського водопостачання після обробки методом зворотного осмосу та УФ-стерилізації. Як підстилковий матеріал використовували автоклавовану стружку вільхи чорної (*Alnus glutinosa*).

Після створення експериментальних ран всіх тварин утримували індивідуально до повного відновлення цілісності шкірного покриву.

Усі процедури за участю тварин виконували відповідно до «Міжнародних рекомендацій з біомедичних досліджень за участю тварин», а також у суворій відповідності до чинних нормативних документів України: «Правил проведення робіт із використанням експериментальних тварин» (Наказ МОЗ України № 753

від 12.08.1997), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986), Наказу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 «Про заходи щодо подальшого вдосконалення організаційних норм роботи з експериментальними тваринами», а також Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006, зі змінами від 09.12.2015).

## **2.2 Експериментальна модель хронічного соціального стресу**

Хронічний соціальний стрес (ХСС) індукували в експериментальній групі тварин, попередньо відібраних за високою чутливістю до стресу на підставі поведінкових показників у тесті «відкрите поле» (підвищена іммобільність, знижена дослідницька активність). До цієї групи увійшло 60 самців щурів (по 10 тварин на кожну часову точку оцінки загоєння ран та 10 тварин для оцінки стану серотонінової системи).

Для моделювання ХСС застосовували валідований протокол, що поєднує соціальну ізоляцію та безперервний психоемоційний стрес упродовж 21 доби [145]. Кожного щура утримували індивідуально, що виключало будь-який соціальний контакт (соціальна депривація), одночасно забезпечуючи постійний вплив загрозливого соціального середовища. Зокрема, чотирьох агресивних одновидових особин — відібраних за високими індексами агресивності в тесті «відкрите поле» — розміщували в прилеглих прозорих клітках (по одній з кожного боку від ізольованої тварини). Таке розміщення забезпечувало візуальний, слуховий і нюховий контакт без можливості фізичної взаємодії, що створювало для щура постійний соціальний тиск і відчуття загрози без ризику прямої травматизації.

Кожні 3–4 дні агресорів змінювали, щоб запобігти звиканню та підтримувати непередбачуваність і психологічну напругу. Експеримент проводили за умов стандартного лабораторного утримання. Група агресорів складалася з домінантних дорослих самців, попередньо відібраних за стабільно

високим рівнем агресивної поведінки у повторних тестах соціальної взаємодії. Цих тварин утримували індивідуально щонайменше два тижні до початку експерименту для формування територіальної домінантності. Агресори не піддавалися жодним стресовим впливам та не включалися до подальших поведінкових чи біохімічних аналізів.

Застосований протокол ґрунтується на раніше описаних і адаптованих парадигмах ХСС, які достовірно викликають депресивноподібні стани та сповільнення загоєння ран у гризунів [146-152].

Наявність стресу підтверджували тестом «відкрите поле». На підставі результатів тесту «Відкрите поле» до групи агресорів було віднесено 65 самців, які демонстрували підвищені показники агресивності. Агресори не піддавалися стресу самі і не включалися у подальші дослідження.

Для реалізації завдань дослідження та об'єктивізації отриманих даних, дизайн експерименту передбачав розподіл тварин на контрольну та експериментальну групи за результатами тесту «Відкрите поле»:

- контрольна група (n=45, щури, не схильні до стресу) – тварини, яким моделювали повношарову різану рану шкіри без впливу хронічної соціально-конфліктної ситуації. Дана група слугувала базовим еталоном нормального перебігу репаративної регенерації, що збігається з численними даними літератури [146-152]. Наявність цієї групи дозволила врахувати вплив самого фактора пошкодження тканин та супутнього больового ефекту від нанесення рани, тим самим відокремивши їх від змін, індукованих виключно хронічним соціальним стресом.

- дослідна група (n=60, щури, схильні до стресу) – тварини, яким наносили аналогічну різану рану на тлі моделювання хронічного соціального стресу.

### **2.3 Тест «Відкрите поле»**

Наявність стресу підтверджували за допомогою методу «Відкрите поле», який проводили для всіх тварин до та після моделювання хронічного соціального стресу.

Поведінку тварин оцінювали у відкритому полі розміром  $80 \times 80$  см, поділеному на квадрати  $10 \times 10$  см, упродовж 5 хвилин. Поле освітлювали лампою потужністю 100 Вт, розташованою на відстані 1 м над його поверхнею. Кожну тварину поміщали в центр арени, після чого реєстрували такі показники: кількість сечовиділень і дефекацій, епізоди заціпеніння, латентний період (у секундах) до першого виходу з центрального квадрата, кількість перетнутих центральних і периферичних квадратів, тривалість (у секундах) та частоту грумінгу (короткі й тривалі акти), а також кількість вертикальних стійок на задніх кінцівках протягом 5-хвилинного тесту.

Після обстеження кожної тварини поверхню відкритого поля ретельно промивали водою та висушували.

### **2.4 Забір біологічного матеріалу та моделювання рани**

Забір шкіри здійснювали в ділянці між лопатками тварин з метою створення повношарової рани під тіопентальною анестезією (40 мг/кг, ТОВ «Київмедпрепарат», Україна). Модель повношарової різаної рани, що охоплює епідерміс, дерму та підшкірну клітковину, формували таким чином: після асептичної обробки операційного поля та введення анестезії на поголеній від шерсті ділянці в дорсальній поверхні у міжлопатковій ділянці шкіру або захоплювали хірургічним пінцетом та за допомогою гострих хірургічних ножиць вирізали повношаровий фрагмент тканин по контуру, утворюючи круглу рану діаметром 1–1,3 см [152].

Забір тканин структурних компонентів ранового ложа, а також прилеглої інтактною шкіри (у межах 1 см від краю рани) здійснювали на 1, 3, 7, 14 та 30 добу

після травми. У даному дослідженні особливу увагу приділяли прираньовій зоні, яку визначали як ділянку тканини, розташовану в межах 5 мм від краю рани. Після забору матеріалу у відповідні часові точки тварин виводили з експерименту.

Згідно з сучасною періодизацією загоєння ран, 1-ша та 3-тя доба відповідають фазі запалення, 7–14-та доба — проліферативній фазі, а 30-та доба — фазі ремоделювання.

Після створення повношарової рани тварин утримували індивідуально; підстилковий матеріал замінювали щотижня в асептичних умовах. Упродовж усього періоду спостереження в обох групах не виявлено ознак бактеріального забруднення чи інфекційного процесу.

## **2.5 Морфометричні дослідження**

Для проведення морфометричних досліджень використовували верифікований протокол для морфологічної оцінки процесів загоєння ран у моделі загоєння різаних ран у щурів [153]. Тварин зважували на аптечних вагах, отриману масу вимірювали у грамах. Для морфологічного аналізу площі загоєння ран проводили візуальну фіксацію ран: на визначені часові точки після створення рани (1, 3, 7, 14, 30 добу) рани щурів фотографували за допомогою цифрового фотоапаратам з прикладанням лінійки до рани. Отримані зображення обробляли у спеціалізованому програмному забезпеченні для аналізу зображень (ImageJ, NIH, США). На кожному знімку виділяли контур рани, після чого програмно розраховували площу ушкодженої ділянки (мм<sup>2</sup>).

Зразки шкіри отримані при заборі матеріалу та ділянки загоєння ран фіксували у 10% розчині нейтрального формальдегіду протягом 48–72 годин. Після завершення фіксації матеріал промивали у проточній воді впродовж 24 годин для повного видалення залишків фіксатора.

Подальшу підготовку проводили за стандартною гістологічною методикою. Зневоднення тканин здійснювали у висхідній батареї спиртів (50°, 70°, 80°, 90°, 96° та 100% етиловий спирт).

Як проміжне середовище застосовували розчини спирт–хлороформ у співвідношеннях 2:1, 1:1 та 1:2, після чого зразки переносили у чистий хлороформ та хлороформ–парапласт. Час експозиції в кожному розчині становив 1–5 хвилин. Надалі проводили просочування та заливання матеріалу у парапласт при температурі 56–58°C. При заливанні шматочки орієнтували таким чином, щоб майбутній зріз проходив поперек шарів шкіри.

Парапластові блоки охолоджували при кімнатній температурі та за допомогою мікротома Thermo Scientific HM 325 (Thermo Scientific, Массачусетс, США) виготовляли серійні зрізи товщиною 5 мкм. Зрізи поміщали на предметні скельця, після чого висувували на термостаті при 37–40°C упродовж 12 годин. Перед фарбуванням зрізи депарафінізували у двох змінах ксилолу (двічі по 5 хв), після чого проводили регідратацію в низхідному ряду спиртів (100%, 96%, 80%, 70%) та промивали у проточній воді протягом 5 хв.

Для морфометричної оцінки товщини шарів шкіри, кількості імунних клітин в шкірі фарбували отримані зрізи гематоксиліном та еозином за класичним протоколом. Для виявлення мастоцитів та аналізу їх функціонального стану додатково застосовували фарбування толуїдиновим блакитним за класичним методом.

У гістологічних препаратах, контрастованих гематоксиліном та еозином, оцінювали товщину епідермісу, дерми, гіподерми, характер формування грануляційної тканини. Також на цих препаратах рахували кількість імунокомпетентних клітин (нейтрофіли, макрофаги, лімфоцити, еозинофіли) на одиницю площі. Результати перераховували на 1мм<sup>2</sup>. Морфометричні дослідження тучних клітин (кількість на 0,01мм<sup>2</sup>, тип дегрануляції, розмір) проводили безпосередньо на гістологічних зразках, контрастованих толуїдиновим блакитним із використанням мікроскопа Carl Zeiss Primo Star.

У гістологічних препаратах шкіри було ідентифіковано три морфофункціональні типи мастоцитів залежно від ступеня дегрануляції.

Мастоцити 1-го типу — інтактні клітини з щільним або дифузним розташуванням гранул у цитоплазмі, із чітко окресленими контурами плазмалеми та добре візуалізованим ядром. Дані клітини розцінювалися як недегранульовані та відповідали стану функціонального спокою.

Мастоцити 2-го типу — частково дегранульовані клітини з ознаками порушення цілісності плазмалеми (блебінг), нерівномірним розподілом гранул та їх частковим виходом у позаклітинний простір. Цей тип відображає фазу активної секреції біологічно активних медіаторів.

Мастоцити 3-го типу — деформовані, повністю дегранульовані клітини, які мали вигляд синюватих плям, часто з відсутнім ядром або його фрагментами. Такі клітини розцінювалися як термінальна стадія дегрануляції.

Поділ мастоцитів на зазначені типи використовували для кількісної оцінки їх функціональної активності та розрахунку індексу дегрануляції

Індекс дегрануляції (ІД) мастоцитів розраховували за формулою:

$$\text{ІД мастоцитів} = \text{Д} / (\text{НД} + \text{Д}) \times 100 \%, \text{ де:}$$

Д — кількість дегранульованих клітин (сума мастоцитів 2-го та 3-го типів);

НД — кількість недегранульованих клітин (мастоцити 1-го типу).

Нами було підготовлено мікрофотографії за допомогою мікроскопа PrimoStar iLED та камери Axio CamERc5s (ZEISS, Німеччина), які аналізували за допомогою програми мікроскопії QuPath (версія 0.4.4, Університет Единбурга, Велика Британія).

## **2.6 Імуногістохімічні та імуноферментні дослідження**

Імуноферментні та імуногістохімічні дослідження (CD3, CD8, CD20, CD34) виконані в навчально-науковому медико-лабораторному центрі з віварієм Запорізького державного медико-фармацевтичного університету (свідоцтво про технічну компетентність №181/23) за договором №45-с від 04 червня 2024 року

сумісних наукових досліджень Запорізького національного університету та Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Інші імуногістохімічні дослідження виконані (CD4, CD68, BCL2, Каспаза-3, Каспаза-9, SOX2, HIF1 $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , CGRP, p62, LC3B, NRF2) виконані на базі наукового центру біотехнологій (CeBiTec) у Білефельдському університеті (м. Білефельд, Німеччина) за програмою Erasmus+ (Міжінституційна угода на навчальну мобільність студентів та викладачів в рамках програми Еразмус+ між Білефельдським університетом (Німеччина) та ЗНУ (від 03.04.2022))

Отримані зразки шкіри фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну у затемнених скляних контейнерах та зберігали при кімнатній температурі протягом трьох діб до проведення гістологічних досліджень. Далі, відповідно до стандартної гістологічної методики, зразки заливали в парафінові блоки, з яких виготовляли серійні мікротомні зрізи товщиною 5 мкм. Серійні зрізи отримували за допомогою мікротома Thermo Scientific HM 325 (Thermo Scientific, Массачусетс, США) та поміщали на позитивно заряджені предметні скельця.

Після депарафінізації та регідратації у градуйованих спиртах і ксилолі проводили демаскування антигенів у РТ-модулі згідно з інструкціями виробника.

Після демаскування зрізи промивали в дистильованій воді (двічі по 5 хв), а потім інкубували у TRIS-буфері протягом 5 хв. Ендогенну пероксидазну активність блокували 3% розчином пероксиду водню (отриманим шляхом розведення 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) упродовж 20 хв при кімнатній температурі. Після цього зрізи знову промивали дистильованою водою (2 × 5 хв) та інкубували у TRIS-буфері 5 хв.

Для зменшення неспецифічного зв'язування застосовували білковий блокуючий розчин (5 хв), після чого зрізи промивали TRIS-буфером (5 хв). Далі на зрізи наносили первинні антитіла у відповідному розведенні та інкубували в зволоженій камері при кімнатній температурі протягом 30 хв. Після 5-хвилинного промивання у TRIS-буфері зрізи інкубували з біотинільованими вторинними антитілами (у відповідному розведенні) протягом 10 хв при кімнатній температурі.

Після чергового промивання у TRIS-буфері (5 хв) проводили інкубацію з HRP-кон'югованим полімерним детекційним реагентом упродовж 10 хв, після чого зрізи знову промивали TRIS-буфером (5 хв).

Для хромогенного виявлення застосовували DAB, використовуючи реагент DAB 0.73, розчинений у 1 мл фосфатно-буферного розчину (PBS). Реагент наносили на зрізи та контролювали розвиток забарвлення протягом до 5 хв, зупиняючи реакцію при досягненні оптимальної інтенсивності.

Після промивання у дистильованій воді зрізи контрастували гематоксиліном Майєра. Диференціювання виконували в амонійному розчині (розведення 1:25), після чого зрізи остаточно промивали дистильованою водою. Дегідратацію здійснювали у градуйованих спиртах (95%, 95%, 100%, 100%; по 5 хв кожний), висушували на повітрі, просвітлювали у трьох змінах ксилолу та заключали в гістологічний клей з покривним скельцем.

Надалі для імунолокалізації CD3, CD4, CD8, CD20 оброблялись антитілами CD3 (Santa Cruz Biotechnology, США, каталожний номер sc-20047), антитілами CD4 (Santa Cruz Biotechnology, США, каталожний номер sc-19641), антитілами CD8 (Santa Cruz Biotechnology, США, каталожний номер sc-1177) антитілами CD20 (Santa Cruz Biotechnology, США, каталожний номер sc-393894) і відповідних вторинних антитіл (Santa Cruz Biotechnology, США, каталожний номер sc-2005)

Для оцінки васкуляризації використовували антитіла CD34 (Santa Cruz Biotechnology, США, каталожний номер sc-74499) і відповідні вторинні антитіл (Santa Cruz Biotechnology, США, каталожний номер sc-2005).

Для аналізу проліферактивної активності клітин використовували антитіла Ki67 (Santa Cruz Biotechnology, США, каталожний номер sc-23900) і відповідні вторинні антитіл (Santa Cruz Biotechnology, США, каталожний номер sc-2005).

Для оцінки ендогенної цитопротекції визначали інтенсивність експресії HIF1 $\alpha$  у зрізах шкіри (епідерміс та дерма) з використанням первинних антитіл (Santa Cruz Biotechnology, США, каталожний номер sc-13515) і відповідних

вторинних антитіл (antibodies-online, Німеччина, каталожний номер ABIN7205196).

Для оцінки апоптозу аналізували експресію антиапоптичного білка BCL2 (Santa Cruz Biotechnology, США, каталожний номер sc-7382), а також каспази-3 та каспази-9 (Santa Cruz Biotechnology, США, каталожний номер sc-65497 і sc-56076 відповідно) в епідермісі та дермі. Усі ці зрізи інкубували з однаковими вторинними антитілами (ABIN7205196).

Як маркер ендогенної цитопротекції досліджували експресію NRF2 (Thermo Fisher Scientific, США, каталожний номер PA5-27882) з відповідними вторинними антитілами (antibodies-online, Німеччина, каталожний номер ABIN2690458). NRF2 є транскрипційним фактором, який регулює клітинні механізми захисту від токсичних і оксидативних ушкоджень шляхом модулювання експресії генів, залучених до відповіді на оксидативний стрес та детоксикацію.

Для оцінки диференціації клітинних ліній шкіри визначали експресію SOX2 (Abcam, США, каталожний номер ab97959), використовуючи ті самі вторинні антитіла (ABIN2690458).

Для аналізу регенерації шкіри оцінювали експресію PDGFR $\beta$  (Invitrogen, США, каталожний номер MA5-15143) з відповідними вторинними антитілами (antibodies-online, Німеччина, каталожний номер ABIN2690458). PDGFR $\beta$  кодує один із рецепторів PDGF/VEGF і відіграє ключову роль у розвитку судин; його дефіцит асоціюється з порушенням цілісності й функцій тканин різних органів, включно зі шкірою.

Для аналізу аутофагії досліджували рівні експресії ядерної порогової глікопротеїни p62 (Santa Cruz Biotechnology, США, каталожний номер sc-48402) та LC3BB (Novus Biologicals, США, каталожний номер NB100-2220H) з відповідними вторинними антитілами (antibodies-online, Німеччина, каталожний номер ABIN7205196 для p62 та antibodies-online, Німеччина, каталожний номер ABIN2690458 для LC3BB).

Як маркер регенерації, завершення запалення та неоваскуляризації використовували експресією CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide) (Synaptic Systems GmbH, Німеччина, каталожний номер 414004) з відповідними вторинними антитілами (antibodies-online, Німеччина, каталожний номер ABIN2690462). CGRP є потужним вазодилататором і чинником, що бере участь у захисних механізмах при фізіологічному та патологічному загоєнні ран.

Зображення отримували з використанням сканера ZEISS Axioscan 7 (ZEISS, Німеччина) та мікроскопа PrimoStar iLED та камери Axio CamERc5s (ZEISS, Німеччина). Отримані зображення аналізували за допомогою програмного забезпечення QuPath (версія 0.4.4, Університет Единбурга, Велика Британія). Для всіх перелічених маркерів, окрім CD 34, проводили кількісний аналіз інтенсивності сигналу DAB шляхом розрахунку відсотка позитивно забарвлених клітин, тобто клітин із сильною експресією маркера, від загальної кількості всіх ядерних клітин.

Підрахунок щільності судин (за CD34) проводили за методом Вейднера [149]. Спочатку на малому збільшенні ідентифікували зони найвищої васкуляризації у прирановій зоні. Потім у цих ділянках проводили підрахунок судин при великому збільшенні (x200).

Для визначення концентрації Slc6a4 використовували ELISA-набір для Slc6a4 щура (Sodium-Dependent Serotonin Transporter, каталог № MBS762454, MyBioSource, США) у цитозольній фракції гомогенатів мозку. Після стресового впливу кров щурів із контрольної та експериментальної груп (n=10) швидко відокремлювали від мозку, який після цього ретельно очищали від мозкових оболонок. Досліджувані ділянки мозку негайно поміщали у рідкий азот. Потім тканини подрібнювали у рідкому азоті до стану порошку та гомогенізували у десятикратному об'ємі середовища при температурі +2 °C, яке містило (у ммоль): 250 мМ сахарози, 20 мМ буферу Tris-HCl та 1 мМ EDTA (pH 7,4).

Цитозольну та мітохондріальну фракції отримували шляхом диференціовального центрифугування при температурі +4 °C за допомогою охолоджувальної центрифуги Sigma 3-30k (Німеччина). Для видалення великих

клітинних фрагментів гомогенат спочатку центрифугували протягом 7 хв при  $1000\times g$ , після чого отриманий супернатант повторно центрифугували протягом 20 хв при  $17\,000\times g$ .

## 2.7 Статистичний аналіз

Статистичний аналіз та представлення експериментальних результатів виконували за допомогою стандартного пакету IBM SPSS Statistics версії 26 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). У кожній групі кількісних показників перевіряли нормальність розподілу за одновибірковим критерієм Колмогорова–Смирнова. Вибірка вважалася гомогенною, оскільки всі щури належали до чистої лінії Wistar.

Для порівняння показників між групами використовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) або t-критерій Стьюдента для незалежних вибірок, залежно від характеру даних та кількості груп. Для множинних порівнянь застосовували корекцію Бонферроні для контролю ймовірності помилки першого роду. Різницю вважали статистично значущою при  $p \leq 0,05$ .

Для оцінки взаємозв'язків між кількісними показниками клітинних популяцій та морфометричними параметрами використовували кореляційний аналіз за Пірсоном. Перед проведенням аналізу нормальність розподілу даних перевіряли за допомогою критерію Шапіро–Вілка. Кореляційні коефіцієнти ( $r$ ) обчислювали для пар змінних із нормальним розподілом.

$$\alpha_{\text{corr}} = \alpha / n,$$

де  $\alpha$  — початковий рівень значущості (0,05),  $n$  — кількість незалежних порівнянь

З метою контролю похибки першого роду при множинних порівняннях застосовували поправку Бонферроні.

Результати вважали статистично значущими при  $p < \alpha_{\text{corr}}$ . Силу кореляційних зв'язків інтерпретували таким чином: слабка —  $|r| < 0,3$ ; помірна

—  $0,3 \leq |r| < 0,5$ ; сильна —  $|r| \geq 0,5$ . Статистична значущість кореляційних залежностей встановлювалась при  $p \leq 0,05$ .

Узагальнені результати кількісних показників під час загоєння ран шкіри виражали як середнє арифметичне та стандартне відхилення ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ).

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1 Результати тесту «Відкрите поле» та оцінка стану серотонінергічної трансмісії аміноспецифічної системи головного мозку

До моделювання хронічного соціального стресу проводили тест відкритого поля.

За результатами тесту «Відкрите поле» (додаток А1) провели розподіл тварин за групами. Самці з найвираженішими показниками тривожності ( $n=60$ ) та низькою руховою активністю потрапили до експериментальної групи для подальшого впливу ХСС. Тварини з високим рівнем агресивної поведінки у відкритому полі (часті вертикальні стійки, високий показник пересування у периферичній зоні) були відібрані для ролі агресорів ( $n=65$ ). З решти тварин, що не потрапили до групи агресорів і не демонстрували високої чутливості до стресу, формували контрольну групу ( $n=45$ ).

Як випливає з даних додатку А2, після моделювання хронічного соціального стресу кількість перетинів відкритого поля в центрі зменшилася на 15,5 % ( $p<0,001$ ), а на периферії на 53,1 % ( $p<0,001$ ); вертикальна рухливість біля стіни зменшилася на 40,2% ( $p<0,001$ ) кількісно та на 38,9% ( $p<0,001$ ) з часом, а вертикальна рухливість у відкритому просторі зменшилася на 68,7% ( $p<0,001$ ) кількісно та на 55,5% ( $p<0,001$ ) з часом. Спостерігалось зменшення стереотипних актів грумінгу – короткого на 68,3 % ( $p<0,01$ ), тривалого на 69,2 % ( $p<0,01$ ). Кількість дефекацій і сечовипускань зросла порівняно з контролем у 10 разів ( $p<0,001$ ), а кількість завмирань — на 80,5% ( $p<0,001$ ). Таким чином, ми виявили підвищену тривожність у тварин, які зазнали хронічного соціального стресу.

На біохімічному рівні цитозольна концентрація транспортера серотоніну (Slc6a4) у гомогенатах головного мозку була достовірно зниженою у щурів,

підданих стресу ( $392,76 \pm 16,32$  пг/мл), порівняно з контролем ( $796,84 \pm 13,67$  пг/мл,  $p < 0,0001$ ).

Отримані дані підтверджують, що хронічний соціальний стрес ефективно індукував виражену стресову реакцію у щурів, яка проявлялася підвищеною тривожноподібною поведінкою та значним зниженням експресії серотонінового транспортера.

## **3.2 Морфологічні характеристики шкіри в процесі загоєння різаних ран в після впливу ХСС**

### **3.2.1 Морфологічні особливості загоєння різаних ран після впливу ХСС**

Візуальні морфологічні особливості загоєння різаних ран у контрольній та експериментальній групах наведено в таблиці 3.1.

У контрольній групі, одразу після створення дефекту, площа рани статистично значущо збільшилася на 15,2% порівняно з площею вирізаної тканини. Поверхня рани була вкрита пухкими згустками елементів внутрішньотканинного середовища, що формували первинну ранову матрицю. Процес загоєння рани відбувався із формуванням сполучнотканинного рубця до 30-ї доби. На 1-шу та 3-тю добу матриця, що покривала рану, ставала більш щільною, водночас тенденція до зменшення площі ранового дефекту не досягала статистично значущих відмінностей від початкових значень. На 7-му добу площа рани становила 77,1% від початкової. До 14-ї доби площа рани зменшилася до 17,5% від початкового дефекту. На 30-ту добу ознак рани не спостерігалось, натомість утворився тонкий сполучнотканинний рубець.

У групі тварин, що піддавалися хронічному соціальному стресу, одразу після нанесення рани площа також статистично значущо збільшилася — на 15,3% порівняно з цільовою площею, подібно до контролю.

Таблиця 3.1

**Площа повношарових ран на спині щурів на різних сроках загоєння ран в контрольній групі та після впливу хронічного соціального стресу (середнє  $\pm$  SD).**

День загоєння ран	Контрольна група		Експериментальна група	
	Абс. площа ран, мм <sup>2</sup>	Відносна площа ран, мм <sup>2</sup> , %	Абс. Площа ран, мм <sup>2</sup>	Відносна площа ран, мм <sup>2</sup> , %
До нанесення рани	94,99 $\pm$ 6,25	100,00 $\pm$ 6,59	95,01 $\pm$ 6,41	100,00 $\pm$ 6,97
Одразу після нанесення рани	109,43 $\pm$ 6,40*	115,20 $\pm$ 6,73*	109,55 $\pm$ 7,45*	115,30 $\pm$ 7,88*
День 1	106,20 $\pm$ 7,87	111,80 $\pm$ 2,93	107,93 $\pm$ 8,72	113,59 $\pm$ 9,16
День 3	97,14 $\pm$ 11,26	102,26 $\pm$ 11,88	104,32 $\pm$ 14,97	109,79 $\pm$ 15,77
День 7	73,24 $\pm$ 9,19**	77,10 $\pm$ 9,68**	95,39 $\pm$ 11,82 #	100,39 $\pm$ 12,42#
День 14	16,62 $\pm$ 2,46***	17,49 $\pm$ 2,60***	50,64 $\pm$ 6,27 ***###	53,29 $\pm$ 6,61***###
День 30	0,52 $\pm$ 0,44***	0,55 $\pm$ 0,47***	8,64 $\pm$ 1,56 ***###	9,09 $\pm$ 1,63***###

Примітки: \* – статистично значущі відмінності у різні терміни після операції в межах однієї групи (контроль або експеримент), ( $p \leq 0.05$ )

\*\* – статистично значущі відмінності у різні терміни після операції в межах однієї групи (контроль або експеримент), ( $p \leq 0.01$ )

\*\*\* – статистично значущі відмінності у різні терміни після операції в межах однієї групи (контроль або експеримент), ( $p \leq 0.001$ )

# – статистично значущі відмінності між контрольною та експериментальною групами в один і той самий термін, ( $p \leq 0.05$ )

### – статистично значущі відмінності між контрольною та експериментальною групами в один і той самий термін, ( $p \leq 0.001$ )

Однак на відміну від контрольної групи вже на 1-шу та 3-тю добу спостерігалось відставання у процесі закриття рани. Формування захисної

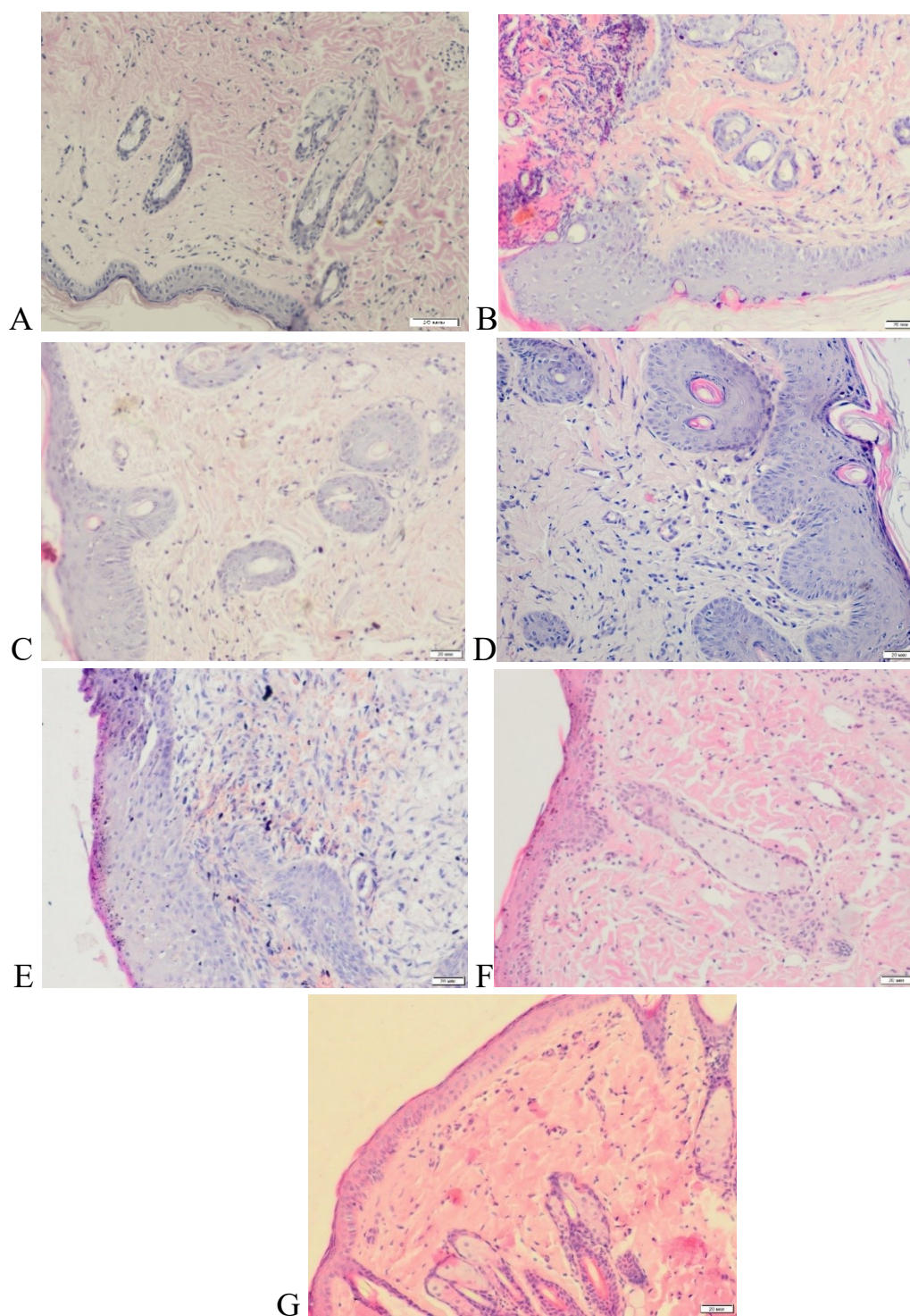
ранової матриці з елементів внутрішніх тканин було менш вираженим як за кількістю, так і за щільністю. На 7-му добу після травмування площа ран у середньому становила 100,4% від початкової, що демонструвало значне відставання від контролю на цьому етапі спостереження (77,1%,  $p \leq 0,01$ ). Ознаки формування струпу були відсутні, спостерігалася лише первинна матриця. До 14-ї доби відносна площа рани залишалася значною — 53,3%, що було майже втричі більше, ніж у контрольній групі (17,5%,  $p \leq 0,001$ ). На 30-ту добу експерименту площа рани в середньому становила 9,1%.

### **3.2.2 Морфометричні особливості шарів шкіри щурів під час загоєння ран після впливу ХСС**

Візуальні морфологічні особливості загоєння операційних ран у контрольній та дослідній групах були адекватні їхній гістологічній динаміці репаративної регенерації (табл. 3.1).

В інтактних гістологічних зразках шкіри контрольних тварин морфологічні особливості відповідали загальновідомим нормам та онтогенетичним періодам (вік 12–13 місяців), тварини були зрілими за соціальними інстинктами [154-157].

Товщина епідермісу становила  $14,82 \pm 1,03$  мкм (додаток А3), межі епідермальних шарів були виражені нечітко, у всіх шарах виділялося переважно по 1–2 ряди кератиноцитів. Епідерміс і дерма, взаємодіючи один з одним, утворювали слабко виражені епідермальні тяжі та дермальні сосочки, кровоносні судини локалізувалися переважно в ділянці волосяних фолікулів (рис. 3.1). Дерма займала основну частину (товщина на поперечному зрізі –  $439,51 \pm 49,73$  мкм) (додаток А4) шкіри та її межі переходять у гіподерму. Товщина підшкірної клітковини становила  $263,37 \pm 68,13$  мкм (додаток А4). У ній знаходилась велика кількість адипоцитів.



**Рисунок 3.1** – Мікрофотографії шкіри щурів з крайової зони ран та ранової поверхні (E) у контрольній групі щурів у різні періоди загоєння. Забарвлення гематоксиліном та еозином, зб. 300: А – день нанесення рани; В – 1-й день загоєння рани; С – 3-й день загоєння рани; D – 7-й день загоєння рани; E – 7-й день загоєння рани (грануляційна тканина); F – 14-й день загоєння рани; G – 30-й день загоєння рани.

На перший день загоєння рани товщина епідермісу статистично значимо підвищилась ( $25,36 \pm 2,29$  мкм, ( $p \leq 0.001$ )) за рахунок реактивної проліферації клітин базального шару ( $13,40 \pm 1,48$  мкм, ( $p \leq 0.001$ )) і тенденції до гіперплазії та гіпертрофії клітин шипуватого шару ( $4,47 \pm 0,56$  мкм). Також статистично значимо ( $p \leq 0.01$ ) збільшилась товщина дерми, яка становила  $598,67 \pm 34,51$  мкм за рахунок підвищеної перфузії судин. Зміни в гіподермі не були статистично значимими.

На 3й день в крайовій зоні товщина епідермісу становила  $32,97 \pm 3,38$  мкм, що статистично значимо більше, порівняно з попереднім сроком загоєння ран ( $p \leq 0.01$ ). Товщина базального шару становила  $19,76 \pm 1,82$  мкм ( $p \leq 0.001$ ). Товщина дерми на цьому терміні загоєння також мала тенденцію до збільшення. Спостерігалась інфільтрація дерми лейкоцитами, та підвищена васкуляризація. Значимих змін в гіподермі не було виявлено.

На 7-й день після нанесення ран спостерігалось утворення грануляційної тканини в зоні ранової поверхні та інфільтрація цієї зони імунологічними клітинами. Товщина епідермісу крайової зони рани досягла максимальних значень -  $51,59 \pm 3,04$  мкм ( $p \leq 0.001$ ), в основному за рахунок статистично значимого ( $p \leq 0.001$ ) потовщення базального шару та шипуватого ( $p \leq 0.001$ ), що супроводжувалось явищами гіперплазії і гіпертрофії клітин епідермісу. Товщина дерми знаходилась в верхніх межах видової норми і становила  $679,47 \pm 43,63$  мкм, але не мала статистично значимих змін порівняно з попереднім сроком спостереження. При мікроскопічному дослідженні пофарбованих гематоксиліном та еозином зразків спостерігалось накопичення щільних еозинофільних волокнистих структур позаклітинного матриксу, що морфологічно відповідало активному формуванню сполучнотканинного компонента грануляційної тканини. Змін в гіподермі не було виявлено.

До 14ї доби в крайовій зоні рани щурів статистично значимо зменшилась товщина епітелію ( $p \leq 0.001$ ), в якому виділяли 4-6 шарів клітин, та його базального ( $p \leq 0.01$ ) і шипуватого ( $p \leq 0.05$ ) шарів. Товщина дерми залишалась все

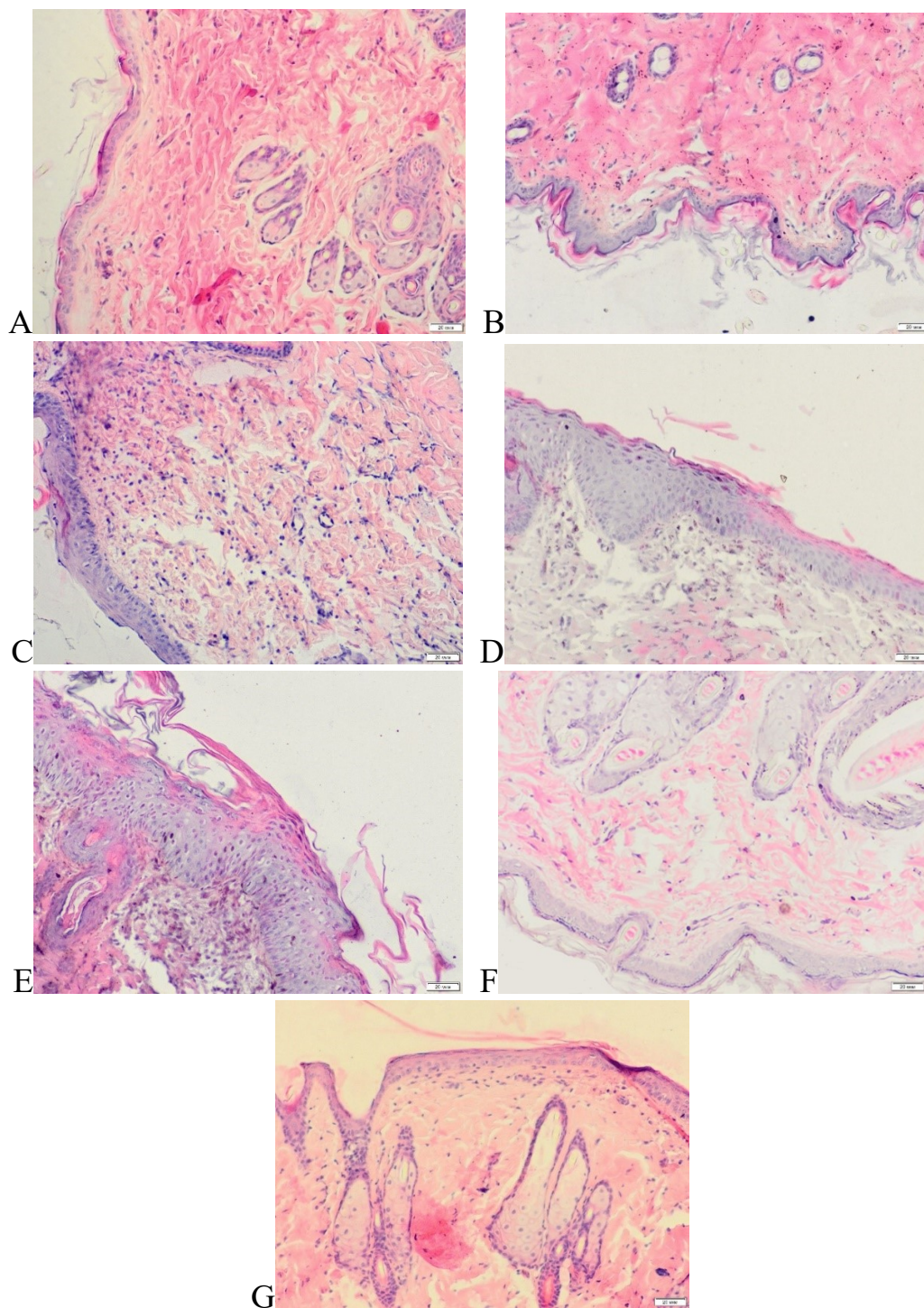
так же високою, в межах видової норми, проте статистично значимих змін помічено не було. Товщина гіподерми статистично значимо не змінилась.

На 30й день мало місце завершення репаративної регенерації ранового процесу поверненням гістологічних показників до вихідних рівнів, що підкреслено візуально на препаратах.

Епідерміс тварин, які перенесли хронічний соціальний стрес ще до нанесення рани був значно тоншим ( $9,54 \pm 0,43$ , ( $p \leq 0.001$ )) (додаток А3, рис. 3.2), ніж у контролі, за рахунок потоншення базального та шипуватого шарів ( $2,74 \pm 0,48$  і  $2,81 \pm 0,32$  ( $p \leq 0.001$ ), відповідно). У його складі визначалося 3-5 шарів кератиноцитів. При цьому особливо витончений був зернистий шар, аж до його повної відсутності на коротких ділянках. Також спостерігався локальний паракератоз. У дермі відзначалося звуження судин поверхневого судинного сплетення та утворення помірної лейкоцитарної інфільтрації навколо них.

На 1-шу добу спостерігалась проліферація епітелію за рахунок клітин базального шару (рис. 3.2), але вона була в 2 рази меншою ( $p \leq 0,001$ ), порівняно з контролем (додаток А3). При цьому товщина дерми статистично достовірно зросла ( $p \leq 0,05$ ), однак її товщина була статистично достовірно меншою ( $p \leq 0,001$ ) порівняно з контролем. Зміни в підшкірній клітковині не були статистично значущими (додаток А4).

На 3-тю добу товщина епідермісу становила  $18,78 \pm 1,23$  мкм, що статистично значуще менше контролю ( $p \leq 0,001$ ) і відносно нього всіх шарів епідермісу були потоншені. (додаток А3). Товщина базального шару також була майже в 2 рази меншою порівняно з контролем ( $10,88 \pm 1,19$  мкм ( $p \leq 0,001$ )). Товщина дерми в цей час загоєння була статистично достовірно ( $p \leq 0,001$ ) меншою порівняно з контролем. Він був інфільтрований лейкоцитами та васкуляризований. Суттєвих змін гіподерми не виявлено.



**Рисунок 3.2** - Мікрофотографії шкіри щурів, з крайової зони ран та ранової (A-D, F-G) поверхні (E) у щурів після впливу хронічного соціального стресу у різні періоди загоєння. Забарвлення гематоксилином та еозином, зб. 300: А – день нанесення рани; В – 1-й день загоєння рани; С – 3-й день загоєння рани; D – 7-й день загоєння рани; E – 7-й день загоєння рани (відсутність грануляційної тканини, запальна інфільтрація дерми); F – 14-й день загоєння рани; G – 30-й день загоєння рани.

На 7-му добу, коли повинні спостерігатися максимальні значення проліферативної реакції, товщина епідермісу навколорани становила  $25,12 \pm 3,49$  мкм ( $p \leq 0,001$ ), що в 2 рази менше порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ ), за рахунок потоншення базального та зернистого шарів ( $p \leq 0,001$ ). Як компенсація за знижену проліферативну активність базального шару, проліферативна активність остистого шару підвищувалася і майже досягла контрольного рівня ( $9,69 \pm 0,64$ ,  $10,55 \pm 1,74$  відповідно,  $p > 0,05$ ). Проте подальші процеси диференціації наступних шарів залишалися пригніченими, тому їх товщини відрізнялися від контролю. Грануляційна тканина спостерігалась в незначній кількості (рис. 3.2 Е), проте в цей період у контрольній групі утворилася грануляційна тканина. Спостерігалось потовщення дерми порівняно з попереднім періодом дослідження ( $p \leq 0,01$ ) через триваючу судинно-клітинну запальну реакцію дерми. Зміни в гіподермі не були статистично значущими.

На 14-ту добу загоєння рани спостерігали зменшення товщини епідермісу шкіри навколо рани як порівняно з сьомою добу, так і з контролем за рахунок ( $p \leq 0,001$ ). Остистий і зернистий шари стоншені порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ ). У дермі та гіподермі суттєвих змін не виявлено.

На 30-ту добу після поранення спостерігалось зменшення товщини майже всіх шарів шкіри навколо рани, але повернення показників до вихідних не спостерігалось. Так, товщина епідермісу становила  $12,87 \pm 0,88$  мкм, що статистично достовірно менше, ніж у контролі та на день поранення в дослідній групі ( $p \leq 0,001$ ). Товщина зернистого шару залишалася низькою порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ ). Товщина дерми зменшилася порівняно з попереднім періодом спостереження ( $p \leq 0,05$ ), але не була достовірно збільшена порівняно з контролем. У гіподермі змін не спостерігалось.

### 3.2.3 Оцінка проліферативної активності в різних шарах шкіри щурів під час загоєння ран після впливу ХСС

Ki-67 є загально визнаним маркером клітинної проліферації, експресія якого відображає інтенсивність мітотичної активності клітин у фазах G1, S, G2 та M клітинного циклу. Аналіз Ki-67-позитивних клітин дозволяє об'єктивно оцінити динаміку регенераторних процесів в епідермісі та дермі шкіри в різні терміни загоєння рани.

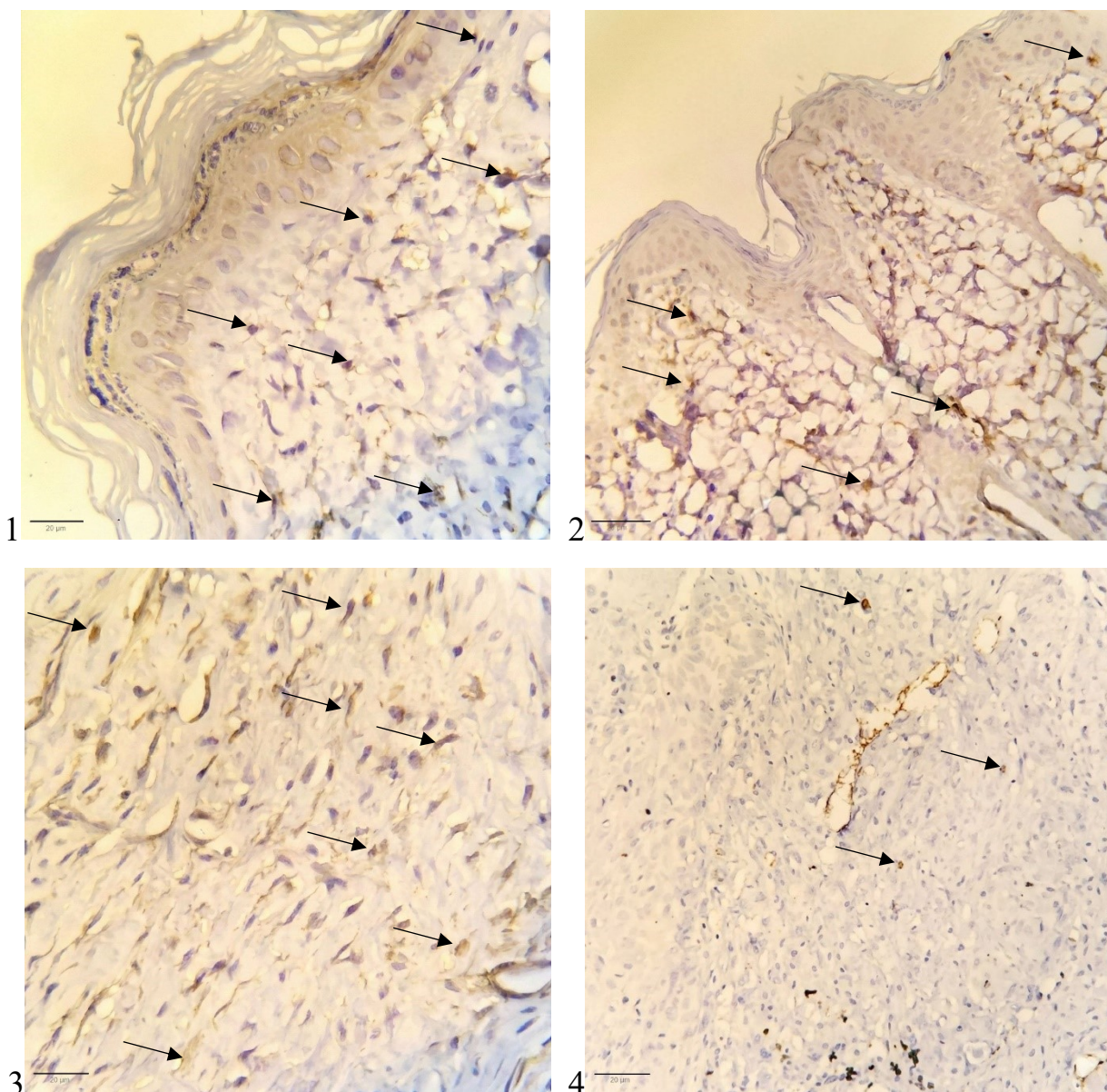
У контрольній групі в інтактній шкірі рівень експресії Ki-67 у дермі був низьким і становив  $0,96 \pm 0,38$  % (табл. 3.2), що відповідало фізіологічному рівню проліферативної активності дермальних клітин. На 1-шу добу після нанесення різаної рани відзначалося достовірне підвищення частки Ki-67-позитивних клітин до  $3,59 \pm 0,48$  % ( $p \leq 0,001$ ), що свідчило про активацію проліферації клітин дерми у відповідь на травму.

На 3-тю добу загоєння рани експресія Ki-67 у дермі зростала до  $6,32 \pm 0,84$  % ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 3.3), а максимальні значення були зафіксовані на 7-му добу —  $8,14 \pm 1,52$  %, що відповідало піку проліферативної активності в дермальному шарі та корелювало з активним формуванням грануляційної тканини. У подальшому, на 14-ту добу, рівень Ki-67 знижувався до  $5,26 \pm 1,01$  %, а на 30-ту добу — до  $1,19 \pm 0,44$  % ( $p \leq 0,01$ ), наближаючись до інтактних значень.

В експериментальній групі, що зазнавала впливу хронічного соціального стресу, вихідний рівень експресії Ki-67 у дермі був нижчим і становив  $0,64 \pm 0,21$  %. На 1-шу добу після ушкодження відзначалося зростання цього показника до  $2,02 \pm 0,51$  % ( $p \leq 0,05$ ;  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем), однак рівень проліферативної активності залишався достовірно нижчим, ніж у контрольній групі.

На 3-тю добу експресія Ki-67 у дермі експериментальної групи зростала до  $4,64 \pm 0,62$  % ( $p \leq 0,01$ ), а на 7-му добу досягала максимального значення —  $5,71 \pm 0,76$  %, що було істотно нижче за відповідні показники контролю. У

подальші терміни спостерігалось швидке зниження проліферативної активності: на 14-ту добу —  $2,42 \pm 0,69$  % ( $p \leq 0,01$ ;  $p \leq 0,05$  до контролю), а на 30-ту добу —  $0,84 \pm 0,35$  %, що свідчило про передчасне згасання проліферативних процесів у дермі.



**Рисунок 3.3** - Експресія Ki-67 (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах:

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 7 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 7 день загоєння ран

Таблиця 3.2

**Експресія маркера проліферації Ki-67 в епідермісі та дермі шкіри щурів у процесі загоєння різаної рани в контролі та після впливу хронічного соціального стресу, %. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.**

Зона дослідження	Група	День загоєння рани					
		День нанесення рани	1	3	7	14	30
Дерма	контроль	0,96 ± 0,38	3,59 ± 0,48 ***	6,32 ± 0,84 *	8,14 ± 1,52	5,26 ± 1,01	1,19 ± 0,44 **
	після ХСС	0,64 ± 0,21	2,02 ± 0,51 *#	4,64 ± 0,62 **	5,71 ± 0,76	2,42 ± 0,69 ***#	0,84 ± 0,35
Епідерміс	контроль	1,58 ± 0,34	5,89 ± 0,83 ***	8,48 ± 0,94	12,48 ± 1,47 *	3,94 ± 0,52 ***	1,62 ± 0,37 **
	після ХСС	0,76 ± 0,27	3,37 ± 0,68 ***#	4,11 ± 0,62 ##	6,81 ± 0,87 *##	2,86 ± 0,42 ***	0,94 ± 0,34 **

Примітки: \* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

\*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

# - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ );

## - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,01$ )

У контрольній групі в інтактному епідермісі частка Ki-67-позитивних клітин становила  $1,58 \pm 0,34$  %. Уже на 1-шу добу після травми цей показник достовірно підвищувався до  $5,89 \pm 0,83$  % ( $p \leq 0,001$ ), що відображало активацію проліферації кератиноцитів у зоні ушкодження. На 3-тю добу рівень експресії Ki-67 зростав до  $8,48 \pm 0,94$  %, а максимальні значення були зафіксовані на 7-му

добу —  $12,48 \pm 1,47$  % ( $p \leq 0,05$ ), що відповідало піковій фазі епітелізації ранової поверхні.

У подальшому, на 14-ту добу, кількість Ki-67-позитивних клітин різко зменшувалася до  $3,94 \pm 0,52$  % ( $p \leq 0,001$ ), а на 30-ту добу — до  $1,62 \pm 0,37$  % ( $p \leq 0,01$ ), що свідчило про завершення активної регенерації епідермісу.

В експериментальній групі вихідний рівень експресії Ki-67 в епідермісі був нижчим і становив  $0,76 \pm 0,27$  %. На 1-шу добу після ушкодження цей показник зростав до  $3,37 \pm 0,68$  % ( $p \leq 0,01$ ;  $p \leq 0,05$  до контролю), а на 3-тю добу — до  $4,11 \pm 0,62$  % ( $p \leq 0,01$ ;  $p \leq 0,01$  до контролю).

Максимальна експресія Ki-67 в епідермісі експериментальної групи спостерігалася на 7-му добу та становила  $6,81 \pm 0,87$  % ( $p \leq 0,05$ ;  $p \leq 0,01$  до контролю), що майже вдвічі нижче за контрольні значення. На 14-ту добу кількість Ki-67-позитивних клітин зменшувалася до  $2,86 \pm 0,42$  % ( $p \leq 0,001$ ), а на 30-ту добу — до  $0,94 \pm 0,34$  % ( $p \leq 0,01$ ), не досягаючи рівня інтактного контролю.

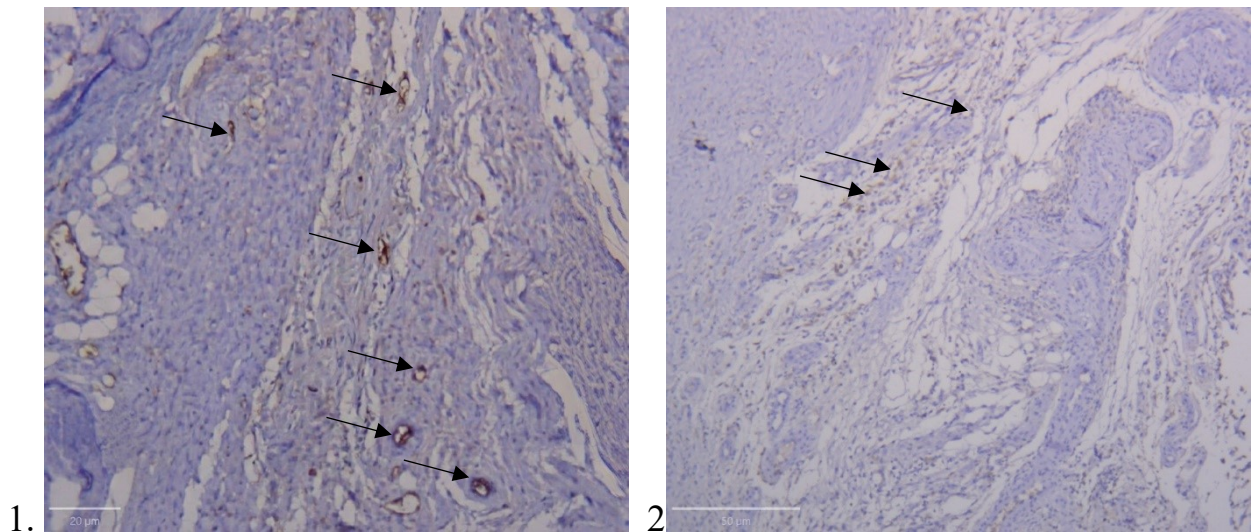
Таким чином, хронічний соціальний стрес супроводжувався зниженням вихідної проліферативної активності клітин епідермісу та дерми, а також зменшенням амплітуди та тривалості піку експресії Ki-67 у процесі загоєння різаної рани.

### **3.2.4 Особливості васкуляризації шкіри шурів під час загоєння ран після впливу ХСС**

CD34 — маркер ендотеліальних клітин, що використовується для оцінки мікросудинної щільності, яка відображає інтенсивність ангіогенезу. Підрахунок CD34-позитивних судин у цій роботі проводили у гарячих точках — ділянках із найвищою локальною судинною активністю.

До нанесення рани щільність CD34-позитивних судин у контрольних тварин становила  $32,17 \pm 2,86$  в полі зору (додаток А5). На першу доба кількість судин становила  $31,53 \pm 3,13$  судин в полі зору, показник фактично не відрізнявся від вихідного.

На 3-тю добу кількість CD34-позитивних судин зростає до  $45,84 \pm 4,62$  в полі зору ( $p < 0,05$ ) (рис. 3.4.). Пік зростання чисельності судин припав на 7-му добу:  $79,12 \pm 8,23$  судин в полі зору ( $p < 0,001$ ). Саме цей період відповідав найінтенсивнішому новоутворенню мікросудин. Далі — поступовий спад. 14-та доба:  $48,73 \pm 4,97$  ( $p < 0,001$ ). 30-та доба:  $33,53 \pm 3,15$  судин в полі зору ( $p < 0,05$ ), що майже досягало вихідного рівня. Це може свідчити про завершення активної фази неангіогенезу.



**Рисунок 3.4** - Експресія CD34 (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показано судини). Зб. 300 (1), 200 (2):

1 – в контрольній групі на 7 день загоєння ран

2 – в групі після ХСС на 7 день загоєння ран

В експериментальній групі вихідні значення були зіставними з контролем —  $31,58 \pm 3,22$  судин в полі зору. Але вже на 1-шу доба після нанесення різаної рани виявлялась принципова різниця: різке падіння до  $19,48 \pm 2,83$  судин в полі зору ( $p < 0,001$  відносно контролю). Рання ангіогенна відповідь була пригніченою.

3-тя доба — часткове відновлення:  $34,27 \pm 4,15$  судин в полі зору ( $p < 0,001$ ). Проте кількість судин залишалася достовірно нижчим за контрольне ( $p < 0,05$ ). Пік в експериментальній групі зафіксували на 7-му добу —  $51,66 \pm 5,51$  судин в полі

зору ( $p < 0,001$ ). Порівняно з контролем — суттєво менше ( $p < 0,001$ ). На 14-ту добу —  $46,82 \pm 4,94$  ( $p < 0,001$ ), на 30-ту —  $38,51 \pm 3,67$  судин в полі зору ( $p < 0,05$ ). Останнє значення перевищувало вихідний рівень. Повного повернення до вихідних показників не відбулося.

У нормі загоєння різаної рани супроводжується чітко фазним ангиогенезом: максимум на 7-му добу, нормалізація до 30-ї. Хронічний соціальний стрес цю закономірність порушує. Так, спостерігається пригнічення ранньої ангиогенної відповіді та зменшення пікової щільності новоутворених судин, а також їх пролонговане збереження у пізні строки загоєння. Це може свідчити про порушення регуляції неоангиогенезу, що призводить до уповільнення ремоделювання тканини.

### **3.3 Участь клітин вродженого та набутого імунітету системного типу (нейтрофіли, макрофаги, лімфоцити) в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС**

#### **3.3.1 Кількісна динаміка нейтрофілів в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС**

Кількість нейтрофілів у дермі шкіри щурів визначалася як один із основних індикаторів перебігу запальної реакції та ефективності репаративних процесів у зоні хірургічного ушкодження.

У контрольній групі в інтактній шкірі до нанесення рани кількість нейтрофілів становила  $4,15 \pm 0,38$  клітин/мм<sup>2</sup> (додаток А6), що відповідало фізіологічному рівню. На 1-шу добу після травми спостерігалось різке зростання цього показника до  $145,25 \pm 13,74$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ).

На 3-тю добу кількість нейтрофілів достовірно зменшувалася до  $51,05 \pm 4,83$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ), однак залишалася значно вищою за вихідні значення. Подальше зниження відзначалося на 7-му добу — до  $16,76 \pm 1,48$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ), що свідчило про поступове завершення фази гострого запалення та перехід до проліферативної стадії загоєння рани. На 14-ту

добу кількість нейтрофілів практично поверталася до вихідного рівня ( $4,93 \pm 0,53$  клітин/мм<sup>2</sup>;  $p \leq 0,001$ ), а на 30-ту добу становила  $4,16 \pm 0,41$  клітин/мм<sup>2</sup>, не відрізняючись від значень до нанесення рани.

В експериментальній групі, що зазнавала впливу хронічного соціального стресу, кількість нейтрофілів в інтактній шкірі була достовірно нижчою, ніж у контролі, і становила  $1,69 \pm 0,12$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ), що може свідчити про стрес-індуковані зміни імунного гомеостазу ще до нанесення рани.

На 1-шу добу після травми кількість нейтрофілів у цій групі зростала до  $49,98 \pm 4,58$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$  порівняно з контролем), однак цей показник був майже втричі нижчим, ніж у контрольній групі в аналогічний період. На 3-тю добу спостерігалось подальше зменшення кількості нейтрофілів до  $26,42 \pm 2,12$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$  до контролю), а на 7-му добу — до  $6,87 \pm 0,59$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$  до контролю).

На 14-ту добу загоєння рани кількість нейтрофілів у тварин експериментальної групи становила  $3,14 \pm 0,30$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,05$  до контролю), а на 30-ту добу —  $4,03 \pm 0,42$  клітин/мм<sup>2</sup>, що практично відповідало показникам контрольної групи та шкірі до нанесення рани.

Таким чином, у тварин, які зазнавали впливу хронічного соціального стресу, гостра нейтрофільна реакція на хірургічну травму була значно менш вираженою за амплітудою та тривалістю порівняно з контролем. Зниження пікової кількості нейтрофілів у ранні строки загоєння (1–3 доба) та їх швидке зменшення може свідчити про порушення повноцінної реалізації фази гострого запалення, що є важливою передумовою подальшої пролонгації та дискоординації репаративних процесів.

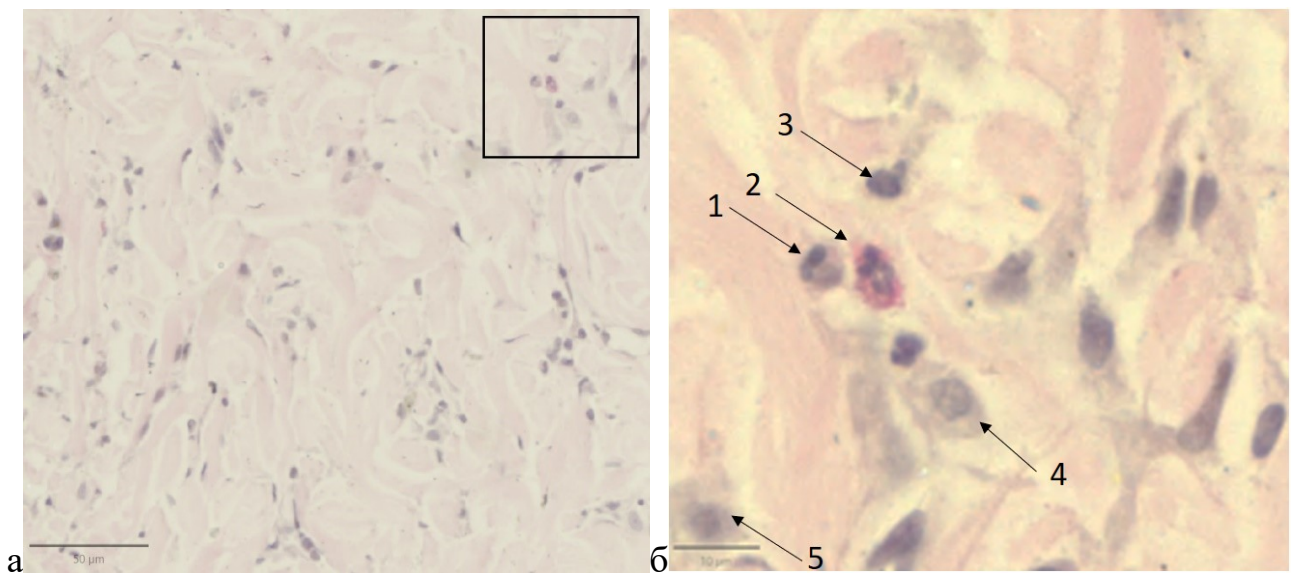
### **3.3.2 Кількісна динаміка макрофагів під час загоєння різаних ран після впливу ХСС**

Макрофаги забезпечують фагоцитоз, презентацію антигенів, синтез цитокінів та факторів росту та визначають перехід від запальної до

проліферативної фази загоєння рани. У зв'язку з цим було проведено кількісний аналіз макрофагів у дермі шкіри щурів у різні терміни загоєння різаних ран у контрольних тварин та тварин після тривалого психоемоційного стресу.

У контрольній групі в інтактній шкірі до нанесення рани кількість макрофагів становила  $33,85 \pm 2,88$  клітин/мм<sup>2</sup> (Додаток А7), що відповідало фізіологічному рівню резидентних клітин мононуклеарно-фагоцитарної системи шкіри. Уже на 1-шу добу після травми спостерігалось достовірне зростання цього показника до  $64,31 \pm 6,21$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ), що відображало активацію запальної відповіді та міграцію макрофагів у зону ушкодження.

На 3-тю добу кількість макрофагів різко зростала до  $195,32 \pm 18,64$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ) (рис. 3.5), що відповідало завершенню фази гострого запалення та формуванню умов для проліферативних процесів. Максимальні значення були зафіксовані на 7-му добу загоєння рани —  $409,59 \pm 35,16$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ).



**Рисунок 3.5** - Мікрофотографії шкіри щурів контрольної групи, з крайової зони ран на 3й день загоєння. Забарвлення гематоксиліном та еозином: а — оглядова мікрофотографія (зб. 600). Чорною рамкою виділено ділянку, представлену на фрагменті б; б - (зб. 1000): 1 – нейтрофіл; 2 – еозинофіл; 3 – лімфоцит; 4 – макрофаг; 5 – фібробласт.

У подальшому, на 14-ту добу, кількість макрофагів зменшувалася до  $176,70 \pm 15,88$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ), а на 30-ту добу — до  $44,02 \pm 4,37$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ), наближаючись до вихідних значень, що свідчило про завершення активної фази репарації та перехід до стабілізації тканинного гомеостазу.

В експериментальній групі, яка зазнавала впливу хронічного соціального стресу, кількість макрофагів у інтактній шкірі була достовірно нижчою, ніж у контролі, і становила  $17,54 \pm 1,45$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ). Це може свідчити про стрес-індуковане пригнічення тканинної імунної відповіді.

На 1-шу добу після нанесення рани кількість макрофагів зростала до  $41,47 \pm 3,73$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$  порівняно з контролем), однак цей показник був майже в 1,5 раза нижчим, ніж у контрольній групі в аналогічний період. На 3-тю добу кількість макрофагів у зоні ушкодження збільшувалася до  $98,22 \pm 8,69$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$  до контролю), залишаючись істотно нижчою за контрольні значення.

Максимальна кількість макрофагів у тварин експериментальної групи спостерігалася на 7-му добу і становила  $174,60 \pm 16,44$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$  до контролю), що більш ніж у 2 рази менше, ніж у контрольній групі в цей самий період. На 14-ту добу кількість макрофагів зменшувалася до  $66,19 \pm 6,58$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$  до контролю), а на 30-ту добу — до  $27,68 \pm 2,43$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$  до контролю), так і не досягаючи інтактних контрольних значень.

Таким чином, у тварин, які зазнавали впливу хронічного соціального стресу, макрофагальна ланка запально-репаративної відповіді характеризувалася зниженням базального рівня клітин, меншою амплітудою приросту у фазах запалення та проліферації, а також загальним дефіцитом макрофагів у всі терміни спостереження. Виявлені зміни можуть свідчити про порушення координації між запальною та проліферативною фазами загоєння рани, що, у поєднанні зі зниженою нейтрофільною реакцією та пролонгованою активацією мастоцитів, створює морфологічні передумови для хронізації ранового процесу.

### 3.3.2.1 Кількісна динаміка CD68<sup>+</sup> клітин під час загоєння різаних ран після впливу ХСС

CD68 є специфічним імуногістохімічним маркером клітин мононуклеарно-фагоцитарної системи, передусім тканинних макрофагів, і застосовується для оцінки їх кількості, розподілу та функціонального стану в тканинах. У даному дослідженні проведено аналіз експресії CD68<sup>+</sup> клітин в епідермісі, сосочковому та сітчастому шарах дерми шкіри щурів у різні терміни загоєння різаної рани.

У контрольній групі в інтактній шкірі частка CD68<sup>+</sup> клітин в епідермісі була низькою та становила  $0,47 \pm 0,17$  % (табл. 3.3). Після нанесення різаної рани на 1-шу добу цей показник збільшувався до  $0,76 \pm 0,34$  %, а на 3-тю добу — до  $1,33 \pm 0,49$  %, що відображало залучення макрофагів до поверхневих шарів ушкодженої шкіри. Максимальна експресія CD68 в епідермісі спостерігалася на 7-му добу і досягала  $1,88 \pm 0,42$  %, після чого на 14-ту та 30-ту добу знижувалася до  $1,11 \pm 0,32$  % та  $0,63 \pm 0,23$  % відповідно.

В експериментальній групі базальний рівень CD68<sup>+</sup> клітин в епідермісі був нижчим і становив  $0,37 \pm 0,12$  %. У процесі загоєння різаної рани відзначалося менш виражене зростання цього показника:  $0,57 \pm 0,27$  % на 1-шу добу,  $0,78 \pm 0,39$  % на 3-тю добу та  $1,05 \pm 0,39$  % на 7-му добу. На 14-ту та 30-ту добу експресія CD68 в епідермісі зменшувалася до  $0,81 \pm 0,32$  % та  $0,29 \pm 0,15$  % відповідно, що було нижчим порівняно з контролем.

У контрольній групі кількість CD68<sup>+</sup> клітин у сосочковому шарі дерми в інтактній шкірі становила  $3,16 \pm 0,42$  % (рис. 3.6). Уже на 1-шу добу після різаної рани цей показник зростав до  $4,75 \pm 0,67$  %, а на 3-тю добу — до  $8,63 \pm 1,18$  % ( $p \leq 0,05$ ). Максимальна експресія CD68<sup>+</sup> клітин у сосочковому шарі дерми спостерігалася на 7-му добу —  $10,31 \pm 1,45$  %, що відповідало піковим морфометричним показникам кількості макрофагів ( $409,59 \pm 35,16$  клітин/мм<sup>2</sup>). У подальшому, на 14-ту та 30-ту добу, цей показник зменшувався до  $7,49 \pm 0,93$  % та  $4,29 \pm 0,62$  % відповідно.

Таблиця 3.3

**Експресія маркера проліферації CD 68 в епідермісі та дермі шкіри щурів у процесі загоєння різаної рани в контролі та після впливу хронічного соціального стресу, %. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.**

Зона дослідження	Група	День загоєння рани					
		День нанесення рани	1	3	7	14	30
Епідерміс	контроль	0,47 ± 0,17	0,76 ± 0,34	1,33 ± 0,49	1,88 ± 0,42	1,11 ± 0,32	0,63 ± 0,23
	після ХСС	0,37 ± 0,12	0,57 ± 0,27	0,78 ± 0,39	1,05 ± 0,39	0,81 ± 0,32	0,29 ± 0,15
Сосочковий шар дерми	контроль	3,16 ± 0,42	4,75 ± 0,67	8,63 ± 1,18 *	10,31 ± 1,45	7,49 ± 0,93	4,29 ± 0,62 *
	після ХСС	3,05 ± 0,49	3,44 ± 0,23	4,16 ± 0,53 ##	8,59 ± 1,29 **	5,11 ± 0,76 *	3,38 ± 0,51
Сітчастий шар дерми	контроль	1,22 ± 0,36	2,75 ± 0,44 *	6,81 ± 0,94 **	8,12 ± 1,22	4,58 ± 0,72 *	1,99 ± 0,33 **
	після ХСС	1,03 ± 0,28	2,49 ± 0,33 **	3,25 ± 0,49 ##	6,67 ± 0,94 **	2,79 ± 0,44 **#	0,95 ± 0,37 **

Примітки: \* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

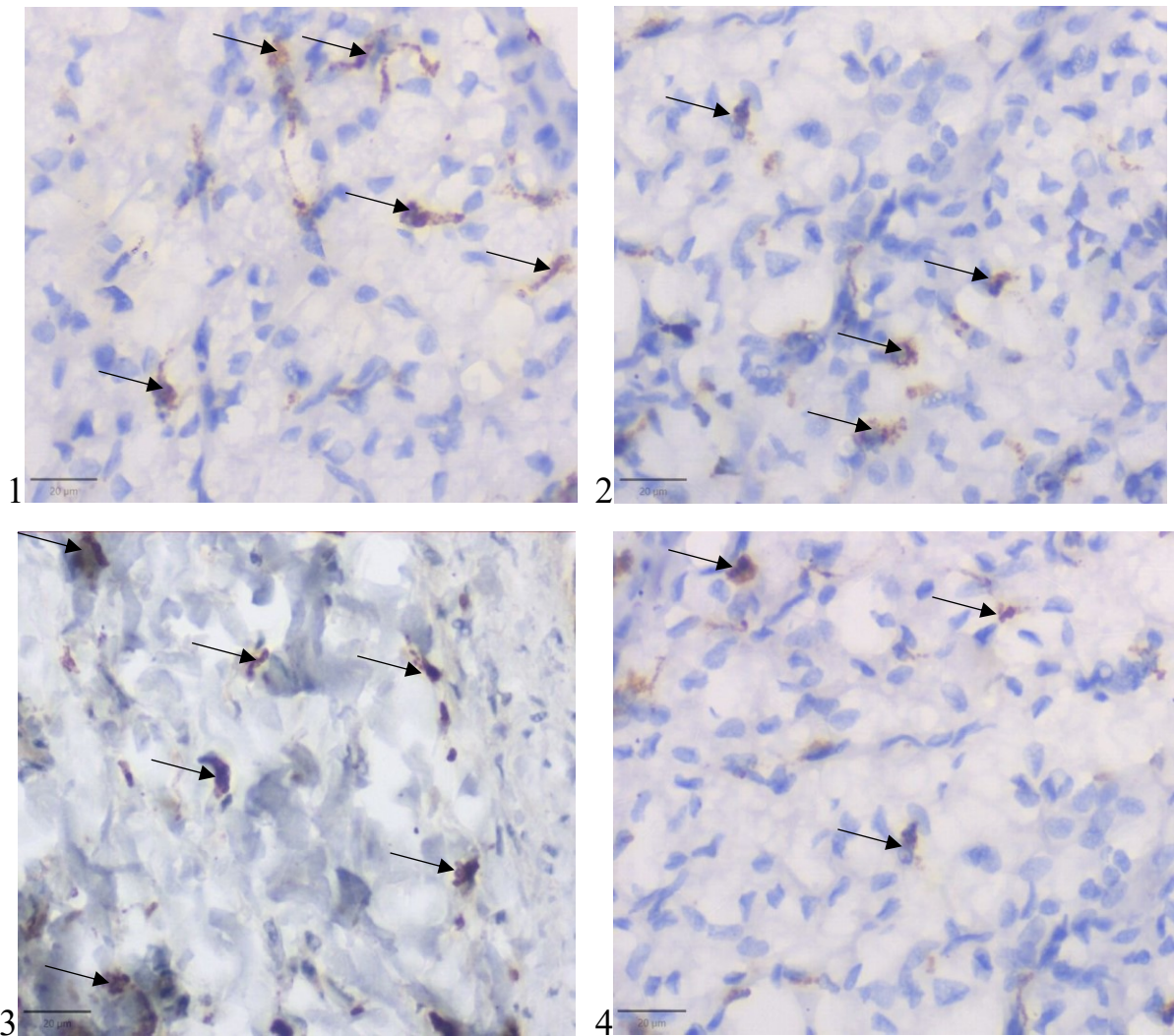
\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

# - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ );

## - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,01$ );

В експериментальній групі базальний рівень CD68<sup>+</sup> клітин у сосочковому шарі дерми був зіставним із контролем (3,05 ± 0,49 %), однак після нанесення різаної рани динаміка зростання була менш вираженою. На 1-шу добу експресія CD68 становила 3,44 ± 0,53 %, на 3-тю добу — 8,59 ± 1,29 %, а на 7-му добу — лише 5,11 ± 0,76 %, що було більш ніж у два рази нижче порівняно з контролем. На 14-ту добу кількість CD68<sup>+</sup> клітин знижувалася до 3,38 ± 0,51 %, а на 30-ту добу — до базальних значень.

У контрольній групі в інтактній шкірі частка CD68<sup>+</sup> клітин у сітчастому шарі дерми становила  $1,22 \pm 0,36$  %. Після нанесення різаної рани на 1-шу добу цей показник зростав до  $2,75 \pm 0,44$  % ( $p \leq 0,05$ ), на 3-тю добу — до  $5,94 \pm 0,94$  % ( $p \leq 0,01$ ), а максимальних значень досягав на 7-му добу —  $8,12 \pm 1,22$  %. На 14-ту та 30-ту добу експресія CD68 у сітчастому шарі дерми зменшувалася до  $4,58 \pm 0,72$  % та  $1,99 \pm 0,33$  % відповідно.



**Рисунок 3.6** - Експресія CD 68 (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показані мічені клітини), зб. 600 :

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 3 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 3 день загоєння ран

В експериментальній групі в інтактній шкірі експресія CD68 у сітчастому шарі дерми становила  $1,03 \pm 0,28$  %. Після нанесення різаної рани спостерігалось менш інтенсивне зростання цього показника:  $2,41 \pm 0,39$  % на 1-шу добу,  $6,67 \pm 0,94$  % на 3-тю добу та лише  $2,79 \pm 0,44$  % на 7-му добу ( $p \leq 0,05$  порівняно з контролем). У подальші терміни рівень CD68<sup>+</sup> клітин знижувався до  $0,95 \pm 0,37$  % на 14-ту добу.

Отримані імуногістохімічні дані щодо експресії CD68<sup>+</sup> клітин повністю узгоджуються з результатами морфометричного аналізу кількості макрофагів у шкірі щурів. Максимальна експресія CD68 у сосочковому та сітчастому шарах дерми на 7-му добу в контрольній групі співпадала з піковими значеннями кількості макрофагів ( $409,59 \pm 35,16$  клітин/мм<sup>2</sup>), що відображало активну фазу проліферації та ремоделювання грануляційної тканини.

В умовах хронічного соціального стресу зниження експресії CD68<sup>+</sup> клітин у всі терміни спостереження відповідало достовірному зменшенню кількості макрофагів ( $174,60 \pm 16,44$  клітин/мм<sup>2</sup> на 7-му добу) та свідчило про пригнічення макрофагальної ланки запально-репаративної відповіді.

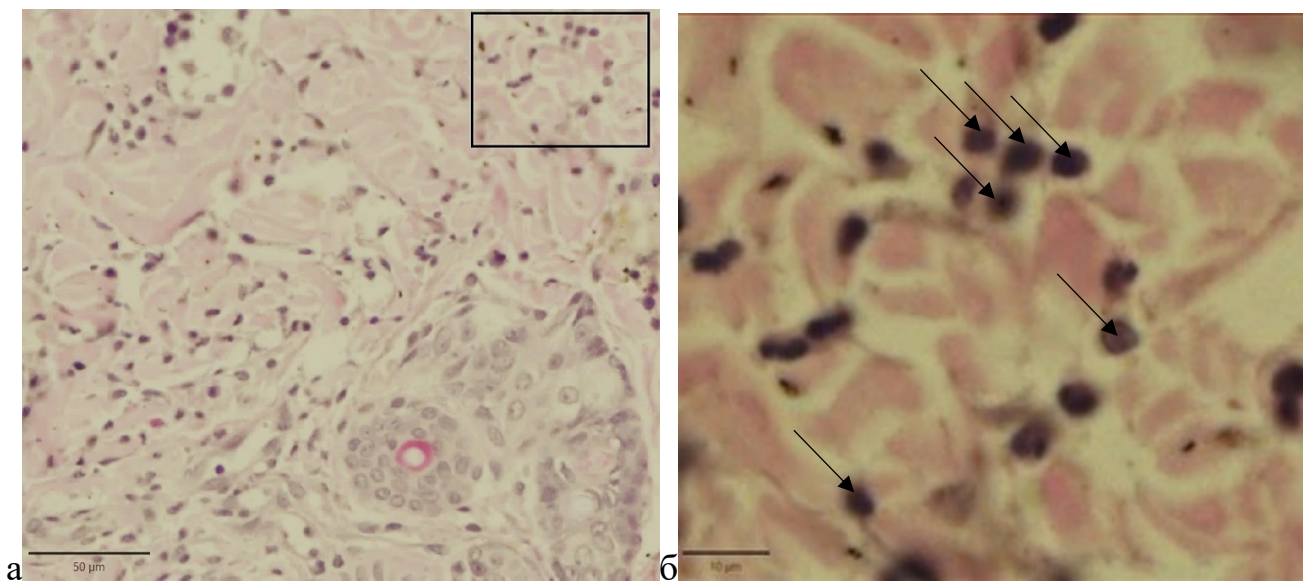
### **3.3.3 Кількісна динаміка лімфоцитів в процесі репарації ризаних ран після впливу ХСС**

Лімфоцити є ключовими клітинами адаптивної імунної відповіді та приймають участь у регуляції запалення, координації взаємодії між клітинами вродженого імунітету та контролі процесів репарації тканин. З огляду на це було проведено кількісний аналіз лімфоцитарної інфільтрації дерми шкіри щурів у різні терміни загоєння хірургічної рани.

У контрольній групі кількість лімфоцитів в інтактній шкірі до нанесення ушкодження становила  $41,27 \pm 3,74$  клітин/мм<sup>2</sup> (додаток А8), що відповідало фізіологічному рівню тканинного імунного нагляду. Уже на 1-шу добу після хірургічної травми спостерігалось достовірне збільшення цього показника до

$107,62 \pm 12,15$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ), що свідчило про ранню активацію адаптивної імунної відповіді у зоні ушкодження.

На 3-тю добу загоєння рани кількість лімфоцитів продовжувала зростати й досягала  $180,67 \pm 17,32$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ), а максимальні значення були зафіксовані на 7-му добу —  $314,89 \pm 26,99$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ) (рис. 3.7). Така динаміка відображала активну участь лімфоцитів у проліферативній фазі загоєння рани, зокрема в регуляції активності макрофагів, фібробластів та ангіогенезу.



**Рисунок 3.7** - Мікрофотографії шкіри щурів контрольної групи на 7 день загоєння. Забарвлення гематоксиліном та еозином: а — оглядова мікрофотографія (зб. 600). Чорною рамкою виділено ділянку, представлену на фрагменті б; б - виражена інфільтрація лімфоцитів (показані стрілочками) (зб. 1000).

У подальшому, на 14-ту добу, кількість лімфоцитів у контрольній групі достовірно зменшувалася до  $98,64 \pm 8,52$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ), а на 30-ту добу — до  $52,02 \pm 4,75$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ), наближаючись до вихідного рівня, що свідчило про поступове згасання імунної активності та завершення процесів репарації.

В експериментальній групі, яка зазнавала впливу хронічного соціального стресу, кількість лімфоцитів в інтактній шкірі була достовірно нижчою порівняно з контролем і становила  $22,59 \pm 1,96$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ), що вказує на стрес-індуковане пригнічення локальної лімфоцитарної ланки імунітету.

На 1-шу добу після нанесення рани кількість лімфоцитів у тварин експериментальної групи зростала до  $58,45 \pm 5,30$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$  порівняно з контролем), однак цей показник був майже вдвічі нижчим, ніж у контрольній групі в аналогічний термін. На 3-тю добу кількість лімфоцитів збільшувалася до  $93,77 \pm 8,71$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$  до контролю), залишаючись істотно зниженою відносно контрольних значень.

Максимальна кількість лімфоцитів у експериментальній групі відзначалася на 7-му добу загоєння рани і становила  $161,52 \pm 14,73$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$  до контролю), що майже у 2 рази менше, ніж у контрольній групі в цей період. На 14-ту добу кількість лімфоцитів зменшувалася до  $32,71 \pm 2,94$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$  до контролю), а на 30-ту добу — до  $29,16 \pm 2,47$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$  до контролю), не досягаючи інтактних контрольних значень.

Таким чином, хронічний соціальний стрес супроводжувався стійким зниженням лімфоцитарної інфільтрації шкіри як у вихідному стані, так і протягом усього періоду загоєння хірургічної рани. Зменшення амплітуди та тривалості лімфоцитарної відповіді може свідчити про порушення координації між вродженим і адаптивним імунітетом, що, у поєднанні зі зниженою активністю макрофагів і нейтрофілів та зміненою дегрануляцією мастоцитів, створює умови для сповільнення та дизрегуляції репаративних процесів у шкірі.

### 3.3.3.1 Кількісна динаміка CD3<sup>+</sup> лімфоцитів в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС

У контрольній групі в інтактній шкірі (0 доба) відносна кількість CD3<sup>+</sup> клітин становила  $6,54 \pm 0,72$  % (додаток А9). Уже на 1-шу добу після нанесення різаної рани відзначалося достовірне зниження цього показника до  $4,41 \pm 0,54$  % ( $p \leq 0,05$ ), що свідчило про тимчасове переважання механізмів вродженого імунітету на ранніх етапах запальної відповіді. На 3-тю добу спостерігалось різке зростання кількості CD3<sup>+</sup> клітин до  $10,25 \pm 0,82$  % ( $p \leq 0,001$ ), що відповідало фазі активного залучення Т-лімфоцитів до імунної регуляції процесів загоєння.

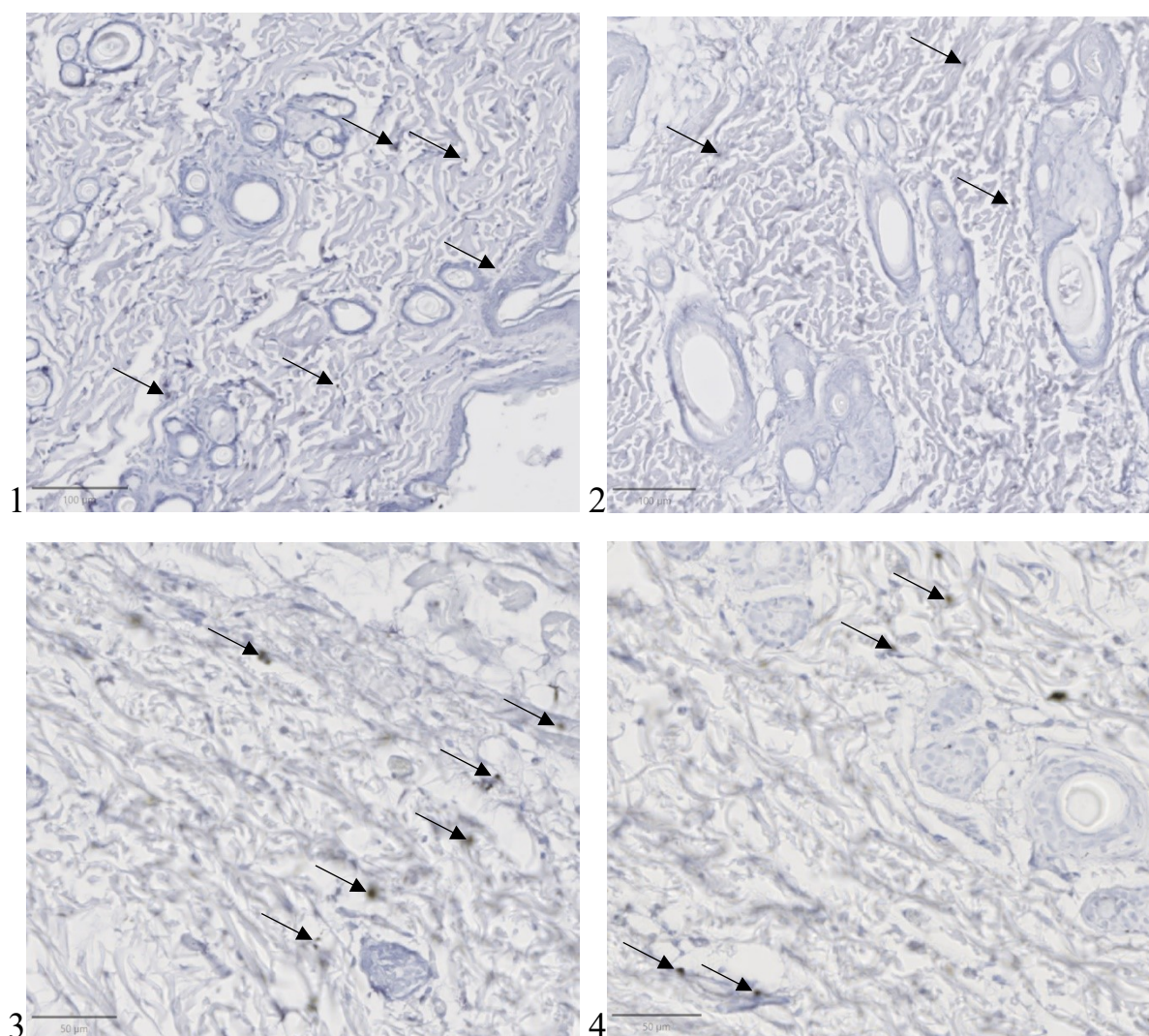
Максимальні значення експресії CD3 у контрольній групі реєструвалися на 7-му добу і досягали  $14,04 \pm 1,02$  % ( $p \leq 0,01$ ), що збігалось з проліферативною фазою загоєння різаної рани. Надалі, на 14-ту добу, відзначалося поступове зниження кількості CD3<sup>+</sup> клітин до  $7,37 \pm 0,95$  % ( $p \leq 0,001$ ), а на 30-ту добу цей показник становив  $6,08 \pm 0,66$  %, наближаючись до початкових значень інтактної шкіри.

В експериментальній групі (рис.3.8.), що зазнавала впливу хронічного соціального стресу, вже в інтактній шкірі базовий рівень CD3<sup>+</sup> клітин був достовірно нижчим і становив  $2,83 \pm 0,66$  % ( $p \leq 0,01$  порівняно з контролем). На 1-шу добу після нанесення різаної рани кількість CD3<sup>+</sup> клітин зменшувалася до  $1,96 \pm 0,44$  % ( $p \leq 0,01$ ), що вказувало на виражене пригнічення Т-клітинної ланки імунної відповіді на початкових етапах ранового процесу.

На 3-тю добу в експериментальній групі спостерігалось помірне підвищення експресії CD3 до  $4,15 \pm 0,62$  % ( $p \leq 0,001$  порівняно з попереднім терміном;  $p \leq 0,001$  порівняно з контролем). Пік накопичення CD3<sup>+</sup> клітин реєструвався на 7-му добу і становив  $6,63 \pm 0,89$  % ( $p \leq 0,05$ ;  $p \leq 0,001$  порівняно з контролем), однак ці значення були більш ніж у два рази нижчими за аналогічні показники контрольної групи.

У подальші терміни загоєння різаної рани в експериментальній групі відзначалося зниження кількості CD3<sup>+</sup> клітин до  $3,84 \pm 0,73$  % на 14-ту добу та

до  $2,58 \pm 0,57 \%$  ( $p \leq 0,001$ ) на 30-ту добу, що свідчило про тривале пригнічення Т-клітинної імунної відповіді в умовах хронічного соціального стресу.



**Рисунок 3.8** - Експресія CD3 (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показані мічені клітини), зб. 200 (1-2), зб. 300 (3-4):

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 3 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 3 день загоєння ран

Таким чином, динаміка CD3<sup>+</sup> клітин у контрольній групі характеризувалася чітко вираженим піком у проліферативну фазу загоєння

різаної рани з подальшою нормалізацією показників, тоді як в експериментальній групі спостерігалось стійке зниження як базального рівня CD3<sup>+</sup> клітин, так і амплітуди їх реактивного підвищення, що відображало порушення часової та кількісної координації адаптивної імунної відповіді.

### **3.3.3.2 Кількісна динаміка CD8<sup>+</sup> лімфоцитів в процесі репарації різнаних ран після впливу ХСС**

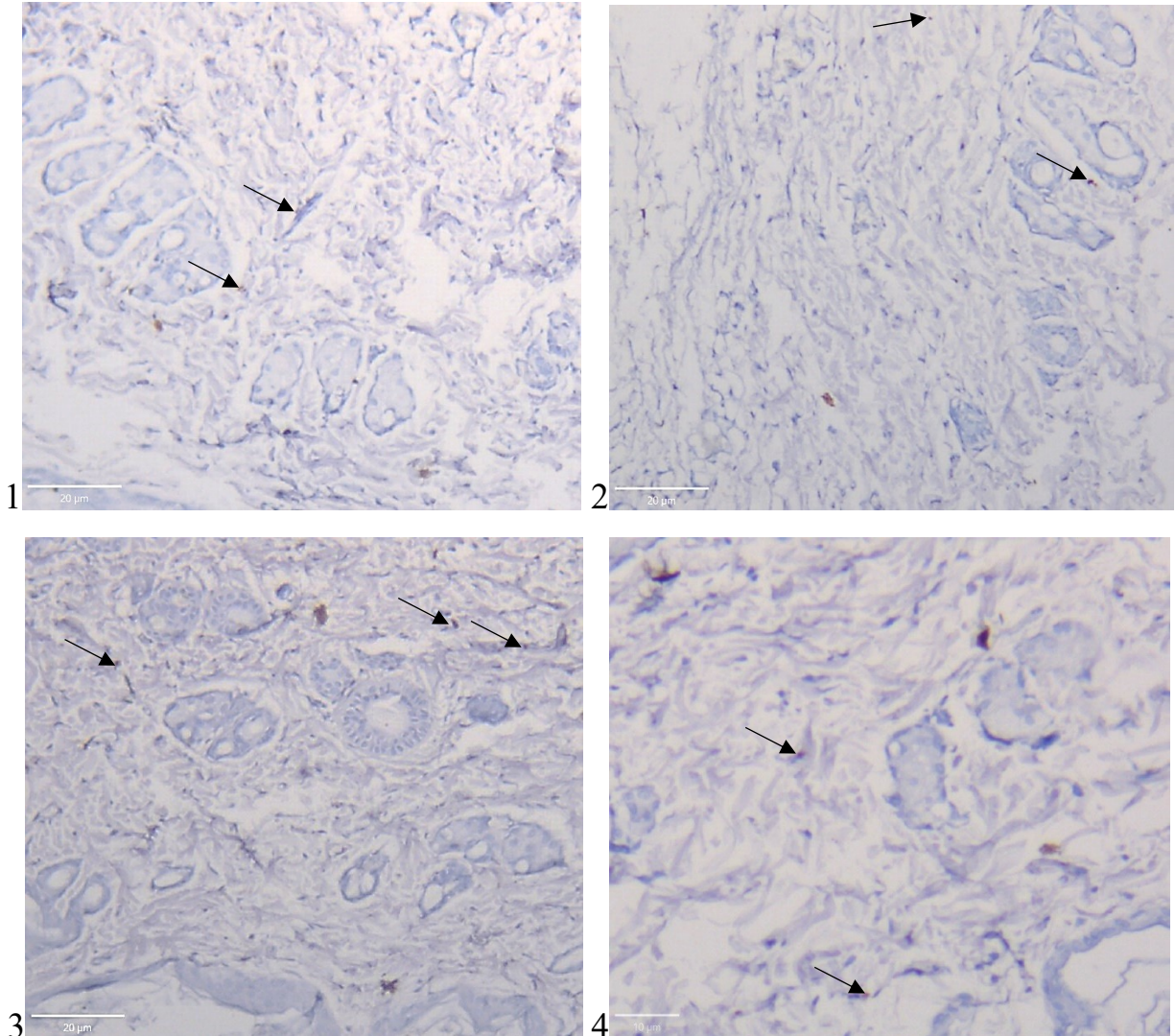
У контрольній групі в інтактній шкірі відносна кількість CD8<sup>+</sup> клітин становила  $1,62 \pm 0,21$  % (додаток А10). На 1-шу добу після нанесення різаної рани спостерігалася тенденція до зниження цього показника до  $1,05 \pm 0,44$  %, що відповідало ранній фазі запалення з переважанням клітин вродженого імунітету. Уже на 3-тю добу кількість CD8<sup>+</sup> клітин достовірно зростала до  $2,84 \pm 0,43$  % ( $p \leq 0,01$ ), що свідчило про активне залучення цитотоксичних Т-лімфоцитів у процес імунної регуляції ранового середовища.

Максимальні значення експресії CD8 у контрольній групі реєструвалися на 7-му добу і досягали  $5,62 \pm 0,89$  % ( $p \leq 0,05$ ), що збігалось з проліферативною фазою загоєння різаної рани. Надалі, на 14-ту добу, кількість CD8<sup>+</sup> клітин зменшувалася до  $2,22 \pm 0,47$  % ( $p \leq 0,01$ ), а на 30-ту добу — до  $1,71 \pm 0,31$  %, наближаючись до вихідного рівня інтактної шкіри.

В експериментальній групі, яка зазнавала впливу хронічного соціального стресу, вже в інтактній шкірі відзначалося зниження базового рівня CD8<sup>+</sup> клітин до  $1,22 \pm 0,24$  % (рис.3.9.), що було нижчим порівняно з контролем. На 1-шу добу після нанесення різаної рани цей показник зменшувався до  $0,84 \pm 0,39$  %, що свідчило про пригнічення цитотоксичної Т-клітинної відповіді на ранньому етапі запалення.

На 3-тю добу в експериментальній групі спостерігалось помірне підвищення кількості CD8<sup>+</sup> клітин до  $1,91 \pm 0,59$  %, однак ці значення не досягали рівня контролю. Пік експресії CD8 реєструвався на 7-му добу і становив  $3,24 \pm 0,69$  %, що було достовірно нижчим порівняно з контрольною групою

( $p \leq 0,05$ ). У подальшому, на 14-ту добу, кількість  $CD8^+$  клітин зменшувалася до  $1,87 \pm 0,44$  %, а на 30-ту добу — до  $1,18 \pm 0,25$  %, зберігаючи тенденцію до знижених значень упродовж усього періоду спостереження.



**Рисунок 3.9** - Експресія  $CD8$  (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показані мічені клітини), зб. 200 (1-3), зб. 400 (4):

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 3 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 3 день загоєння ран

Таким чином, у контрольній групі динаміка CD8<sup>+</sup> клітин характеризувалася чітко вираженим транзиторним підвищенням у проліферативну фазу загоєння різаної рани з подальшим поверненням до базального рівня. В умовах хронічного соціального стресу відзначалося зниження як початкового рівня CD8<sup>+</sup> клітин, так і амплітуди їх реактивного підвищення, що узгоджується з даними щодо CD3<sup>+</sup> клітин і свідчить про пригнічення цитотоксичної ланки адаптивного імунітету та порушення імунної координації ранового процесу.

### **3.3.2.3 Кількісна динаміка CD4<sup>+</sup> лімфоцитів в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС**

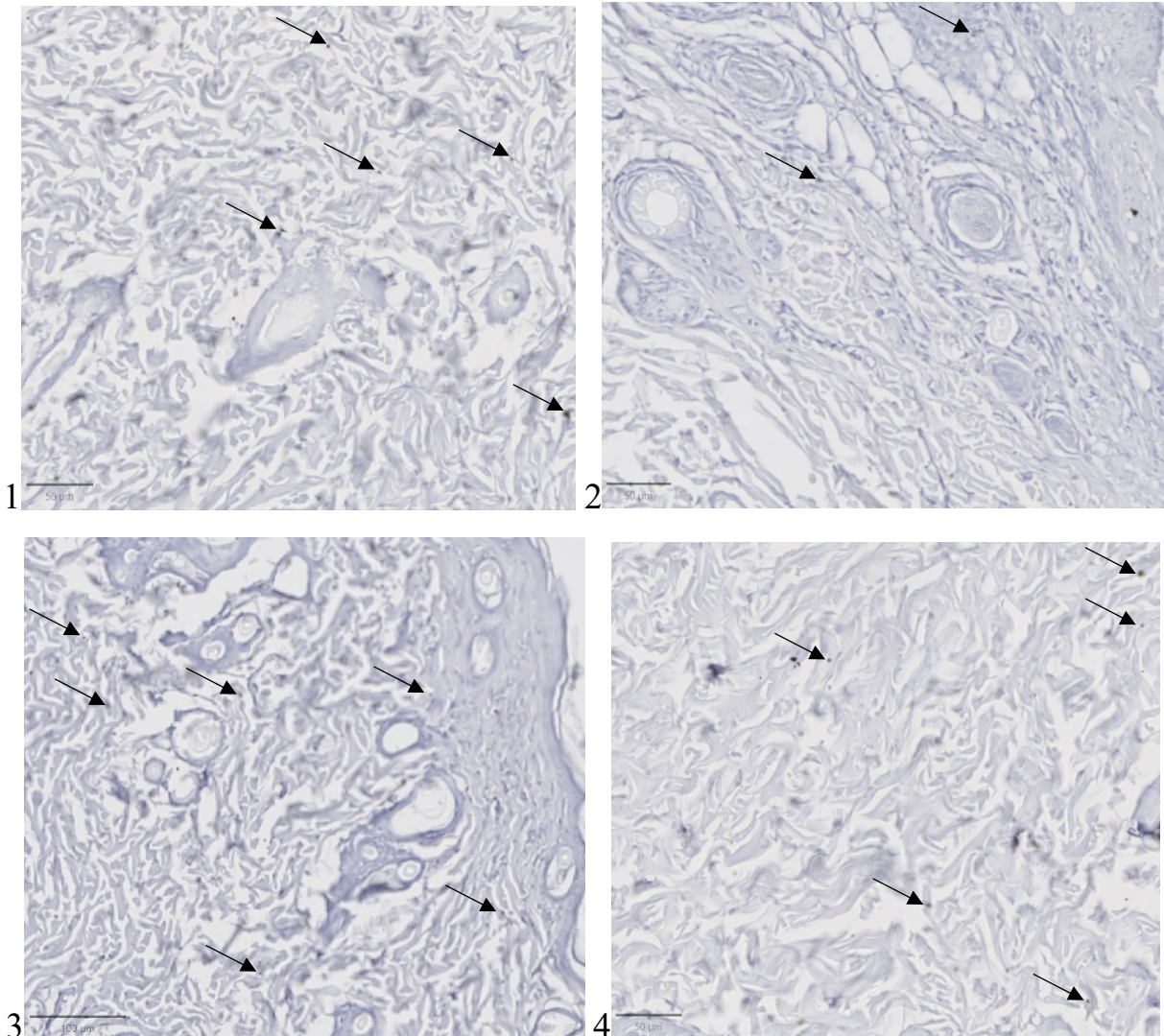
CD4<sup>+</sup> клітини є Т-хелперною субпопуляцією лімфоцитів, що відіграє провідну роль у регуляції запальної та репаративної відповіді. У даному дослідженні проаналізовано зміну відносної кількості CD4<sup>+</sup> клітин у шкірі щурів у різні терміни загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах.

У контрольній групі в момент нанесення рани (0 доба) відносна кількість CD4<sup>+</sup> клітин становила  $4,51 \pm 0,53$  % (додаток А11). На 1-шу добу після поранення відзначалося зниження цього показника до  $3,27 \pm 0,66$  %, що свідчило про тимчасове зменшення участі Т-хелперної ланки в ранню фазу запальної реакції.

На 3-тю добу загоєння різаної рани в контрольній групі спостерігалось достовірне зростання кількості CD4<sup>+</sup> клітин до  $6,85 \pm 0,83$  % ( $p \leq 0,01$ ) (рис.3.10.). Подальше підвищення цього показника реєструвалося на 7-му добу, коли він досягав  $7,74 \pm 1,06$  %, що відповідає активній фазі клітинної інфільтрації та проліферативних процесів. На 14-ту добу кількість CD4<sup>+</sup> клітин зменшувалася до  $5,02 \pm 0,72$  % ( $p \leq 0,05$ ), а на 30-ту добу — до  $4,27 \pm 0,52$  %, наближаючись до вихідних значень.

В експериментальній групі, що перебувала в умовах хронічного соціального стресу, вже на момент нанесення рани базальний рівень CD4<sup>+</sup> клітин

був статистично значуще нижчим і становив  $1,46 \pm 0,66 \%$  ( $p \leq 0,01$  порівняно з контролем). На 1-шу добу після поранення цей показник знижувався до  $0,75 \pm 0,51 \%$  ( $p \leq 0,01$ ).



**Рисунок 3.10** - Експресія CD4 (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показані мічені клітини), зб. 200 (3), зб. 400 (1,2,4):

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 3 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 3 день загоєння ран

На 3-тю добу експерименту кількість  $CD4^+$  клітин зростала до  $2,08 \pm 0,79$  % ( $p \leq 0,001$  порівняно з контролем), а на 7-му добу досягала максимального значення —  $3,12 \pm 0,87$  % ( $p \leq 0,01$ ). Однак навіть у період пікової активації цей показник залишався більш ніж удвічі нижчим, ніж у контрольній групі. У подальші терміни загоєння різаної рани кількість  $CD4^+$  клітин зменшувалася до  $1,52 \pm 0,69$  % ( $p \leq 0,01$ ) на 14-ту добу та до  $1,25 \pm 0,56$  % ( $p \leq 0,001$ ) на 30-ту добу.

Таким чином, у контрольній групі динаміка  $CD4^+$  клітин характеризувалася чітко вираженим підвищенням у період 3–7-ї доби загоєння різаної рани з подальшою нормалізацією показників. В умовах хронічного соціального стресу відзначалося суттєве зниження як вихідного рівня  $CD4^+$  клітин, так і амплітуди їх реактивного підвищення впродовж усього періоду спостереження, що свідчило про пригнічення Т-хелперної ланки адаптивного імунітету.

#### **3.3.2.4 Кількісна динаміка індексу $CD4/CD8$ в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС**

В шкірі контрольних тварин до нанесення рани індекс  $CD4/CD8$  становив  $2,81 \pm 0,57$ , що відображало фізіологічне переважання Т-хелперної ланки імунної відповіді. У тварин експериментальної групи цей показник був статистично значуще нижчим і становив  $1,17 \pm 0,60$  ( $p \leq 0,001$ ), що свідчило про початкове глибоке порушення імунорегуляторного балансу за умов хронічного соціального стресу.

На 1-шу добу після нанесення різаної рани в контрольній групі спостерігалось підвищення індексу  $CD4/CD8$  до  $3,20 \pm 0,87$ , що відображало активацію Т-хелперної відповіді у фазу гострого запалення. В експериментальній групі, навпаки, індекс знижувався до  $0,88 \pm 0,69$ , залишаючись істотно нижчим порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ ).

На 3-тю добу загоєння різаної рани індекс  $CD4/CD8$  у контрольних тварин знижувався до  $2,43 \pm 0,48$ , що відповідало посиленню цитотоксичної Т-клітинної

відповіді. В експериментальній групі значення індексу становило  $1,05 \pm 0,53$  ( $p \leq 0,001$  порівняно з контролем).

Найнижчі значення індексу CD4/CD8 у контрольній групі відзначалися на 7-му добу, коли він достовірно падав до  $1,38 \pm 0,27$  ( $p \leq 0,001$  порівняно з попереднім терміном спостереження), що відповідало проліферативній фазі загоєння та піку клітинної інфільтрації. В експериментальній групі індекс був ще нижчим і становив  $0,97 \pm 0,37$  ( $p \leq 0,01$  порівняно з контролем), що вказувало на збереження вираженого дисбалансу між регуляторною та ефекторною ланками імунітету.

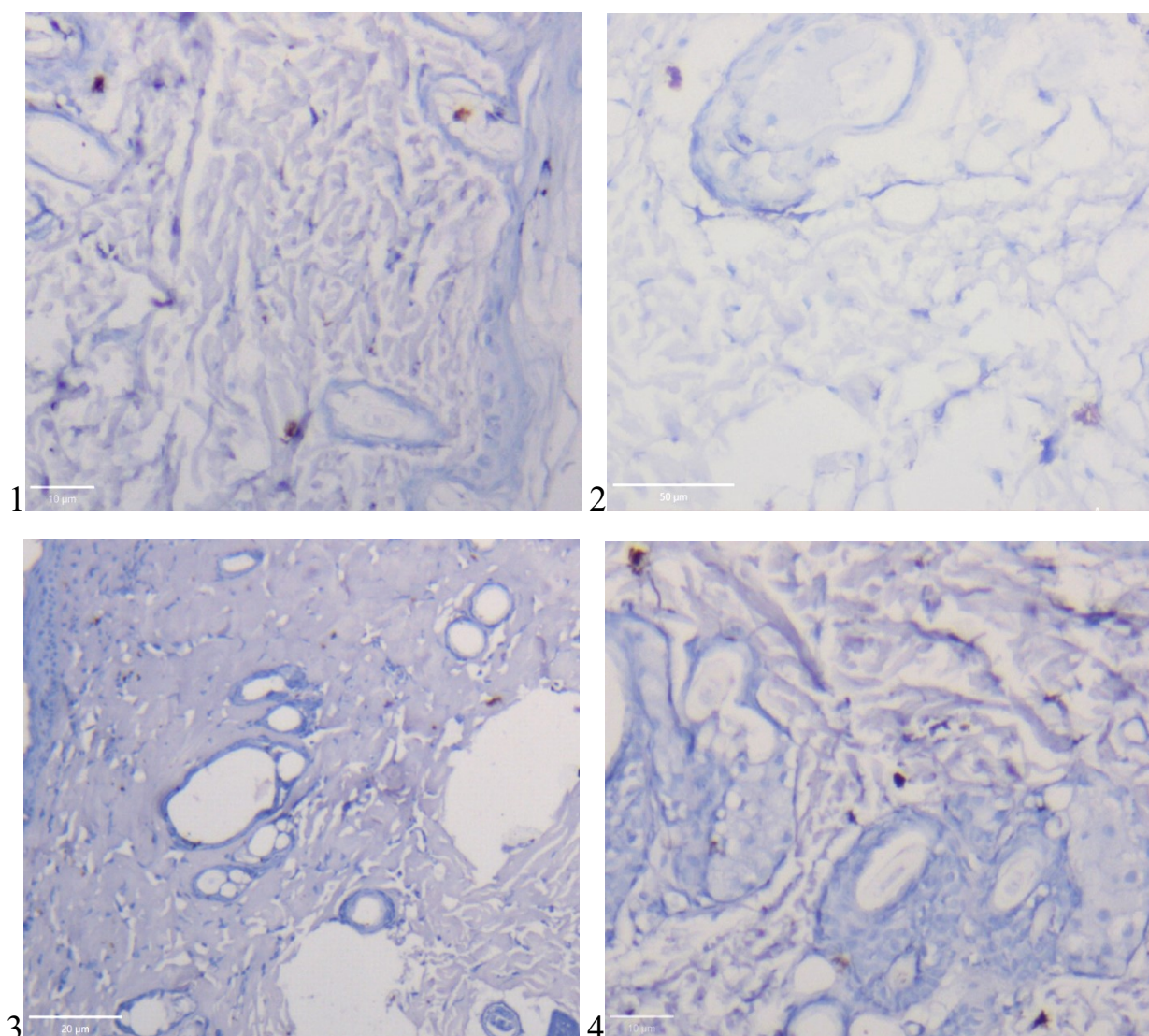
У подальші терміни спостереження в контрольній групі індекс CD4/CD8 почав відновлюватися, статистично значуще зростаючи до  $2,27 \pm 0,51$  на 14-ту добу ( $p \leq 0,001$ ) та досягаючи  $2,47 \pm 0,52$  на 30-ту добу. Натомість в експериментальній групі показники залишалися критично низькими ( $0,83 \pm 0,46$  на 14-ту добу та  $1,09 \pm 0,57$  на 30-ту добу), достовірно поступаючись контрольним значенням протягом усього періоду загоєння ( $p \leq 0,001$ ), що свідчило про тривале та стійке порушення імунорегуляторного контролю в тканинах різаної рани.

### **3.3.2.5 Кількісна динаміка CD20<sup>+</sup> лімфоцитів в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС**

CD20 є специфічним маркером В-лімфоцитів і використовується для оцінки участі гуморальної ланки адаптивного імунітету в перебігу ранового процесу. У даному дослідженні проаналізовано динаміку CD20<sup>+</sup> клітин у шкірі щурів у різні терміни загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах.

У контрольній групі в інтактній шкірі відносна кількість CD20<sup>+</sup> клітин становила  $0,55 \pm 0,29$  % (додаток А13), що відповідало низькому фізіологічному рівню В-лімфоцитарної інфільтрації дерми. На 1-шу добу після нанесення різаної

рани спостерігалось помірне підвищення цього показника до  $0,84 \pm 0,36 \%$ , однак без різкої активації гуморальної ланки імунітету.



**Рисунок 3.11** - Експресія CD20 (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показані мічені клітини), зб. 200 (2), зб. 300 (3), зб. 400 (1,4):

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 3 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 3 день загоєння ран

На 3-тю добу загоєння різаної рани кількість CD20<sup>+</sup> клітин у контрольній групі зростала до  $1,21 \pm 0,44$  % (рис. 3.11), а максимальних значень досягала на 7-му добу —  $1,51 \pm 0,56$  %, що відповідало проліферативній фазі ранового процесу. У подальшому, на 14-ту добу, відзначалося зниження кількості CD20<sup>+</sup> клітин до  $1,07 \pm 0,35$  %, а на 30-ту добу — до  $0,62 \pm 0,24$  %, наближаючись до вихідних значень інтактної шкіри.

В умовах хронічного соціального стресу базальний рівень CD20<sup>+</sup> клітин в інтактній шкірі був нижчим і становив  $0,36 \pm 0,14$  %, що свідчило про зниження активності В-лімфоцитарної ланки імунітету. Після нанесення різаної рани на

1-шу добу цей показник збільшувався лише до  $0,48 \pm 0,27$  %, залишаючись нижчим порівняно з контролем.

На 3-тю та 7-му добу експерименту кількість CD20<sup>+</sup> клітин зростала до  $0,68 \pm 0,33$  % та  $0,75 \pm 0,33$  % відповідно, що було майже вдвічі нижчим порівняно з відповідними значеннями контрольної групи. У подальші терміни спостереження в експериментальній групі відзначалося поступове зменшення кількості CD20<sup>+</sup> клітин до  $0,54 \pm 0,29$  % на 14-ту добу та  $0,39 \pm 0,15$  % на 30-ту добу.

Таким чином, у контрольній групі динаміка CD20<sup>+</sup> клітин характеризувалася помірним транзиторним підвищенням у проліферативну фазу загоєння різаної рани з подальшою нормалізацією показників. В умовах хронічного соціального стресу спостерігалось зниження як вихідного рівня CD20<sup>+</sup> клітин, так і амплітуди їх реактивного зростання, що свідчило про пригнічення гуморальної ланки адаптивного імунітету та узгоджувалося зі зменшенням Т-клітинної та макрофагальної відповіді.

### **3.4 Участь клітин вродженого імунітету резидентного тканинного типу (мастоцити, еозинофіли) в процесі репарації різаних ран після впливу ХСС**

#### **3.4.1 Кількісна і функціональна динаміка мастоцитів у процесі з загоєння різаних ран після впливу ХСС**

Аналіз кількісного вмісту мастоцитів на одиницю площі ( $0,01 \text{ мм}^2$ ) у прирановій зоні шкіри протягом 30 діб спостереження виявив суттєві відмінності у перебігу реакції між контрольною та експериментальною групами.

Вже у вихідному стані, до нанесення різаної рани, у тварин, що перебували під впливом хронічного соціального стресу, кількість мастоцитів становила  $9,47 \pm 0,23$  клітин на  $0,01 \text{ мм}^2$  (додаток А14). Цей показник статистично високо значущо ( $p \leq 0,001$ ) перевищував значення інтактного контролю ( $0,95 \pm 0,03$  клітин на  $0,01 \text{ мм}^2$ ) майже в 10 разів. Така виражена різниця свідчить про потужну попередню мобілізацію клітинного пулу та наявність сформованого прозапального фону під дією стресового чинника.

У ранню фазу запального процесу (1–3 доба) динаміка змін у досліджуваних групах мала протилежну спрямованість. У контрольній групі спостерігалось фізіологічне збільшення щільності мастоцитів з  $2,48 \pm 0,06$  клітин на  $0,01 \text{ мм}^2$ . У ранню фазу запального процесу (1–3 доба) динаміка змін у досліджуваних групах мала протилежну спрямованість. У контрольній групі спостерігалось фізіологічне збільшення щільності мастоцитів з  $2,48 \pm 0,06$  клітин на  $0,01 \text{ мм}^2$  на 1-шу добу до  $2,65 \pm 0,04$  на  $0,01 \text{ мм}^2$  на 3-тю добу.

Натомість у групі хронічного стресу зафіксовано різке падіння чисельності мастоцитів до  $1,25 \pm 0,06$  клітин на  $0,01 \text{ мм}^2$  на 1-шу добу. Зниження рівня мастоцитів у стресованих тварин нижче контрольних значень у цей період є статистично значущим ( $p \leq 0,01$ ). На 3-тю добу показник у експериментальній групі дещо підвищився до  $1,85 \pm 0,08$  на  $0,01 \text{ мм}^2$ , проте залишався достовірно нижчим за рівень контролю, що вказує на масивну дегрануляцію або виснаження резервів мастоцитів.

На етапі формування грануляційної тканини (7–14 доба) розбіжності між групами стали найбільш показовими. У контрольній групі кількість мастоцитів продовжувала зростати, досягаючи пікових значень  $4,38 \pm 0,20$  на 7-му добу та  $4,61 \pm 0,07$  на 14-ту добу на  $0,01 \text{ мм}^2$ . У тварин, підданих стресу, цей показник залишався на стабільно низькому рівні:  $2,16 \pm 0,30$  клітин на  $0,01 \text{ мм}^2$  на 7-му добу та  $2,00 \pm 0,06$  на 14-ту добу. Різниця між контролем та експериментом у ці терміни була високо значущою ( $p \leq 0,001$ ), демонструючи глибоке пригнічення проліферативної активності мастоцитів у стресованих тварин.

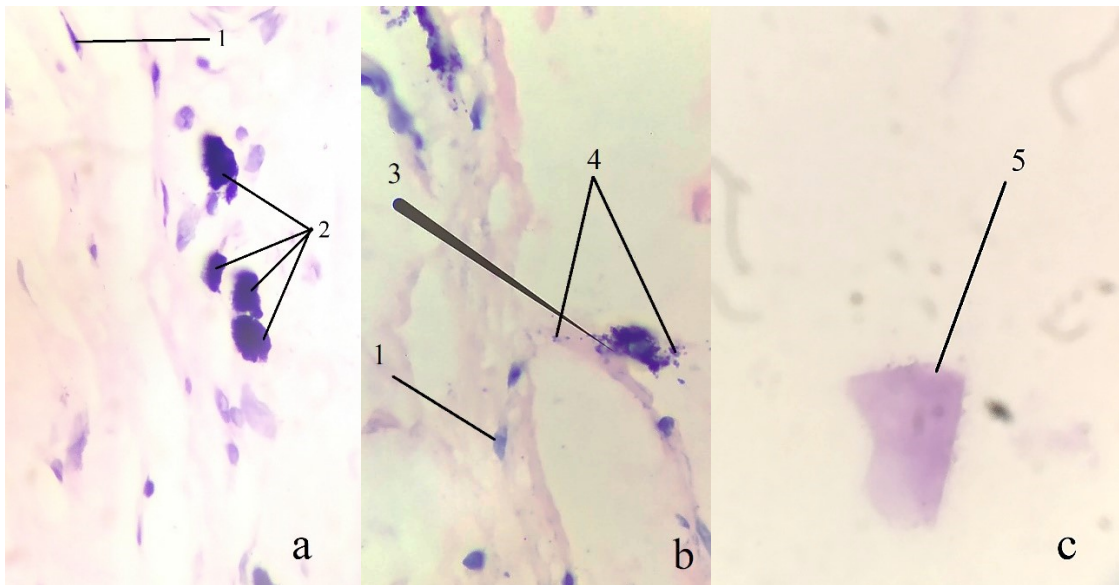
На 30-ту добу спостереження, що відповідає фазі ремоделювання рубця, кількість мастоцитів у контрольній групі нормалізувалася до рівня  $0,96 \pm 0,03$  на  $0,01 \text{ мм}^2$ , фактично повернувшись до вихідних значень інтактної шкіри. Водночас, у групі хронічного стресу було відмічено повторний статистично значущий підйом кількості мастоцитів до  $5,68 \pm 0,22$  клітин на  $0,01 \text{ мм}^2$ . Це значення в 5,9 рази перевищує показник контрольної групи на цьому етапі ( $p \leq 0,001$ ), що свідчить про перехід запального процесу в хронічну форму та незавершеність регенерації тканин після довготривалого впливу соціального стресу.

В гістологічних зразках шкіри контрольних тварин та тварин, що піддавалися тривалому впливу соціального стресу в процесі загоєння ран було ідентифіковано такі типи мастоцитів (рис. 3.12):

Тип 1 - клітини з щільним і дифузним розташуванням гранул у цитоплазмі;

Тип 2 - частково дегранульовані клітини з ознаками порушення цілісності плазмалеми (блебінг);

Тип 3 деформовані клітини, що мають вигляд блакитнуватих плям, повністю дегранульовані, часто з відсутнім ядром або його залишками.



**Рисунок 3.12** - Типи дегрануляції мастоцитів. Забарвлення толуїдиновим блакитним, зб. 1000: 1 (а), 2 (b), 3 (с): фібробласт (1), мастоцити без дегрануляції (2), мастоцити з частковою дегрануляцією (3), гранули в позаклітинній речовині (4), дегранульовані, деформовані мастоцити (5).

У контрольній групі тварин в інтактній шкірі до нанесення рани переважали мастоцити 1 типу (додаток А15), частка яких становила 93,3 %, тоді як частка мастоцитів 2 типу була мінімальною і дорівнювала 6,7 %, а клітини 3 типу не виявлялися. Такий розподіл відповідає фізіологічному стану тканинного гомеостазу.

У першу добу після нанесення рани (стадія гострого запалення) в контрольній групі відзначалося різке функціональне перерозподілення мастоцитів: частка клітин 1 типу зменшувалася, натомість з'являлися мастоцити 2 та 3 типів. Максимальна дегрануляційна активність спостерігалася саме в цей період. На 3-тю добу загоєння рани активність дегрануляції зменшувалася: мастоцити 1 та 2 типів становили по 50 %, клітини 3 типу були відсутні.

У проліферативну фазу (7-ма доба) частка мастоцитів 1 типу зростала до 81,8 % ( $p < 0,001$ ), тоді як клітини 2 типу становили лише 18,2 % ( $p < 0,01$ ). На 14-ту добу всі виявлені мастоцити належали до 1 типу (100 %,  $p < 0,05$ ), і така картина зберігалася на стадії ремоделювання (30-та доба).

У тварин експериментальної групи, які зазнали впливу хронічного соціального стресу, функціональні характеристики мастоцитів істотно відрізнялися від контролю вже в інтактній шкірі. Частка клітин 2 типу до нанесення рани зростала до 36,4 %, що свідчило про їх підвищену базальну активацію (додаток А15).

На 1-шу добу після травми частка мастоцитів 3 типу становила 63,6 %, а 2 типу — 9,1 %, що достовірно перевищувало відповідні показники контрольної групи. На 3-тю добу частка клітин 3 типу зростала до 72,3 %, а 2 типу — до 15,1 %. У проліферативну фазу (7-ма доба) дегрануляційна активність дещо зменшувалася, проте залишалася високою: мастоцити 2 типу становили 34,8 %, 3 типу — 30,4 %. На 14-ту добу всі дегранульовані клітини були представлені виключно 2 типом (66,7 %). Навіть на 30-ту добу загоєння рани частка мастоцитів 2 типу залишалася високою — 53,9 %, що свідчить про пролонговану активацію клітин.

Індекс дегрануляції (ІД) мастоцитів у контрольній групі в інтактній шкірі мав низьке фонове значення і становив  $6,66 \pm 0,11$  % (додаток А16). На 1-шу добу після нанесення рани ІД різко зростав до  $74,30 \pm 1,33$  % ( $p \leq 0,001$ ), що відповідало стадії гострого запалення. На 3-тю добу індекс знижувався до  $50,00 \pm 0,62$  % ( $p \leq 0,001$ ), а на 7-му добу — до  $18,18 \pm 0,25$  % ( $p \leq 0,001$ ). На 14-ту добу ІД дорівнював 0 %, що свідчило про повну відсутність дегрануляції, і такий стан зберігався на 30-ту добу.

В експериментальній групі ІД був достовірно підвищеним уже до нанесення рани і становив  $36,37 \pm 0,81$  % ( $p \leq 0,001$ ) порівняно з контролем. На 1-шу добу після травми він досягав  $72,73 \pm 1,10$  % ( $p \leq 0,001$ ), а на 3-тю добу — максимального значення  $87,40 \pm 1,34$  % ( $p \leq 0,05$ ;  $p \leq 0,001$  до контролю). У подальшому індекс знижувався, проте залишався високим:  $65,22 \pm 0,93$  % на 7-му добу,  $66,67 \pm 0,72$  % на 14-ту добу та  $53,85 \pm 0,61$  % на 30-ту добу, що свідчило про хронізацію репаративного процесу.

У контрольній групі середній розмір мастоцитів 1 типу в інтактній шкірі становив  $5,1 \pm 0,3$  мкм (додаток А17). На 1-шу добу він зменшувався до

4,6 ± 0,5 мкм, на 3-тю добу зростав до 5,8 ± 0,3 мкм (p<0,001), а на 7-му добу становив 5,7 ± 0,7 мкм. Найменші значення були зафіксовані на 14-ту добу — 3,9 ± 0,6 мкм (p<0,001), після чого на 30-ту добу розмір клітин збільшувався до 6,6 ± 0,5 мкм (p<0,001).

Розміри мастоцитів 2 типу в контролі до травми становили 3,5 ± 0,09 мкм (додаток А17). У період запалення вони зростали до 5,2 ± 0,07 мкм (1-ша доба) та 5,5 ± 0,1 мкм (3-тя доба), після чого зменшувалися до 4,4 ± 0,1 мкм (7-ма доба). На 14-ту та 30-ту добу клітини 2 типу не виявлялися.

Мастоцити 3 типу в контролі реєструвалися лише на 1-шу добу і мали значно більші розміри — 10,2 ± 0,1 мкм (додаток А16).

В експериментальній групі мастоцити 1 типу в інтактній шкірі були достовірно більшими — 7,5 ± 0,5 мкм (p<0,001). На 1-шу добу їх розмір становив 6,8 ± 0,7 мкм, на 3-тю — 5,7 ± 0,4 мкм (p<0,001), на 7-му добу зменшувався до 4,5 ± 0,5 мкм (p<0,05), після чого різко зростав на 14-ту добу до 7,9 ± 0,8 мкм (p<0,001) та знижувався до 5,9 ± 0,9 мкм на 30-ту добу.

Мастоцити 2 типу в групі тварин, що перенесли хронічний соціальний стрес мали найбільші розміри в інтактній шкірі — 7,9 ± 0,08 мкм, які зростали до 9,1 ± 0,2 мкм на 1-шу добу та 7,5 ± 0,1 мкм на 3-тю добу. На 7-му добу спостерігалось різке зменшення розмірів до 3,1 ± 0,08 мкм (p<0,001), після чого вони знову зростали до 8,2 ± 0,07 мкм на 14-ту добу та 8,5 ± 0,05 мкм на 30-ту добу.

Мастоцити 3 типу в експериментальній групі мали найбільші лінійні розміри: 11,5 ± 0,3 мкм на 1-шу добу, 17,2 ± 1,3 мкм на 3-тю добу та 24,1 ± 3,5 мкм на 7-му добу.

У контрольній групі до нанесення рани між розміром мастоцитів та типом дегрануляції спостерігався сильний негативний кореляційний зв'язок (r = -0,98; p<0,001) (табл. 3.4). На 1-шу добу після травми кореляція змінювала напрямок на позитивний (r = 0,91; p<0,001). На 3-тю добу зв'язок був слабким і недостовірним (r = -0,18), а на 7-му добу знову ставав негативним і достовірним (r = -0,85;

$p < 0,05$ ). На 14-ту та 30-ту добу кореляційний аналіз не проводився у зв'язку з наявністю лише мастоцитів 1 типу.

В експериментальній групі кореляційний зв'язок мав переважно позитивний характер протягом усього дослідження:  $r = 0,57$  ( $p < 0,001$ ) до травми,  $r = 0,98$  ( $p < 0,01$ ) на 1-шу добу,  $r = 0,92$  ( $p < 0,01$ ) на 3-тю добу,  $r = 0,82$  ( $p < 0,01$ ) на 7-му добу. На 14-ту добу кореляція знижувалася до  $r = 0,31$ , а на 30-ту добу знову зростала до  $r = 0,93$  ( $p < 0,01$ ).

Таблиця 3.4

**Кореляційний зв'язок між розмірами мастоцитів (мкм) та типами їх дегрануляції (1, 2, 3) у контрольній та експериментальній групах тварин,  $r \pm SD$ .**

Група	День експерименту					
	0	1	3	7	14	30
Контроль	-0.98 ± 0.0001***	0.91 ± 0.0034***	-0.18 ± 0.0201	-0.85 ± 0.0974*	-	-
Експеримент	0.57 ± 0.0103***	0.98 ± 0.0001**	0.92 ± 0.0031**	0,82 ± 0.0052**	0.31 ± 0.0211	0.93 ± 0.0033**

Примітки: \* - зміни статистично значущі ( $p \leq 0,05$ );

\*\* - зміни статистично значущі ( $p \leq 0,01$ );

\*\*\* - зміни статистично значущі ( $p \leq 0,001$ );

- всі мастоцити були 1 типу

### 3.4.2 Кількісна динаміка еозинофілів під час загоєння різаних ран після впливу ХСС

Еозинофіли відіграють важливу роль у регуляції тканинного гомеостазу, ремоделюванні міжклітинного матриксу та взаємодії з мастоцитами, особливо в

умовах нейроімунних порушень. У зв'язку з цим було проведено аналіз змін їх кількості в дермі шкіри щурів у різні терміни загоєння хірургічної рани.

У контрольній групі кількість еозинофілів у інтактній шкірі була мінімальною та становила  $0,02 \pm 0,14$  клітин/мм<sup>2</sup> (додаток А18), що відповідає фізіологічно низькому рівню присутності цих клітин у дермі. На 1-шу добу після нанесення рани кількість еозинофілів дещо зростала до  $0,08 \pm 0,12$  клітин/мм<sup>2</sup>, однак ці зміни не мали статистично значущого характеру.

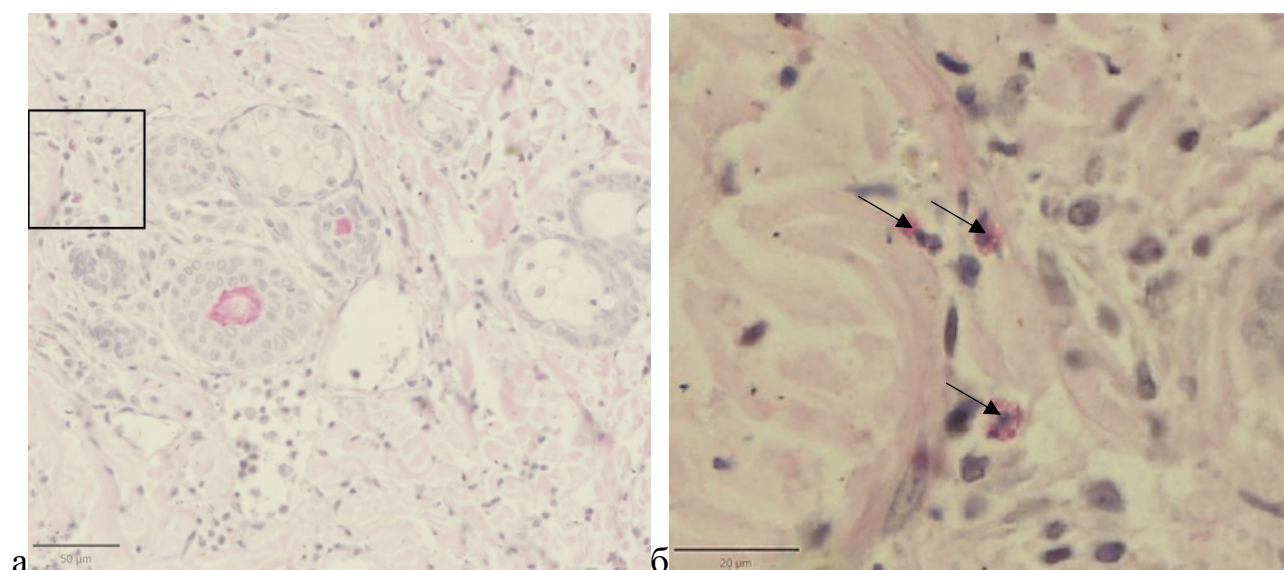
На 3-тю добу загоєння рани кількість еозинофілів у контрольній групі становила  $0,03 \pm 0,10$  клітин/мм<sup>2</sup>, що супроводжувалося незначними, але статистично значущими змінами порівняно з попереднім періодом ( $p \leq 0,05$ ). У подальші терміни спостереження — на 7-му, 14-ту та 30-ту добу — кількість еозинофілів залишалася стабільно низькою ( $0,02 \pm 0,08$ ;  $0,02 \pm 0,10$  та  $0,02 \pm 0,10$  клітин/мм<sup>2</sup> відповідно), що свідчило про відсутність істотної участі еозинофілів у репаративному процесі за нормальних умов.

В експериментальній групі, яка зазнавала впливу хронічного соціального стресу, у інтактній шкірі відзначалося різке та статистично значуще збільшення кількості еозинофілів до  $7,13 \pm 0,67$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$  порівняно з контролем) (рис. 3.12). Це може вказувати на розвиток стрес-індукованого еозинофільного компонента тканинної запальної відповіді ще до нанесення хірургічного ушкодження.

На 1-шу добу після травми кількість еозинофілів у експериментальній групі зменшувалася до  $4,22 \pm 0,46$  клітин/мм<sup>2</sup>, проте залишалася достовірно вищою, ніж у контрольній групі ( $p \leq 0,001$ ), і характеризувалася статистично значущими змінами порівняно з попереднім терміном спостереження ( $p \leq 0,001$ ). На 3-тю добу відбувалося подальше різке зниження кількості еозинофілів до  $0,53 \pm 0,28$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,001$  до контролю).

На 7-му добу загоєння рани кількість еозинофілів у тварин експериментальної групи становила  $0,16 \pm 0,12$  клітин/мм<sup>2</sup>, що все ще залишалася статистично значущо вищим за контрольні показники ( $p \leq 0,05$ ), однак свідчило про швидке згасання еозинофільної реакції. На 14-ту добу цей показник знижувався до  $0,03$

$\pm 0,10$  клітин/мм<sup>2</sup> ( $p \leq 0,05$ ), а на 30-ту добу — до  $0,02 \pm 0,08$  клітин/мм<sup>2</sup>, що відповідало рівню контрольної групи.



**Рисунок 3.13** - Мікрофотографії шкіри щурів експериментальної групи до нанесення ран. Забарвлення гематоксилином та еозином: а — оглядова мікрофотографія (зб. 600). Чорною рамкою виділено ділянку, представлену на фрагменті б; б - виражена інфільтрацією еозинофілів (показані стрілочками) (зб. 1000).

Таким чином, за умов хронічного соціального стресу виявлено виражену транзиторну еозинофільну інфільтрацію шкіри, яка була максимальною в інтактному стані та на ранніх етапах загоєння рани (0–1 доба) і швидко знижувалася в подальші терміни. Такий характер динаміки може свідчити про участь еозинофілів у формуванні ранньої стрес-індукованої запальної відповіді та їх можливу функціональну взаємодію з мастоцитами, що разом впливає на перебіг запально-репаративного процесу шкіри.

### **3.5 Кореляційний аналіз залученості імунокомпетентних клітин в процес ранозагоювання в умовах ХСС**

У контрольній групі спостерігали чітку синхронізацію між окремими показниками. Найсильніший прямий зв'язок зафіксовано між динамікою нейтрофілів та еозинофілів: коефіцієнт кореляції досягав одиниці ( $r = 0,98$ ) із високою статистичною значущістю ( $p \leq 0,001$ ) (додаток А19). Також сильну позитивну кореляцію виявлено в парі лімфоцити — макрофаги ( $r = 0,9$ ;  $p \leq 0,01$ ). Мастоцити демонструють помітний позитивний зв'язок із макрофагами ( $r = 0,79$ ) та лімфоцитами ( $r = 0,67$ ), проте на цій вибірці він не досяг рівня статистичної значущості.

В експериментальній групі структура кореляційних зв'язків суттєво змінила напрямок. Кореляція між нейтрофілами та еозинофілами, яка була визначальною в контролі, фактично зникає ( $r = 0,18$ ) (додаток А19) і стає незначущою. При цьому зв'язок між лімфоцитами та макрофагами залишається стабільно високим ( $r=0,96$ ;  $p \leq 0,01$ ), як і в інтактних тварин. Щодо мастоцитів, то вектор їхньої взаємодії змінюється на протилежний: спостерігається помірний зворотний зв'язок із нейтрофілами ( $r = -0,56$ ) та макрофагами ( $r = -0,56$ ), а також прямий — з еозинофілами ( $r = 0,61$ ).

### **3.6 Імуногістохімічні маркери молекулярно-клітинних взаємодій в процесі загоєння різаних ран в умовах ХСС**

#### **3.6.1 Динаміка маркерів апоптозу в процесі загоєння різаних ран після впливу ХСС**

У контрольній групі до нанесення різаної рани експресія каспази-3 у дермі була низькою і становила  $0,30 \pm 0,03$  % (Додаток А20). Уже на 1-шу добу після нанесення рани спостерігалось її достовірне зростання до  $0,68 \pm 0,05$  % ( $p < 0,001$ ), що відображало активацію апоптотичних процесів у ранню фазу запалення. Максимальний рівень каспази-3 реєструвався на 3-тю добу ( $1,98 \pm 0,20$  %,

$p < 0,001$ ), після чого на 7-му добу показник дещо знижувався до  $1,61 \pm 0,14$  %. У подальші терміни загоєння відзначалося поступове зменшення експресії каспази-3 до  $0,71 \pm 0,06$  % ( $p < 0,01$ ) на 14-ту добу та  $0,69 \pm 0,06$  % на 30-ту добу.

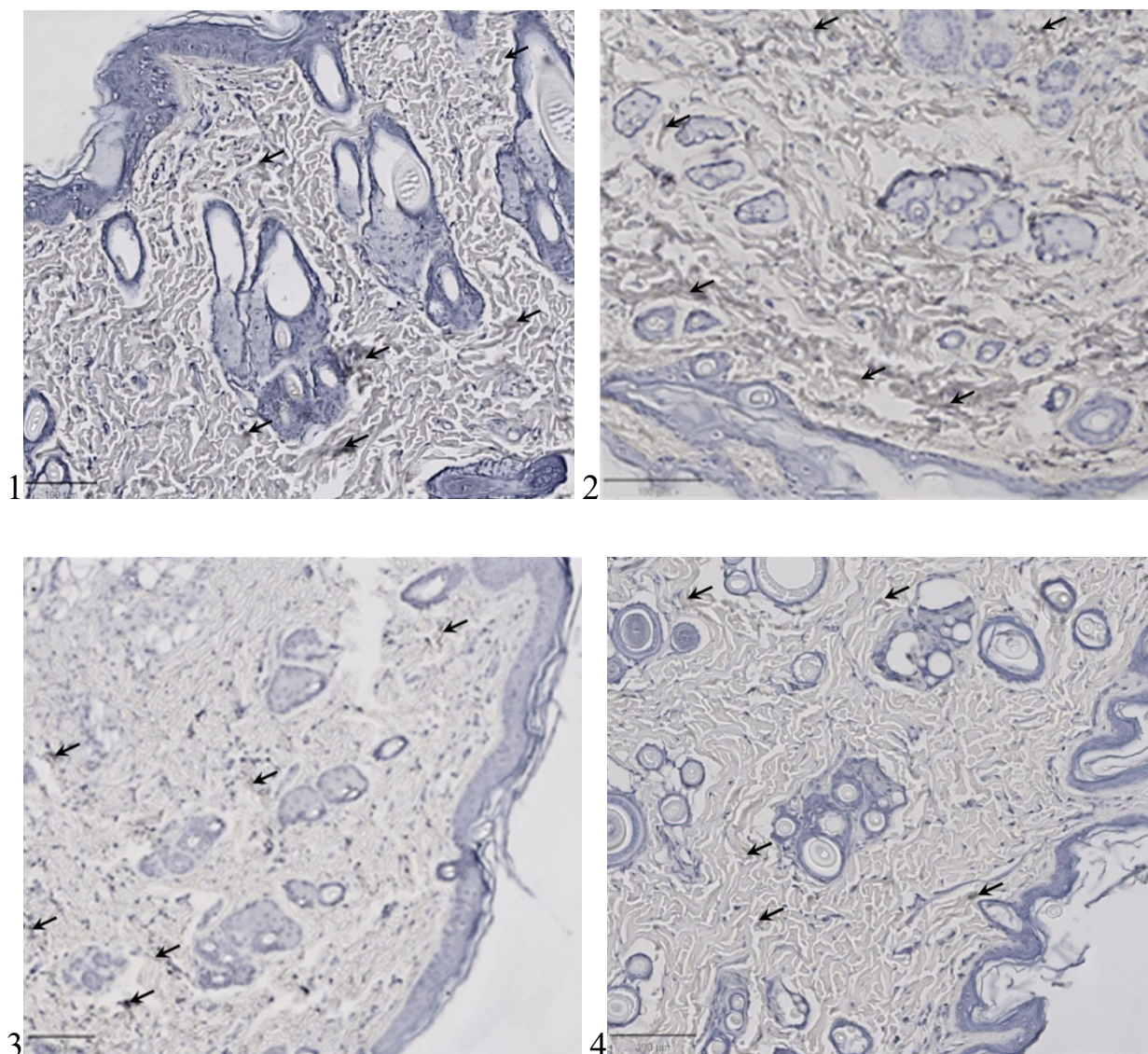
В експериментальній групі в умовах хронічного соціального стресу базальний рівень каспази-3 у дермі був значно вищим уже до поранення і становив  $8,28 \pm 0,51$  % ( $p < 0,001$  порівняно з контролем) (рис.3.14.). Протягом перших 3 діб після нанесення рани показник залишався стабільно високим, досягаючи  $9,95 \pm 1,00$  % на 3-тю добу. На 7-му добу спостерігалось достовірне зниження експресії каспази-3 до  $5,83 \pm 0,58$  % ( $p < 0,001$ ), однак навіть на 14-ту ( $3,12 \pm 0,31$  %) і 30-ту ( $3,11 \pm 0,31$  %) добу її рівень суттєво перевищував контрольні значення ( $p < 0,001$ ).

У контрольній групі експресія каспази-3 у волосяних фолікулах до поранення становила  $1,16 \pm 0,12$  % і різко знижувалася на 1-шу добу до  $0,15 \pm 0,02$  %. Надалі показник коливався, знижуючись на 7-му добу ( $0,45 \pm 0,05$  %,  $p < 0,001$ ) та поступово відновлюючись до  $1,09 \pm 0,11$  % ( $p < 0,05$ ) на 30-ту добу.

В експериментальній групі до поранення рівень каспази-3 був нижчим ( $0,79 \pm 0,08$  %,  $p < 0,05$ ), однак на 1–3 добу відзначалося його різке зростання з максимумом на 3-тю добу ( $2,93 \pm 0,29$  %,  $p < 0,001$ ). У подальшому спостерігалось зниження експресії з мінімальними значеннями на 14-ту добу ( $0,38 \pm 0,04$  %,  $p < 0,01$ ).

У контрольних тварин експресія каспази-3 в епідермісі залишалася низькою протягом усього експерименту, коливаючись у межах  $0,31$ – $0,57$  %, з незначним зниженням на 30-ту добу ( $0,30 \pm 0,03$  %,  $p < 0,05$ ).

У тварин з хронічним соціальним стресом до поранення цей показник був мінімальним ( $0,10 \pm 0,01$  %,  $p < 0,05$ ), однак на 3-тю добу різко зростав до  $2,08 \pm 0,21$  % ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$  порівняно з контролем), що вказувало на надмірну активацію апоптозу в епідермісі. У подальшому експресія поступово знижувалася, залишаючись вищою за контроль на 7–14 добу.

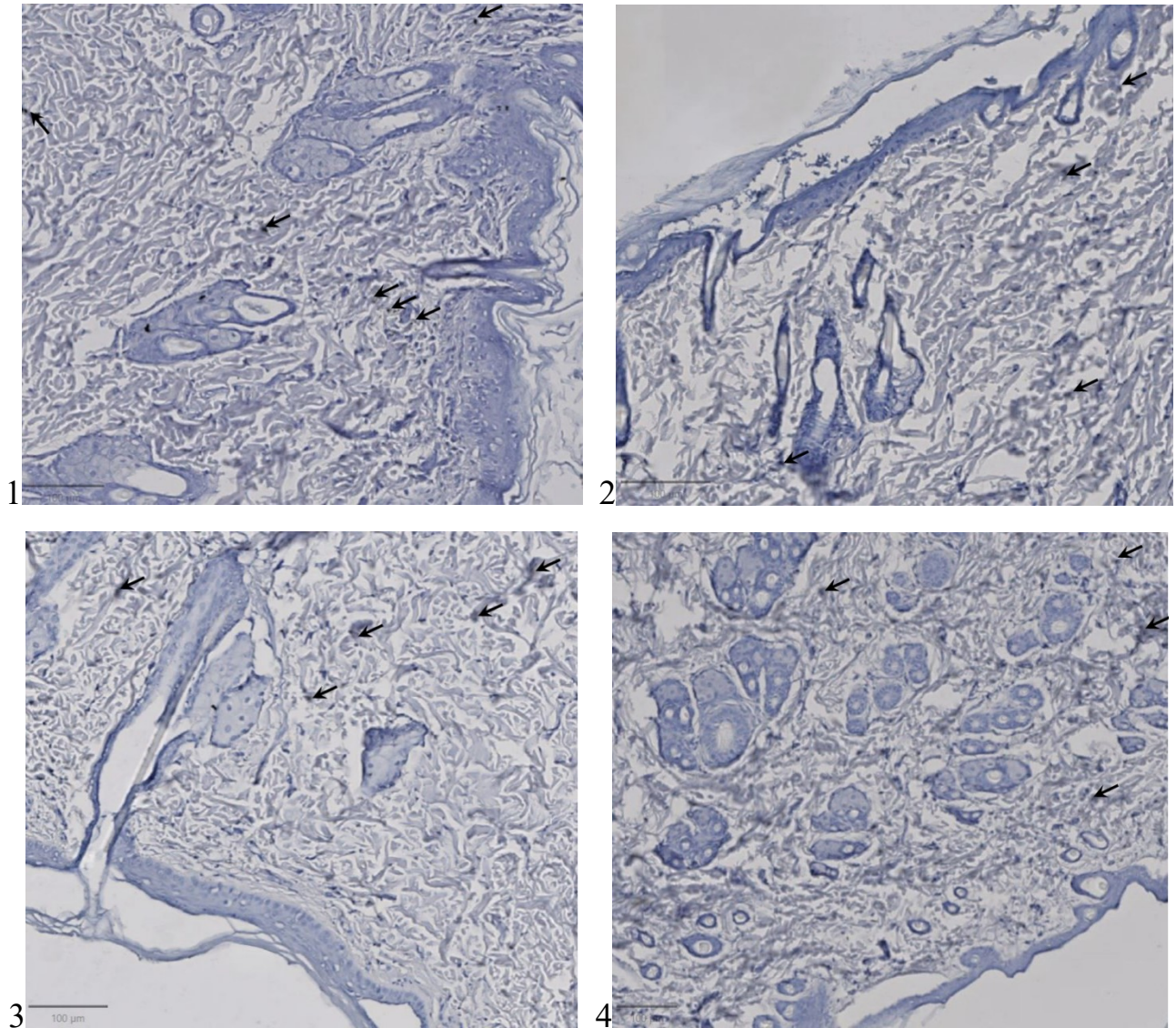


**Рисунок 3.14** - Експресія каспази -3 (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показані мічені клітини), зб. 200:

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 3 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 3 день загоєння ран

У дермі контрольної групи каспаза-9 демонструвала фазну динаміку з піком на 1-шу добу ( $6,44 \pm 0,48$  %,  $p < 0,01$ ) (додаток А20, рис.3.15.) і подальшим зниженням до мінімальних значень на 30-ту добу ( $1,30 \pm 0,11$  %,  $p < 0,01$ ).

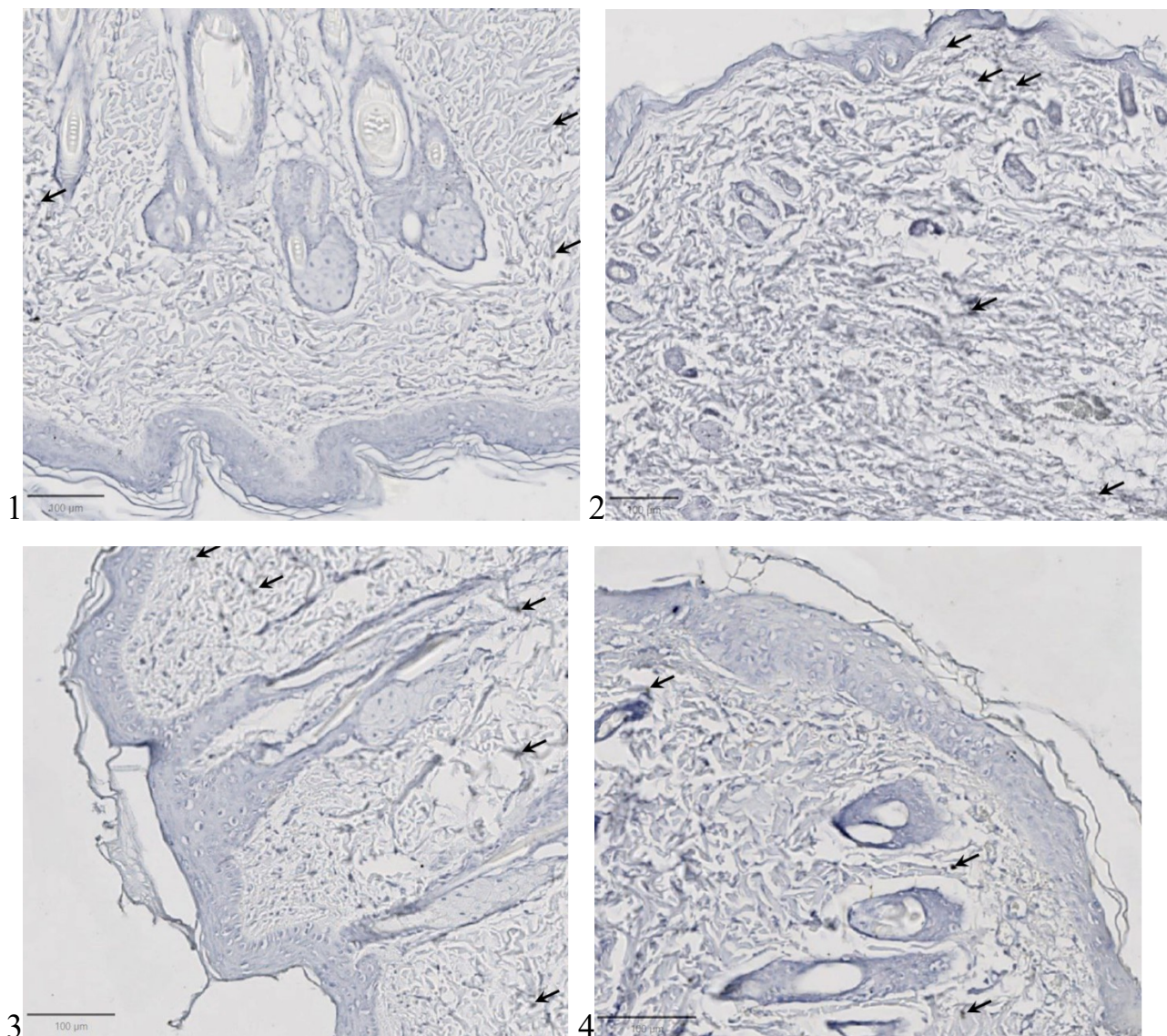
В експериментальній групі відзначалося пригнічення каспази-9 у ранні строки (1–3 доба), з достовірно нижчими показниками порівняно з контролем ( $p < 0,001$ ), що свідчило про дисбаланс ініціації апоптозу в умовах стресу.



**Рисунок 3.15** - Експресія каспази - 9 (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показані мічені клітини), зб. 200:

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 3 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 3 день загоєння ран

Аналогічні відмінності простежувалися у волосяних фолікулах та епідермісі, де в експериментальній групі відзначалося або зниження, або асинхронність експресії каспази-9 порівняно з контрольними тваринами.



**Рисунок 3.16** - Експресія Vcl-2 (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показані мічені клітини), зб. 200:

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 3 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 3 день загоєння ран

У контрольній групі експресія антиапоптотичного білка Bcl-2 у дермі до поранення становила  $2,90 \pm 0,33$  % (додаток A20, рис.3.16) і мала тенденцію до зниження в пізні строки загоєння, досягаючи мінімуму на 30-ту добу ( $0,48 \pm 0,05$  %,  $p < 0,001$ ).

В експериментальній групі на 1–3 добу після поранення відзначалося різке зниження Bcl-2 ( $0,68 \pm 0,08$  % і  $0,77 \pm 0,09$  %,  $p < 0,001$  порівняно з контролем), що свідчило про втрату антиапоптотичного захисту дерми.

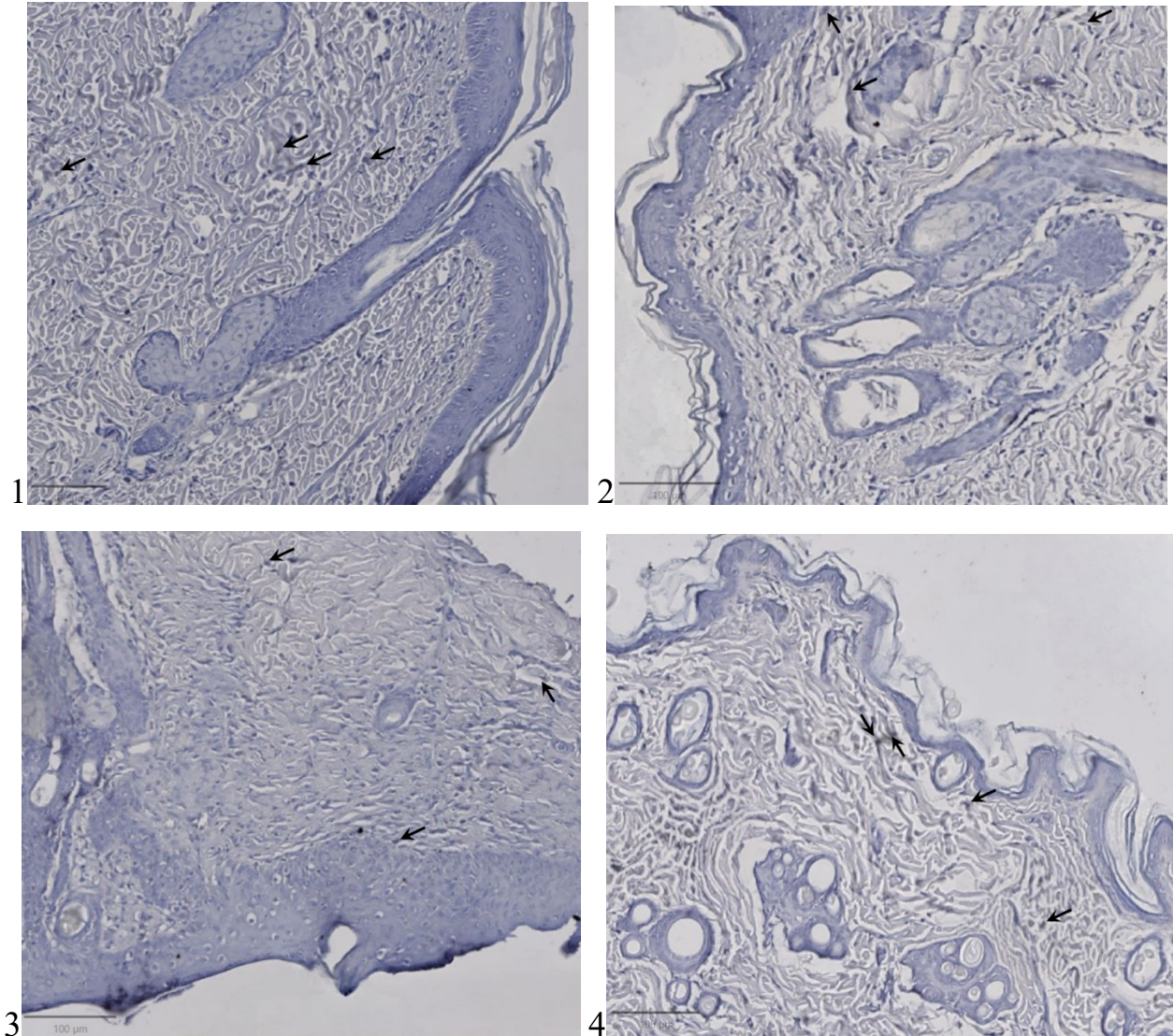
У контрольних тварин Bcl-2 у волосяних фолікулах і епідермісі мав помірну експресію з поступовим зниженням у пізні строки. В умовах хронічного соціального стресу експресія Bcl-2 у цих структурах була достовірно нижчою протягом більшості термінів спостереження, що узгоджувалося з підвищеною експресією каспаз і загальною тенденцією до посилення апоптотичних процесів.

### **3.6.2 Динаміка маркерів ендогенної цитопротекції в процесі загоєння різаних ран після впливу ХСС**

SOX2 є транскрипційним фактором, асоційованим із підтриманням стовбурового та прогеніторного фенотипу клітин. У контрольній групі базальний рівень експресії SOX2 у дермі до поранення становив  $0,96 \pm 0,07$  % (додаток A21, рис.3.17). На 1-шу добу після нанесення рани спостерігалось статистично значуще підвищення цього показника до  $1,66 \pm 0,12$  % ( $p < 0,001$ ), що може свідчити про транзиторну активацію клітин із прогеніторними властивостями у ранню фазу ранового процесу. Вже на 3-тю добу експресія SOX2 достовірно знижувалася до  $0,92 \pm 0,08$  % ( $p < 0,001$ ) і в подальшому залишалася стабільною протягом усього періоду спостереження, коливаючись у межах  $0,93$ – $0,95$  % на 7–30 добу, що відповідало вихідному рівню.

В експериментальній групі, яка перебувала в умовах хронічного соціального стресу, експресія SOX2 у дермі до поранення була різко зниженою і становила лише  $0,12 \pm 0,02$  % ( $p < 0,001$  порівняно з контролем). На 1-шу добу після поранення відзначалося подальше достовірне зменшення цього показника

до  $0,04 \pm 0,01 \%$  ( $p < 0,001$ ). Починаючи з 3-ї доби загоєння, експресія SOX2 у дермі експериментальних тварин не визначалася, що свідчило про глибоке та стійке пригнічення SOX2-позитивних клітин у дермальному шарі.



**Рисунок 3.17** - Експресія SOX2 (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показані мічені клітини), зб. 200:

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 3 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 3 день загоєння ран

У контрольній групі до поранення рівень експресії SOX2 у волосяних фолікулах був значно вищим, ніж у дермі, і становив  $2,01 \pm 0,18$  %. На 1-шу добу після нанесення рани спостерігалось різке та статистично значуще зниження показника до  $0,52 \pm 0,05$  % ( $p < 0,001$ ). У подальшому експресія SOX2 продовжувала зменшуватися, досягаючи мінімальних значень на 14-ту добу ( $0,11 \pm 0,02$  %), з подальшим частковим відновленням на 30-ту добу до  $0,41 \pm 0,05$  % ( $p < 0,001$ ).

В експериментальній групі базальний рівень SOX2 у волосяних фолікулах був достовірно нижчим і становив  $0,63 \pm 0,06$  % ( $p < 0,001$ ). На 1-шу добу після поранення експресія знижувалася до  $0,24 \pm 0,02$  % ( $p < 0,05$ ), однак на 3-тю добу відзначалося її повторне зростання до  $0,63 \pm 0,07$  % ( $p < 0,05$ ). У подальші строки загоєння (7–30 доба) показник поступово знижувався і на 30-ту добу становив  $0,18 \pm 0,02$  %, залишаючись нижчим за відповідні контрольні значення.

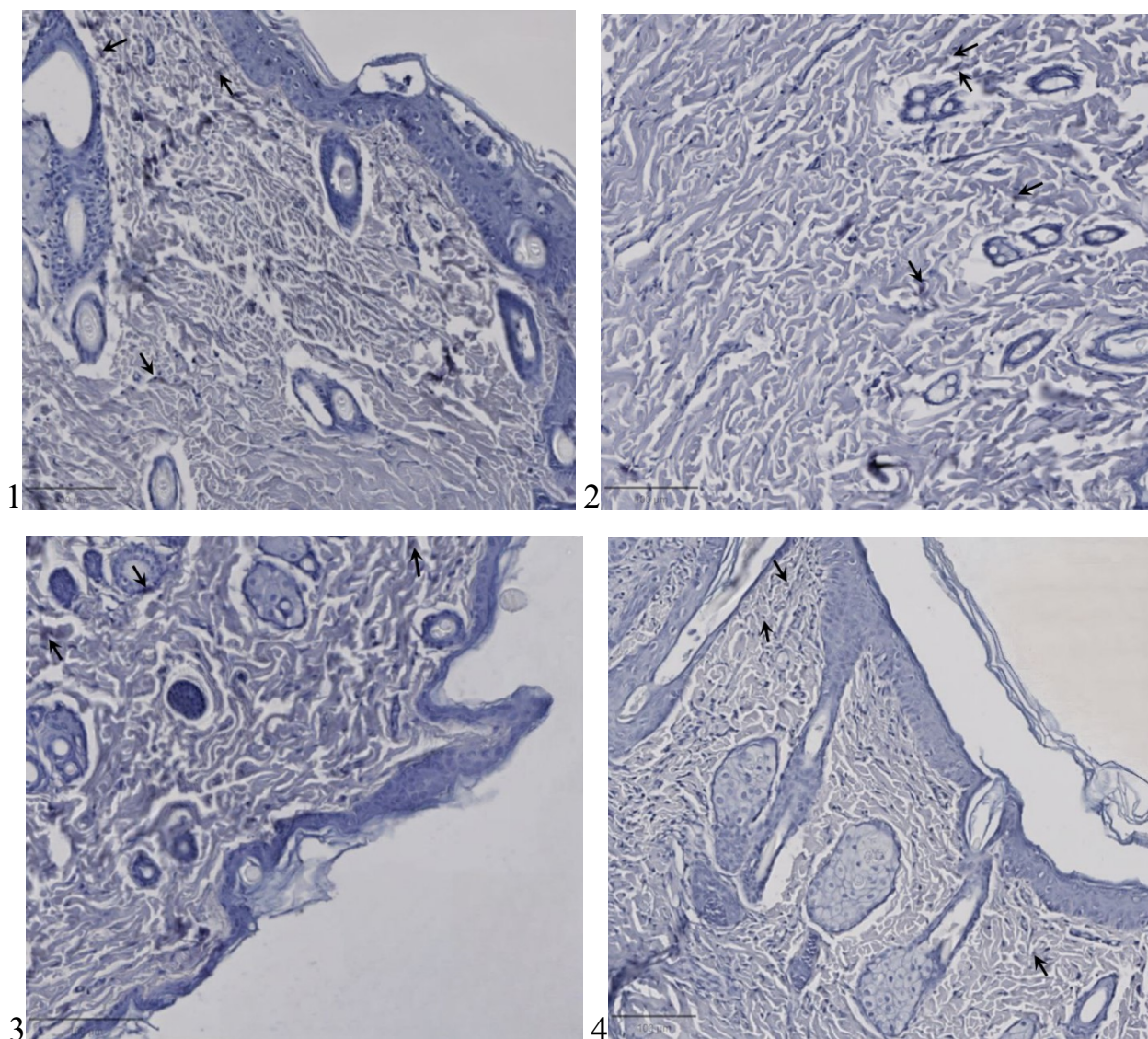
У контрольній групі експресія SOX2 в епідермісі до поранення була мінімальною ( $0,12 \pm 0,02$  %) і не зазнавала суттєвих змін на 1–3 добу. На 7-му добу спостерігалось достовірне зниження показника до  $0,05 \pm 0,01$  % ( $p < 0,05$ ), а на 14-ту та 30-ту добу експресія SOX2 в епідермісі не визначалася.

В експериментальній групі SOX2-позитивні клітини в епідермісі до поранення не виявлялися. На 1–3 добу після поранення реєструвався вкрай низький рівень експресії ( $0,01 \pm 0,01$  %;  $p < 0,001$  порівняно з контролем), а на 7-му добу —  $0,03 \pm 0,01$  % ( $p < 0,01$ ). У пізні строки загоєння (14–30 доба) експресія SOX2 в епідермісі експериментальних тварин також не визначалася.

HIF-1 $\alpha$  регулює адаптацію клітин до гіпоксії та активує ендogenousні механізми цитопротекції, включаючи ангиогенез і антиоксидантний захист.

У контрольній групі базальний рівень експресії HIF-1 $\alpha$  у дермі до поранення становив  $7,10 \pm 0,63$  % (додаток А21, рис. 3.18.). На 1-шу добу після нанесення рани спостерігалось достовірне підвищення показника до  $11,73 \pm 1,22$  % ( $p < 0,05$ ), що свідчить про активацію адаптивних гіпоксичних механізмів у ранню фазу загоєння. На 3-тю добу експресія HIF-1 $\alpha$  різко знизилася до  $3,42 \pm 0,36$  % ( $p < 0,001$  порівняно з попереднім періодом), після чого

поступово відновлювалася і на 30-ту добу досягала  $7,02 \pm 0,71$  %, що відповідало вихідному рівню.



**Рисунок 3.18** - Експресія HIF-1 $\alpha$  (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показані мічені клітини), зб. 200:

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 3 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 3 день загоєння ран

В експериментальній групі, яка перебувала в умовах хронічного соціального стресу, базальний рівень HIF-1 $\alpha$  у дермі був значно нижчим ( $2,39 \pm 0,25$  %;  $p < 0,001$  порівняно з контролем). На 1-шу добу після поранення експресія знизилася до  $1,24 \pm 0,13$  % ( $p < 0,01$  vs контроль), а на 3-тю добу досягла мінімального значення  $0,17 \pm 0,02$  % ( $p < 0,001$ ). У подальші строки загоєння (7–30 доба) HIF-1 $\alpha$  поступово відновлювалася, досягаючи  $5,22 \pm 0,48$  % на 30-ту добу, що залишалось нижче контрольного рівня, але свідчило про часткове відновлення гіпоксичних адаптаційних механізмів.

У контрольній групі експресія HIF-1 $\alpha$  у волосяних фолікулах до поранення була низькою ( $0,18 \pm 0,01$  %). Після поранення спостерігалось поступове зростання показника, з максимальним рівнем на 3-тю добу ( $0,66 \pm 0,10$  %;  $p < 0,05$ ), з подальшою незначною флуктуацією та частковим відновленням на 30-ту добу ( $0,56 \pm 0,07$  %;  $p < 0,05$ ).

В експериментальній групі базальний рівень HIF-1 $\alpha$  у волосяних фолікулах не визначався (н/в). На 1-шу добу після поранення з'явилися поодинокі позитивні клітини ( $0,09 \pm 0,02$  %;  $p < 0,05$  порівняно з контролем), а на 3-ю добу показник залишався низьким ( $0,10 \pm 0,02$  %;  $p < 0,001$  порівняно з контролем). У подальші строки загоєння (7–30 доба) експресія HIF-1 $\alpha$  повільно збільшувалася, досягаючи  $0,44 \pm 0,06$  % на 30-ту добу.

У контрольній групі експресія HIF-1 $\alpha$  в епідермісі до поранення становила  $0,28 \pm 0,05$  % і залишалася стабільною протягом перших 3 діб. У наступні строки спостерігалось поступове зменшення показника, досягаючи  $0,17 \pm 0,04$  % на 30-ту добу.

В експериментальній групі базальний рівень HIF-1 $\alpha$  був трохи нижчим ( $0,21 \pm 0,04$  %), на 1-шу добу після поранення експресія знизилася до  $0,16 \pm 0,03$  % ( $p < 0,05$  порівняно з контролем), залишалася низькою на 3–7 добу і частково відновлювалася до  $0,22 \pm 0,03$  % на 30-ту добу.

Отримані результати свідчать, що у нормальних умовах загоєння різаної рани експресія HIF-1 $\alpha$  у дермі має транзиторний характер з ранньою активацією на 1-шу добу та швидким спадом на 3-тю добу, після чого поступово

відновлюється. У волосяних фолікулах і епідермісі HIF-1 $\alpha$  експресується на значно нижчому рівні, проте також демонструє динаміку адаптивної відповіді.

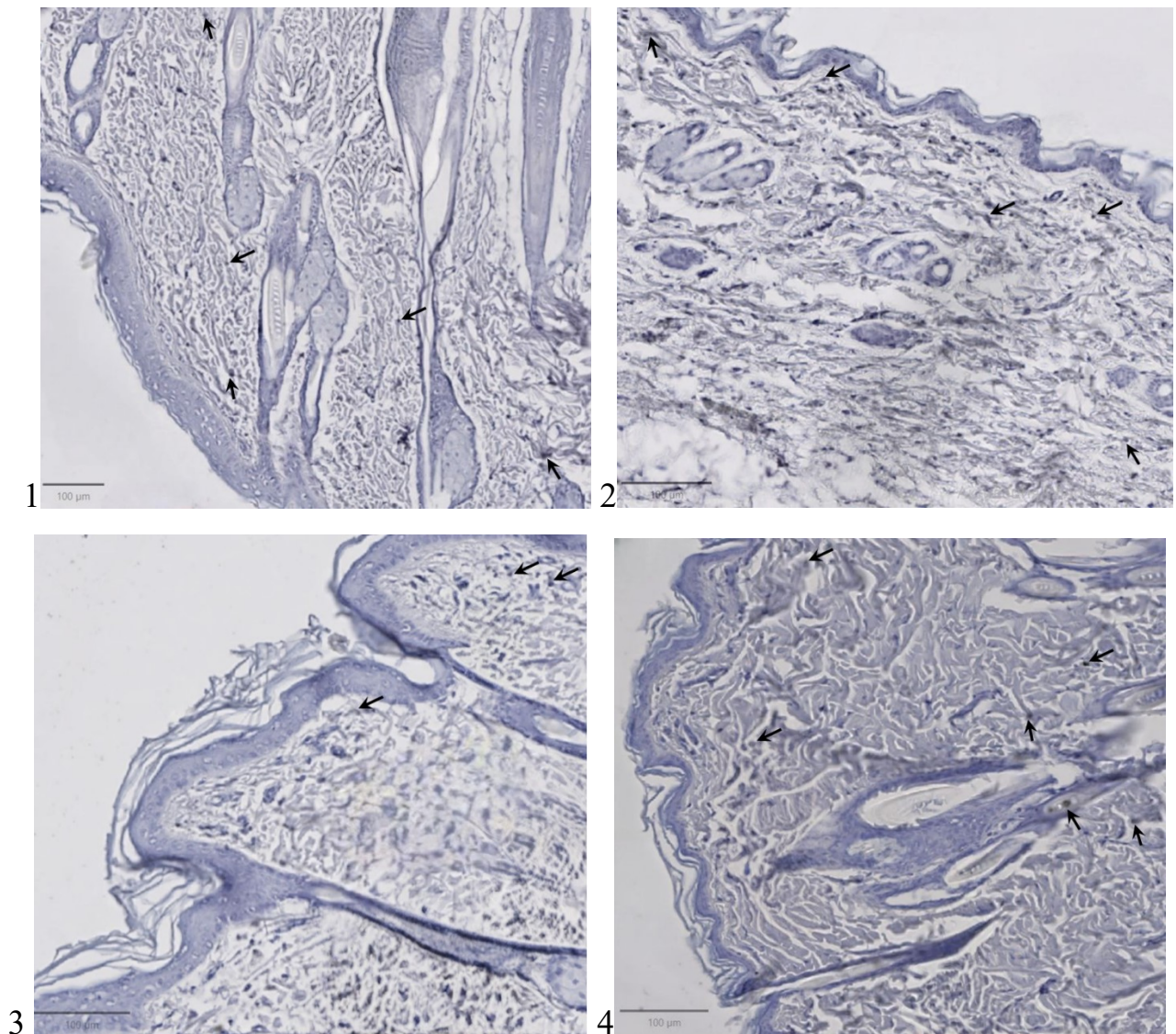
В умовах хронічного соціального стресу спостерігається стійке пригнічення експресії HIF-1 $\alpha$  у дермі та інших структурах шкіри на ранніх етапах загоєння, що може свідчити про порушення гіпоксичної адаптації та ослаблення цитопротекторних механізмів, необхідних для ефективної регенерації тканин.

### **3.6.3 Динаміка експресії транскрипційних факторів в процесі загоєння різаних ран після впливу ХСС**

PDGFR $\beta$  регулює проліферацію, міграцію та виживання клітин мезенхімального походження та має ведучу роль у регенерації тканин. У контрольній групі базальний рівень PDGFR $\beta$  у дермі становив  $6,65 \pm 0,51$  % (додаток A22, рис.3.19.). На 1-шу добу після поранення показник підвищився до  $8,10 \pm 1,02$  % ( $p < 0,05$ ), а на 3-тю добу — до  $12,19 \pm 1,33$  % ( $p < 0,01$ ), що свідчить про активацію проліферативних процесів у ранній фазі загоєння. В подальші строки експресія поступово знижувалася, досягаючи мінімального рівня  $0,44 \pm 0,04$  % на 30-ту добу ( $p < 0,001$ ).

В експериментальній групі базальний рівень PDGFR $\beta$  був достовірно нижчим ( $2,63 \pm 0,24$  %;  $p < 0,001$  порівняно з контролем). На 1-шу добу після поранення експресія зросла до  $3,36 \pm 0,39$  % ( $p < 0,01$ ), проте на 3-тю добу спостерігалось її тимчасове зниження до  $1,83 \pm 0,20$  % ( $p < 0,05$ ). У подальші строки (7–30 доба) показник коливався між 3,30–6,27 %, залишаючись нижчим або порівнянним з контрольними значеннями.

У контрольній групі до поранення рівень PDGFR $\beta$  становив  $1,71 \pm 0,16$  %, на 1-шу і 3-тю добу спостерігалось достовірне зниження ( $1,00 \pm 0,12$  % і  $0,30 \pm 0,04$  %,  $p < 0,001$ ), що відображає локальні зміни рецепторної активності. У подальші строки (7–30 доба) експресія залишалася низькою ( $0,08$ – $0,18$  %).



**Рисунок 3.19** - Експресія PDGFR $\beta$  (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показані мічені клітини), зб. 200:

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 3 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 3 день загоєння ран

В експериментальній групі вихідний рівень був дуже низьким ( $0,16 \pm 0,02$  %;  $p < 0,001$  порівняно з контролем). Після поранення спостерігалася незначна коливальна динаміка в межах 0,19–0,24 % до 30-ї доби.

У контрольній групі базальна експресія PDGFR $\beta$  була  $0,55 \pm 0,08$  %, на 3-тю добу відзначалося достовірне зниження до  $0,27 \pm 0,04$  % ( $p < 0,05$ ), а на 30-ту добу — до  $0,11 \pm 0,02$  % ( $p < 0,001$ ).

В експериментальній групі PDGFR $\beta$  у епідермісі практично не визначався до поранення. Після ранніх змін на 1–3 добу ( $0,05$ – $0,10$  %,  $p < 0,001$  порівняно з контролем) маркер не визначався у пізні строки.

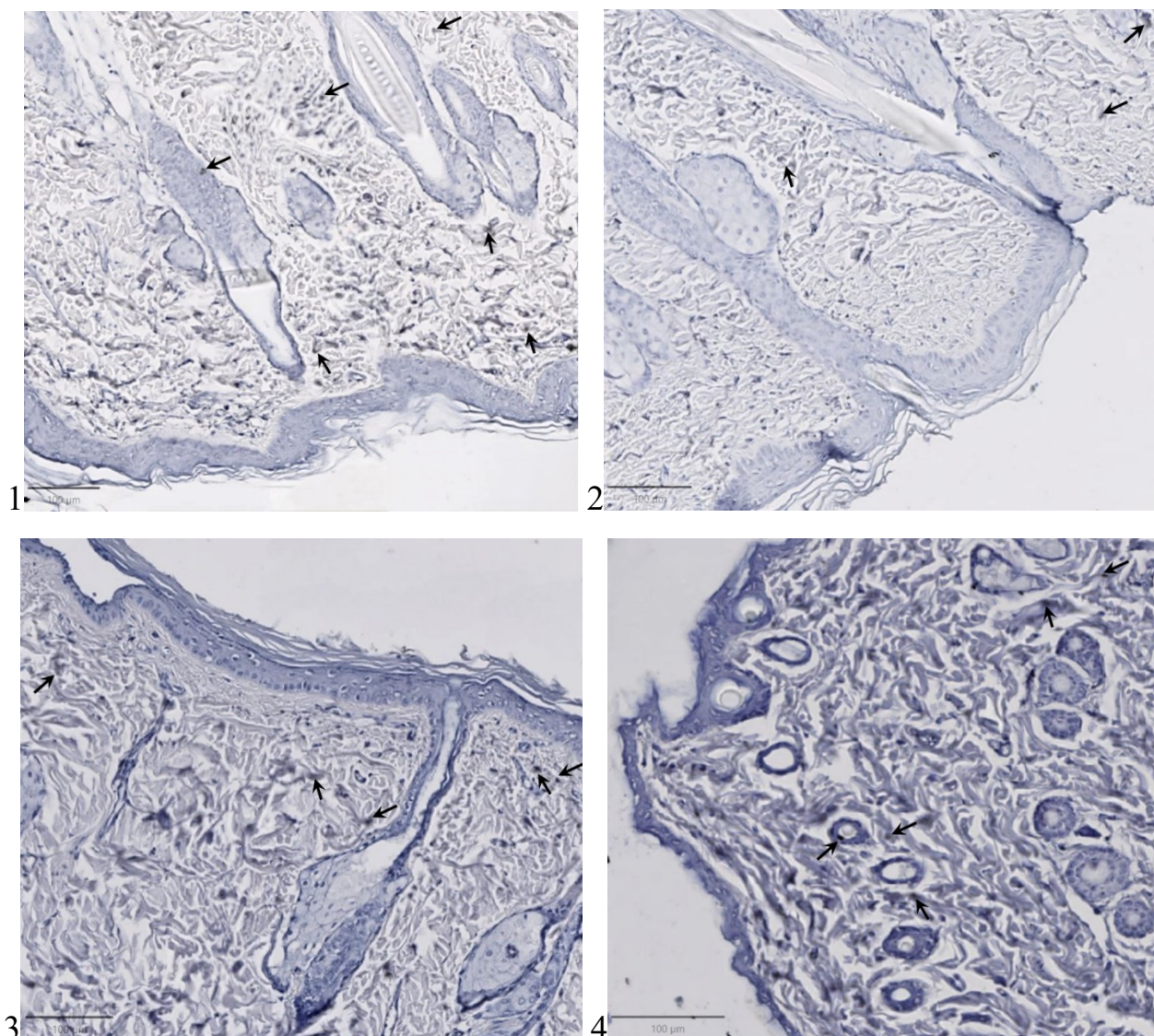
CGRP — нейропептид, що регулює васкуляризацію, запальні процеси та регенерацію тканин. У контрольній групі базальний рівень CGRP становив  $6,02 \pm 0,57$  % (додаток A22, рис.3.20.). На 1-шу та 3-тю добу після поранення відбулося значне зниження ( $2,18 \pm 0,33$  % та  $0,66 \pm 0,07$  %;  $p < 0,001$ ), з наступним підвищенням на 14-ту добу ( $5,04 \pm 0,52$  %;  $p < 0,01$ ) та частковим зниженням на 30-ту добу ( $4,36 \pm 0,47$  %).

В експериментальній групі базальний рівень CGRP був нижчим ( $4,28 \pm 0,48$  %;  $p < 0,001$ ). На 1–7 добу експресія залишалася зниженою ( $1,19$ – $1,79$  %;  $p < 0,01$ ), а на 14-ту добу спостерігалось достовірне підвищення до  $7,71 \pm 0,83$  % ( $p < 0,001$  vs контроль), після чого на 30-ту добу показник знизився до  $3,65 \pm 0,44$  %.

У контрольній групі експресія CGRP до поранення становила  $0,93 \pm 0,08$  %, на 1-шу та 3-тю добу відзначалося її достовірне зниження ( $0,34 \pm 0,05$  % та  $0,12 \pm 0,02$  %;  $p < 0,05$ – $0,01$ ), із частковим підвищенням на 7-шу добу. В експериментальній групі базальний рівень був значно нижчим ( $0,20 \pm 0,02$ %;  $p < 0,01$ ). Динаміка показника коливалася в межах  $0,13$ – $0,63$  % протягом перших 30 діб.

У контрольній групі базальний рівень CGRP становив  $0,90 \pm 0,07$  %, на 1–3 добу спостерігалось достовірне зниження до  $0,08 \pm 0,01$ – $0,36 \pm 0,06$  % ( $p < 0,001$ ), із подальшим коливанням до  $0,23 \pm 0,03$  % на 30-ту добу.

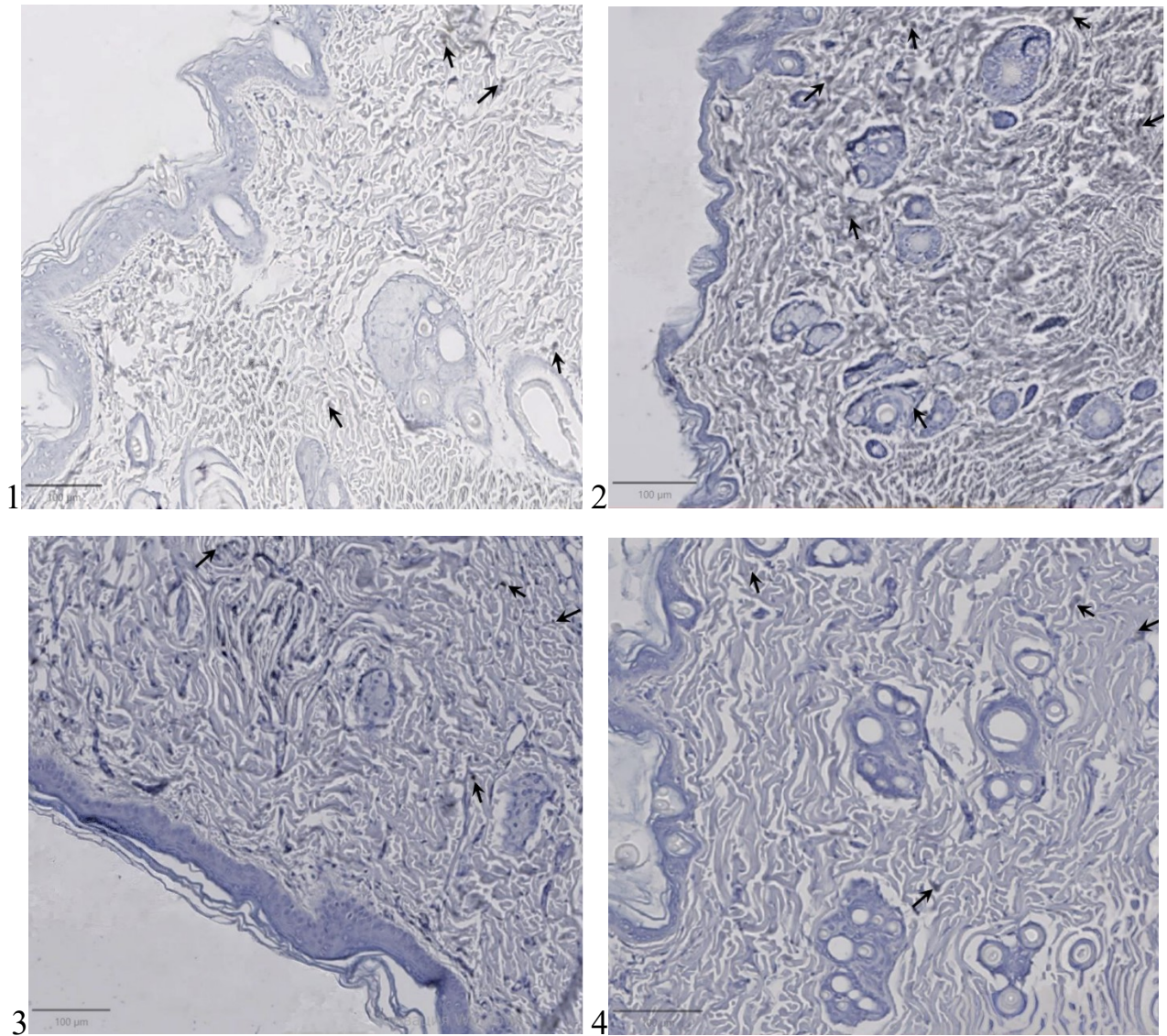
В експериментальній групі базальний рівень був дещо нижчим ( $0,72 \pm 0,06$  %), на 1–7 добу експресія знижувалася або залишалася стабільною, з частковим відновленням на 14–30 добу.



**Рисунок 3.20** - Експресія CGRP (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показані мічені клітини), зб. 200:

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 3 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 3 день загоєння ран

LC3В є одним з основних маркерів аутофагії та відображає активність процесів клітинного оновлення, деградації пошкоджених органел і підтримання клітинного гомеостазу. У контрольній групі базальний рівень експресії LC3В у дермі до нанесення рани становив  $6,70 \pm 0,59$  % (додаток А22, рис.3.21).



**Рисунок 3.21** - Експресія LC3В (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показані мічені клітини), зб. 200 (1,3,4), зб. 150 (2):

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 3 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 3 день загоєння ран

На 1-шу добу після нанесення рани спостерігалася тенденція до підвищення показника до  $8,19 \pm 0,96\%$ , що може свідчити про ранню активацію аутофагічних процесів у відповідь на ушкодження тканини. На 3-тю добу

експресія LC3В достовірно знижувалася до  $3,44 \pm 0,37 \%$  ( $p < 0,001$ ), що відображало перехід від гострої фази відповіді до етапу ремоделювання. На 7-му добу відзначалося повторне підвищення експресії до  $5,02 \pm 0,63 \%$  ( $p < 0,01$ ), після чого показник різко зменшувався на 14-ту добу до  $0,50 \pm 0,06 \%$  ( $p < 0,001$ ) і досягав мінімальних значень на 30-ту добу ( $0,18 \pm 0,02 \%$ ;  $p < 0,01$ ), що відповідало завершенню активних процесів аутофагії у дермі.

В експериментальній групі базальний рівень LC3В у дермі до поранення був зіставним із контролем і становив  $7,21 \pm 0,68 \%$ . Однак уже на 1-шу добу після поранення відзначалося різке та достовірне зниження експресії до  $1,12 \pm 0,17 \%$  ( $p < 0,001$  порівняно з контролем), що свідчило про пригнічення ранньої аутофагічної відповіді. На 3-тю добу показник залишався низьким ( $1,84 \pm 0,20 \%$ ;  $p < 0,001$ ), а на 7-му добу спостерігалось часткове відновлення експресії до  $3,90 \pm 0,41 \%$  ( $p < 0,001$ ). У пізні строки загоєння експресія LC3В знову знижувалася: до  $0,28 \pm 0,03 \%$  на 14-ту добу ( $p < 0,001$ ) з незначним підвищенням на 30-ту добу ( $0,93 \pm 0,88 \%$ ), залишаючись достовірно нижчою за контрольні значення.

У контрольній групі базальний рівень експресії LC3В у волосяних фолікулах був низьким і становив  $0,28 \pm 0,03 \%$ . На 1-шу добу після поранення відзначалося різке та достовірне підвищення показника до  $1,04 \pm 0,15 \%$  ( $p < 0,001$ ), що може свідчити про активацію аутофагії у клітинах волосяних фолікулів у відповідь на ушкодження. На 3-тю добу експресія знижувалася до  $0,42 \pm 0,06 \%$  ( $p < 0,01$ ), а у подальші строки (7–14 доба) залишалася відносно стабільною. На 30-ту добу показник достовірно знижувався до  $0,17 \pm 0,02 \%$  ( $p < 0,05$ ).

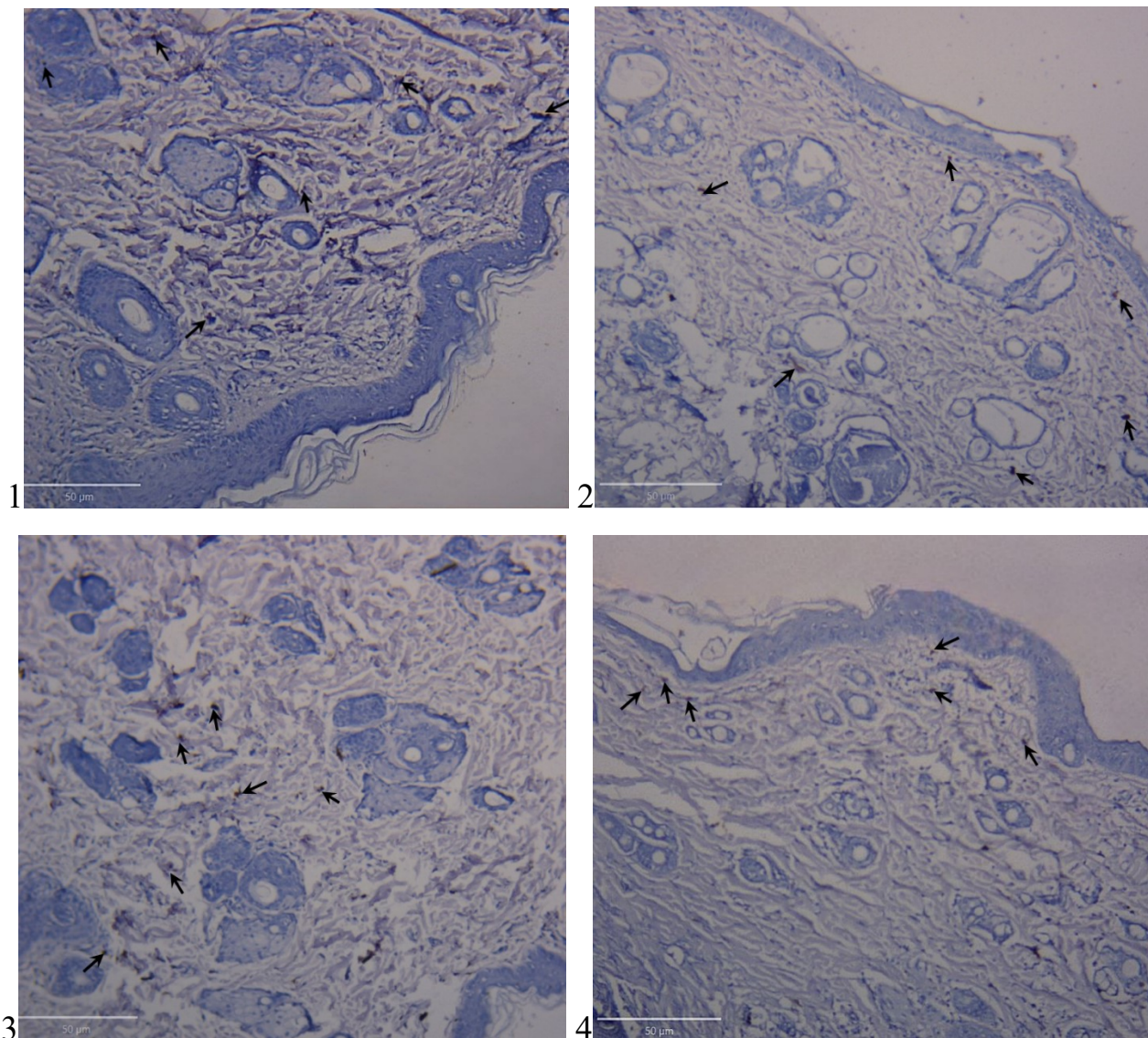
В експериментальній групі базальний рівень LC3В у волосяних фолікулах становив  $0,22 \pm 0,03 \%$  і не відрізнявся суттєво від контролю. На 1-шу добу після поранення, як і в контрольній групі, спостерігалось значне підвищення експресії до  $1,33 \pm 0,18 \%$  ( $p < 0,001$ ). Проте вже на 3-тю добу рівень LC3В різко знижувався до  $0,21 \pm 0,04 \%$  ( $p < 0,001$  порівняно з контролем). У подальші строки загоєння експресія залишалася низькою і коливалася в межах  $0,13–0,20 \%$ , не досягаючи

контрольних значень. У контрольній та експериментальній групах експресія LC3В в епідермісі на всіх етапах дослідження не визначалася, що свідчить про відсутність або вкрай низький рівень аутофагічної активності в епідермальних клітинах у даній моделі загоєння рани.

p62 є адаптерним білком, який бере участь у селективній аутофагії, зв'язуючи поліубіквітиновані білки з аутофагосомами. У контрольній групі базальний рівень експресії p62 у дермі до поранення становив  $4,25 \pm 0,39$  % (додаток А22, рис.3.22.). На 1-шу добу після нанесення рани спостерігалось достовірне підвищення показника до  $6,80 \pm 0,75$  % ( $p < 0,05$ ), що може свідчити про інтенсивну активацію процесів протеостазу у відповідь на ушкодження тканини. На 3-тю добу експресія p62 знижувалася до  $4,63 \pm 0,52$  % ( $p < 0,05$ ), однак на 7-му добу знову достовірно зростала до  $7,70 \pm 0,83$  % ( $p < 0,01$ ), що відповідало фазі активного тканинного ремоделювання. У подальші строки загоєння відзначалося поступове зменшення експресії p62 — до  $4,32 \pm 0,49$  % на 14-ту добу ( $p < 0,001$ ) та до  $2,10 \pm 0,27$  % на 30-ту добу ( $p < 0,001$ ), що свідчило про нормалізацію аутофагічного потоку та завершення активних відновних процесів.

В експериментальній групі, яка перебувала в умовах хронічного соціального стресу, базальний рівень p62 у дермі був достовірно нижчим порівняно з контролем ( $2,83 \pm 0,30$  %;  $p < 0,001$ ). На 1–3 добу після поранення експресія p62 залишалася зниженою ( $2,22$ – $2,40$  %;  $p < 0,001$  порівняно з контролем), однак, починаючи з 7-ї доби, відзначалося її прогресивне та стійке зростання. Так, на 14-ту добу показник досягав  $6,80 \pm 0,75$  %, а на 30-ту добу —  $7,50 \pm 0,83$  % ( $p < 0,001$ ), що свідчить про накопичення p62 та ймовірне порушення аутофагічної деградації у дермі на пізніх етапах загоєння.

У контрольній групі експресія p62 у волосяних фолікулах до поранення була високою і становила  $10,20 \pm 1,36$  %. Уже на 1-шу добу після поранення спостерігалось різке та достовірне зниження показника до  $2,13 \pm 0,27$  % ( $p < 0,001$ ), що може відображати швидку активацію аутофагічного кліренсу у фолікулярних клітинах. У подальші строки експресія p62 поступово зменшувалася і на 30-ту добу досягала мінімального рівня  $0,12 \pm 0,02$  % ( $p < 0,01$ ).



**Рисунок 3.22** - Експресія р62 (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показані мічені клітини), зб. 200 (1-3), зб. 150 (4):

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 3 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 3 день загоєння ран

В експериментальній групі базальний рівень р62 у волосяних фолікулах був достовірно нижчим ( $4,80 \pm 0,53$  %;  $p < 0,001$  порівняно з контролем). Після поранення експресія знижувалася до  $1,81 \pm 0,24$  % ( $p < 0,001$ ) на 1-шу добу, однак

у подальші строки (7–30 доба) показник залишався стабільно підвищеним (1,92–2,23 %;  $p < 0,01$ – $0,001$  порівняно з контролем), що свідчить про порушення нормальної динаміки аутофагії у волосяних фолікулах за умов стресу.

У контрольній групі базальний рівень експресії p62 в епідермісі був низьким і становив  $0,13 \pm 0,02$  %, із тенденцією до поступового підвищення у пізні строки загоєння, досягаючи  $0,40 \pm 0,06$  % на 30-ту добу.

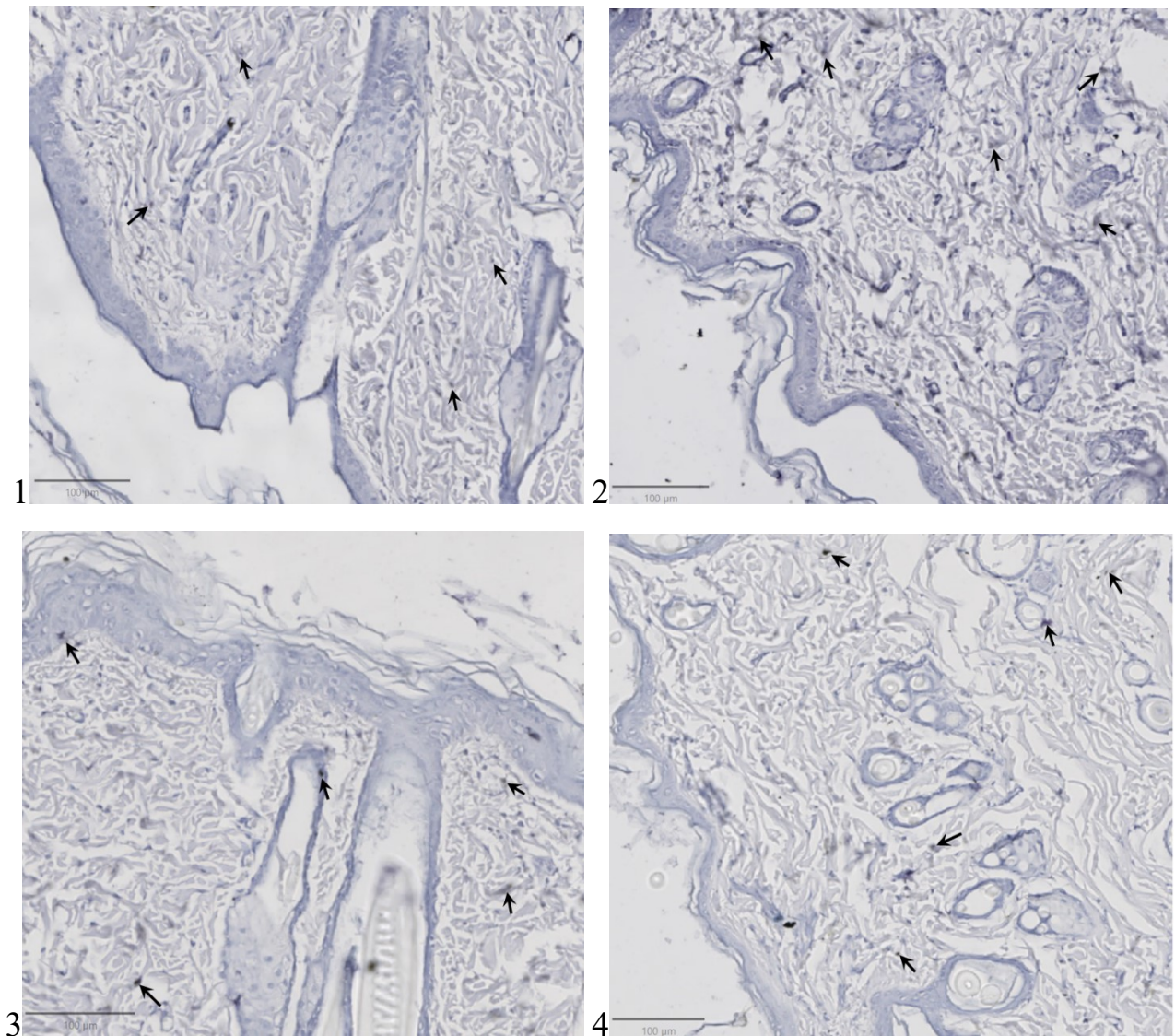
В експериментальній групі p62-позитивні клітини в епідермісі до поранення та в ранні строки загоєння не виявлялися. Починаючи з 7-ї доби, реєструвався низький, але достовірний рівень експресії (0,10–0,11 %;  $p < 0,05$  порівняно з контролем), який частково відновлювався на 30-ту добу ( $0,30 \pm 0,04$  %).

NRF2 є транскрипційним фактором, що регулює антиоксидантну відповідь клітин, індукує експресію ферментів детоксикації та забезпечує захист тканин від оксидативного стресу.

У контрольній групі базальний рівень експресії NRF2 у дермі до поранення становив  $4,02 \pm 0,38$  % (додаток А22, рис.3.23.). На 1-шу та 3-тю добу після нанесення рани істотних змін цього показника не відзначалося ( $5,06 \pm 0,54$  % і  $4,07 \pm 0,46$  % відповідно). Максимальний рівень експресії NRF2 реєструвався на 7-му добу загоєння ( $6,90 \pm 0,73$  %;  $p < 0,05$ ), що, ймовірно, відображало активацію антиоксидантного захисту в період інтенсивного тканинного ремоделювання. У подальші строки спостерігалось достовірне зниження експресії до  $3,93 \pm 0,42$  % на 14-ту добу ( $p < 0,001$ ) і до  $2,71 \pm 0,29$  % на 30-ту добу, що відповідало завершенню гострої фази регенерації.

В експериментальній групі, яка перебувала в умовах хронічного соціального стресу, базальний рівень NRF2 у дермі був достовірно нижчим порівняно з контролем ( $2,50 \pm 0,29$  %;  $p < 0,001$ ). У ранні строки загоєння (1–7 доба) експресія NRF2 залишалася стабільно низькою (2,01–2,18 %;  $p < 0,001$  порівняно з контролем), що свідчило про пригнічення антиоксидантної відповіді. Лише на 14-ту добу спостерігалось достовірне підвищення експресії до  $4,35 \pm$

0,49 % ( $p < 0,01$ ), яке частково зберігалося на 30-ту добу ( $3,57 \pm 0,44$  %), наближаючись до контрольних значень.



**Рисунок 3.23** - Експресія NRF2 (ІГХ з ДАБ) в шкірі щурів у процесі загоєння різаної рани в контрольній та експериментальній групах (стрілочками показані мічені клітини), зб. 200:

- 1 – в контрольній групі до нанесення рани
- 2 – в групі після ХСС до нанесення рани
- 3 – в контрольній групі на 3 день загоєння ран
- 4 – в групі після ХСС на 3 день загоєння ран

У контрольній групі експресія NRF2 у волосяних фолікулах до поранення становила  $2,13 \pm 0,24$  % і демонструвала тенденцію до поступового зниження протягом усього періоду спостереження, досягаючи  $0,76 \pm 0,10$  % на 30-ту добу, що може відображати зменшення потреби в антиоксидантному захисті на пізніх етапах загоєння.

В експериментальній групі базальний рівень NRF2 у волосяних фолікулах був достовірно нижчим ( $1,50 \pm 0,17$  %;  $p < 0,05$ ). У ранні строки після поранення спостерігалось подальше зниження експресії з мінімальними значеннями на 7-му добу ( $0,34 \pm 0,04$  %;  $p < 0,001$  порівняно з контролем). У подальші строки (14–30 доба) відзначалося часткове відновлення рівня NRF2 до 0,65–0,80 %, однак він залишався нижчим або співставним з контрольними показниками.

У контрольній групі експресія NRF2 в епідермісі була низькою до поранення ( $0,10 \pm 0,04$  %) і поступово зростала протягом усього періоду загоєння, досягаючи максимальних значень на 14-ту добу ( $0,26 \pm 0,08$  %), з незначним зниженням на 30-ту добу ( $0,18 \pm 0,04$  %).

В експериментальній групі NRF2-позитивні клітини в епідермісі до поранення та в ранні строки загоєння (1–3 доба) не визначалися. Починаючи з 7-ї доби, реєструвався низький рівень експресії ( $0,07 \pm 0,02$  %;  $p < 0,001$  порівняно з контролем), який поступово підвищувався до  $0,14 \pm 0,03$  % на 30-ту добу, проте залишався нижчим за контрольні значення.

## РОЗДІЛ 4

### ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Фізіологічні та репаративні процеси потребують складної багаторівневої та багатокомпонентної системи регуляції, провідна роль у якій належить нейроімуноендокринній системі [158]. Адаптація організму ссавців до постійно мінливих умов середовища здійснюється переважно через активацію гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової осі з подальшою секрецією ГК, мінералокортикоїдів і катехоламінів, функції яких у ряді випадків частково перекриваються [138]. Зокрема, ГК забезпечують безперервний оптимальний метаболізм і морфогенетичну цілісність організму, що реалізується через гомеостатичну функцію імунної системи [159]. Катехоламіни регулюють оптимальне функціонування серцево-судинної системи та тонус м'язової системи [138]. Мінералокортикоїди через ренін-ангіотензин-альдостеронову систему забезпечують регуляцію водно-сольового балансу внутрішнього середовища організму, оптимізуючи мінеральний склад і судинний тонус у взаємодії з автономною нервовою системою [160].

Шкіра, окрім своїх базових бар'єрних функцій щодо обмеження внутрішнього середовища організму та забезпечення його фенотипічної цілісності, містить широкий спектр молекулярних і клітинних компонентів, що формують автономну імунну систему шкіри. Ця система забезпечує тканинно-специфічний хомінг клітинних попередників і вибірккову рециркуляцію зрілих активованих клітинних популяцій завдяки наявності спеціалізованих тканинних структур і визначеній щільності адгезивних молекул.

Усі шари шкіри — епідерміс, дерма та підшкірна клітковина — містять як резидентні, так і рециркулюючі популяції імунних клітин, які тісно взаємодіють зі структурними клітинами шкіри та міжклітинним матриксом через рецепторно-лігандні взаємодії, а також за допомогою міжклітинних контактів, включно з

щілинними. Динаміка морфологічних змін у шкірі перебуває під постійним контролем регуляторних молекул центральної та місцевої регуляторних осей, які інтегрують імунні, нейрональні та ендокринні компоненти — шкірної імуноендокринної системи (ШІНЕ). [161].

У контексті такої загальної регуляції гомеостазу процес загоєння ран відбувався у шкірі як контрольних, так і експериментальних тварин. За цих умов загоєння шкірних ран у контрольних та експериментальних групах характеризувалося різною ефективністю перебігу трьох основних взаємоперекривних фаз: гемостазу/запалення, проліферації/диференціації та ремоделювання.

Протягом усього періоду спостереження за процесом загоєння вторинного бактеріального інфікування не виявлено, що зумовлено швидким формуванням первинних захисних структур, представлених фібрилярними комплексами позаклітинного матриксу. За таких умов асептичного загоєння ексцизійних ран функціональні зрушення клітинних і гуморальних факторів імунітету в переважній більшості можна розглядати як прояв їх морфогенетичної ролі у відновленні тканинної та клітинної архітектоники.

Хронічний соціальний стрес супроводжується підвищеною активацією центральної регуляторної осі гіпоталамус–гіпофіз–наднирники та її регіонарного шкірного представництва (ШІНЕ), що призводить до структурно-функціональних порушень у шарах шкіри, зсувів у співвідношенні клітин вродженого та адаптивного імунітету та, зрештою, до зниження протективних властивостей шкіри й підвищення ризику розвитку патологічних процесів, що було підтверджено результатами наших досліджень.

Соціальні інстинкти (статева поведінка, агресивне домінування або рецесивна підлеглість) починають проявлятися після 8–9 місяців життя [155,156], тому щури, залучені до експерименту у віці 10–12 місяців, перебували на піку соціальної зрілості. У дослідження були включені лише самці, оскільки циклічні гормональні коливання впливають на процес загоєння ран [16,156,162].

Хоча самиці гризунів є більш чутливими до соціальної ізоляції як стресорного чинника, самці також зазнають її впливу [163].

#### **4.1 Динаміка морфометричних змін приранової зони шкіри шурів при загоєнні різаної рани після впливу ХСС**

Порівняльний аналіз динаміки відновлення структурних шарів шкіри виявив стереотипні клітинні та морфогенетичні реакції у відповідних фазах репарації: запалення, проліферації та ремоделювання. Проте якщо в контрольній групі вони відповідали фізіологічним параметрам, то в експериментальній, збігаючись за напрямком проліферативних і диференціювальних реакцій, суттєво поступалися за амплітудою змін і часовими характеристиками основних фаз загоєння. У контрольних тварин загоєння ран відбувалося в оптимальні терміни та з адаптивним обсягом гістологічних репарацій, що узгоджується з даними інших авторів [37,112].

В інтактних гістологічних зразках шкіри контрольних тварин морфологічні особливості відповідали загальноприйнятим нормам і онтогенетичному періоду (12–13 місяців) [37,112,123,161]. Так, у перші години розвитку ушкодження швидко формувалася первинна ранова матриця внаслідок утворення фібрилярних комплексів на основі фібронектину з гепарином і колагеном [162,164]. Ця матриця ізолювала рану від зовнішнього середовища, створювала передумови для скорочення її країв, а її опсонізуювальні властивості сприяли оптимальному розгортанню клітинних і гуморальних компонентів наступної запальної реакції на 1-шу та 3-тю добу загоєння [164].

Оптимальний перебіг цієї фази підтверджувався багаторазовим підвищенням проліферації клітин базального шару епідермісу та значним збільшенням товщини дерми внаслідок судинно-клітинної реакції. Ефективне вирішення завдань кліренсу та мобілізація клітинного різноманіття тканин шкіри в зоні рани, переважно за рахунок їх рекрутування з кровотоку та депонування у вогнищі ушкодження й перираневої зоні, сприяли гомеостатичному перебігу

процесу та переходу до наступної стадії, на якій реалізовувалися реакції проліферації й диференціації основних гістологічних диферонів [165].

Основним результатом проліферативної фази було формування грануляційної тканини на 7-му добу — перехідної тканини, що виконує функцію другої тимчасової ранової матриці [159] як продовження розвитку первинної матриці, сформованої у першу добу ранового процесу. Цей період також характеризувався високим рівнем васкуляризації. Внаслідок цього на 7-му добу відзначали максимальну товщину епідермісу та дерми. До 14-ї доби переважали процеси диференціації тканинних диферонів, що призводило до трансформації грануляційної матриці: формування кірки, повної епітелізації та закриття рани. До 30-ї доби ці відновні перетворення забезпечували повне загоєння рани з утворенням тонкого сполучнотканинного рубця.

Ці морфологічні спостереження були підтверджені імуногістохімічним аналізом проліферативної активності клітин із використанням маркера Ki-67. Відомо, що Ki-67 експресується в усіх фазах клітинного циклу, окрім G<sub>0</sub>, і є індикатором проліферативного потенціалу тканин.

Виявлені морфометричні зміни підтверджувалися даними імуногістохімічного аналізу Ki-67, що відображає проліферативну активність клітин. У контрольних тварин експресія Ki-67 у дермі та епідермісі демонструвала типовий для фізіологічного загоєння профіль із піком у проліферативну фазу, що узгоджується з активним формуванням грануляційної тканини та реепітелізацією. Це свідчить про збереження адекватного пулу клітин-попередників і координовану активацію клітинного циклу в зоні ушкодження.

Загоєння хронічних ран у тварин, які зазнали хронічного соціального стресу, суттєво відрізнялося від контрольної групи. Насамперед слід зупинитися на особливостях експерименту та виокремити ушкоджувальний чинник — домінуючу агресію з боку оточуючих самців, яка сприймалася чутливими тваринами як загроза каліцтва або навіть загибелі за відсутності можливості ізоляції. Хронічний соціальний стрес підвищував напруження центральної

регуляторної осі та пов'язаної з нею автономної нервової системи [123], що зрештою призводило до порушення поточних метаболічних і репаративних процесів у тканинах органів, як зазначено й іншими дослідниками [167,168].

Вплив хронічного соціального стресу проявлявся вже в зразках шкіри до нанесення рани: товщина всіх шарів епідермісу та дерми була зменшена порівняно з контролем. У зв'язку з цим можна зробити висновок, що хронічний соціальний стрес через центральні регуляторні ланки порушує також і локальні тканинні регуляторні комплекси. Саме цим ми пояснюємо багаторазове зростання кількості та функціональної активності мастоцитів в інтактних гістологічних зразках як результат пригнічення їх міграції та депонування під впливом ГК кори наднирників для вирішення альтернативних адаптивних завдань шкіри.

Відомо, що однією з функцій ГК є регуляція міграції, проліферації та диференціації, а також апоптозу клітин тканин, зокрема клітин імунної системи [169–171]. Тому за умов уже порушеної локальної регуляторної системи репаративні процеси в експериментальній групі тварин перебігали уповільнено. Візуальне загоєння ран відбувалося зі значною затримкою, і наприкінці експерименту (на 30-ту добу) спостерігався частково вкритий кіркою дефект (9,1%).

Основні репаративні процеси в усіх фазах також мали достовірну затримку: запалення, проліферації та ремоделювання. Так, у фазі запалення відставали притаманні їй судинно-клітинні реакції, що зумовлювало зменшення товщини епідермісу та дерми на 1-шу і 3-тю добу загоєння. Затримка кліренсу й судинно-клітинних реакцій у запальній фазі спричиняла уповільнення наступних репаративних стадій. Проліферативні реакції тканинних попередників істотно відставали від контролю: товщина епідермісу та дерми на 7-му добу була значно меншою. Формування основної репаративної грануляційної тканини також затримувалося — на 7-му добу спостерігалися лише окремі її острівці. Процеси диференціації в тканинах, що оточують рану, були пригнічені, що фіксувалося на 14-ту добу у вигляді гальмування динаміки початку ремоделювання шарів

шкіри. До 30-ї доби морфометричні показники шкіри крайової зони ран не поверталися до вихідного рівня (до нанесення ушкодження) та не досягали контрольних значень, що свідчить про незавершеність як процесів ремоделювання, так і компенсаторних реакцій, індукованих емоційним стресом.

Слід зазначити, що динаміка амплітуди змін у базальному та шипуватому шарах у контрольній та експериментальній групах була подібною за часовими інтервалами дослідження. Частка шипуватого шару відносно базального в контролі становила  $32,17 \pm 2,31$  %, тоді як в експерименті вона була достовірно вищою —  $46,74 \pm 3,12$  % ( $p \leq 0,05$ ). На нашу думку, потенціал шипуватого шару до диференціації, а ймовірно й до проліферації, зростає в екстремальних умовах, створених рановим процесом після дії хронічного соціального стресу.

У тварин, які зазнали хронічного соціального стресу, проліферативна відповідь була істотно ослабленою як у дермальному, так і в епідермальному компартментах. Зниження Ki-67-позитивних клітин у критичні строки регенерації вказує на пригнічення клітинного циклу та обмеження регенераторного резерву шкіри. Імовірно, це є наслідком тривалої активації гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової осі з підвищеним рівнем ГК, які відомі здатністю інгібувати проліферацію та індукувати апоптоз клітин [169–171].

Таким чином, порушення динаміки Ki-67 у стресованих тварин відображає фундаментальний зсув від проліферативно-репаративного до енергозберігального адаптивного фенотипу тканини, що, у поєднанні зі зменшенням товщини шарів шкіри та затримкою формування грануляційної тканини, формує морфологічну основу хронізації ранового процесу.

Це свідчить про розділення регуляторних механізмів проліферації та диференціації за їх молекулярними й клітинними компонентами. Механізми регуляції цієї дихотомії потребують окремого подальшого дослідження.

У світлі сучасних уявлень про ШІНЕ, процеси відновлювальної васкуляризації не можуть розглядатися ізольовано, а є результатом складної взаємодії між ендотелієм, стромальними клітинами, мастоцитами та регуляторними молекулами. Згідно з даними [172,173], формування судинного

русла у рані відбувається за рахунок поєднання васкулогенезу та ангиогенезу. Отримані нами результати свідчать, що ефективність цих процесів залежить від системної стресової відповіді.

У контрольних тварин репаративна регенерація перебігала за класичним сценарієм. В інтактній шкірі щільність CD34-позитивних судин становила  $32,17 \pm 2,86$  у полі зору, що відповідає віковій нормі та підтримується балансом про- та антиангіогенних факторів (VEGF, bFGF), які секретуються резидентними клітинами, зокрема мастоцитами.

На 1-шу добу після нанесення рани кількість судин практично не змінювалася ( $31,53 \pm 3,13$  судин в полі зору), однак відбувалася якісна перебудова мікрооточення. Активація мастоцитів (понад 55% дегранульованих форм) супроводжувалася вивільненням триптази й хімази, що забезпечувало деградацію міжклітинного матриксу та створювало умови для міграції ендотеліоцитів. У цей період відзначалася адекватна експресія HIF-1 $\alpha$ , який у відповідь на травматичну гіпоксію запускає транскрипцію VEGF [174].

На 3-тю добу кількість судин зростала до  $45,84 \pm 4,62$  судин в полі зору, а на 7-му добу досягала максимуму —  $79,12 \pm 8,23$  судин в полі зору, що відображає фазу активної проліферації та формування грануляційної тканини. Зростання ангиогенезу супроводжувалося підвищеною експресією PDGFR $\beta$ , що свідчить про рекрутинг перицитів та стабілізацію новоутворених капілярів [175].

На 14-ту добу кількість судин знижувалася до  $48,73 \pm 4,97$  судин в полі зору, а на 30-ту добу — до  $33,53 \pm 3,15$  судин в полі зору, наближаючись до інтактного рівня. Це відображає фізіологічну елімінацію капілярів шляхом апоптозу ендотеліоцитів, що підтверджується збалансованим співвідношенням Caspase-3 та Bcl-2.

У тварин, що перенесли хронічний соціальний стрес ХСС, спостерігалася принципово інша динаміка, зумовлена дезінтеграцією системи ШПНН під впливом глюкокортикоїдів і катехоламінів.

Вже на 1-шу добу після травми відмічалася різке зниження щільності судин до  $19,48 \pm 2,83$  в полі зору ( $p < 0,001$ ), що значно нижче контрольних

значень. Цей феномен можна розглядати як ішемію, спричинену стрес-індукованою вазоконстрикцією. Паралельно було виявлено дефіцит HIF-1 $\alpha$ , що блокує запуск адаптивної гіпоксичної відповіді, а також виснаження антиоксидантного фактора NRF2, що сприяє розвитку оксидативного стресу.

На 3-тю добу кількість судин зростала лише до  $34,27 \pm 4,15$  судин в полі зору, залишаючись достовірно нижчою за контроль. Незважаючи на масивну дегрануляцію мастоцитів, глюкокортикоїд-опосередковане пригнічення макрофагів і нейтрофілів призводило до затримки очищення рани та формування неповноцінного запального мікрооточення.

У проліферативну фазу (7-ма доба) щільність судин становила  $51,66 \pm 5,51$  судин в полі зору проти  $79,12 \pm 8,23$  судин в полі зору у контролі. Ангіогенез був не лише кількісно знижений, але й якісно дефектний, що підтверджується зменшенням експресії PDGFR $\beta$  та порушенням рекрутингу перицитів. Унаслідок цього формувалися нестабільні, високопроникні капіляри, які не забезпечували адекватної трофіки тканин.

На 14-ту добу кількість судин залишалася на рівні  $46,82 \pm 4,94$  судин в полі зору, а на 30-ту добу —  $38,51 \pm 3,67$  судин в полі зору, не повертаючись до інтактних значень. Одночасно виявлявся дисбаланс у системі Bcl-2/Caspase-3 із перевагою антиапоптичних сигналів, що блокувало фізіологічну регресію капілярів і підтримувало хронічне запалення. Повторне зростання кількості та дегрануляційної активності мастоцитів на пізніх термінах свідчить про вторинний імунно-судинний дисбаланс.

Отже, отримані результати дозволяють сформулювати концепцію стрес-індукованої ангіопатії рани. Хронічний соціальний стрес, діючи через нейроендокринні механізми, блокує як ініціацію ангіогенезу, так і етап стабілізації новоутворених судин, що на тлі дисфункції мастоцитів та порушення апоптозу призводить до формування дефектного мікроциркуляторного русла й порушує процеси репарації.

## **4.2 Участь клітин вродженого та набутого імунітету системного типу (нейтрофіли, макрофаги, лімфоцити) приранової зони шкіри щурів у загоєнні різаної рани після впливу ХСС**

Першими на ушкодження реагували нейтрофіли, які вже до 1-ї доби спостереження в гістологічних зразках шкіри досягали максимальних значень ( $145,25 \pm 13,74$  клітин/мм<sup>2</sup>). Така швидка й масивна інфільтрація нейтрофілів пояснюється новими даними літератури щодо їх гомеостатичної ролі у підтриманні фізіологічного та репаративного стану різних тканин і органів. Нейтрофіли по праву належать до запальних клітин системного організменного рівня, основне завдання яких зводиться до підготовки рани до реконструктивної репарації на наступних стадіях загоєння [48,176,177].

Водночас нейтрофіли, хоча й у невеликій кількості, виявляються в різних тканинах за фізіологічних умов, що вказує на їх участь у гомеостатичній регуляції разом з іншими імунологічними та структурними клітинами конкретної тканини [178,179]. Ми також відзначали цей феномен в інтактних зразках шкіри та на стадії ремоделювання, коли їхні функції були наближені до фізіологічних ( $4,15 \pm 0,38$  клітин/мм<sup>2</sup> і  $4,16 \pm 0,41$  клітин/мм<sup>2</sup> в день нанесення рани та на 30-ту добу відповідно). Системний характер гомеостатичної ролі нейтрофілів підтверджується їх значною представленістю в крові (20–30 % у щурів у нормі та 60–65 % у людини) [180].

До 3-ї доби запального періоду кількість нейтрофілів значно зменшилася, проте залишалася ще суттєвою. Прогресивне зниження кількості нейтрофілів наприкінці запального періоду та повернення їх до вихідного рівня в наступні періоди загоєння рани відбувалися за рахунок їх апоптозу з подальшою елімінацією резидентними макрофагами та макрофагами, диференційованими з циркулюючих моноцитів. При цьому самі нейтрофіли виділяють фактори, що активують апоптоз нейтрофілів і сприяють його індукції в макрофагах [130,181].

Основна роль нейтрофілів у цей період полягала в знищенні можливих патогенів і, головним чином, в очищенні рани від клітинного детриту, мертвих

клітин, еритроцитів за рахунок синтезу вільних радикалів, секреції протеаз [130,182], а також вивільнення у позаклітинне середовище NETs — сітчастоподібних структур, що складаються з ДНК-гістонових комплексів і білків, які утворюють фіксуєчу поверхню для ефективного функціонування рецептор-лігандних взаємодій [183].

На початку запального періоду нейтрофіли підтримували в мікрооточенні імунокомпетентних клітин (ІКК) Th1-тип імунної відповіді (запальний) із відповідним набором цитокінів і факторів росту. Наприкінці запального періоду нейтрофіли разом з іншими ІКК, що мігрували в шкіру, переводили клітинне та гуморальне середовище рани в Th2-тип, модулюючи його в бік протизапального набору імунологічних факторів. Останні, своєю чергою, модифікували функції макрофагів, переводячи їх із першого прозапального типу (M1) до протизапального (M2) з відповідним набором цитокінів і факторів росту [179,184].

Таким чином, успішне завершення запального процесу сприяло його переходу до наступних стадій – проліферативної та ремодуляційної, під час яких кількість нейтрофілів різко зменшувалася до вихідного рівня, проте їх роль у підтримці фізіологічного контролю тканиноспецифічної стабільності структурного гомеостазу залишалася провідною в системному нагляді (за якого спостерігається перенапряма синтезу імунологічних факторів та клітинних взаємодій) [49,182,185].

У дослідній групі тварин нанесення різаної рани після тритижневого моделювання соціального стресу призводило до того, що центральна ГГН та місцева молекулярна вісь виділяла підвищену кількість основних стресових гормонів – глюкокортикоїдів, а через стимуляцію ЦНС – катехоламінів.

Хронічне стресове підвищення гормонів супроводжувалося морфологічними та метаболічними негативними порушеннями в клітинах тканин організму, перш за все у шкірі як найбільшому органі, що контактує з зовнішнім середовищем [186]. Серед порушень дослідники відзначали спазм гладком'язових ділянок судин, розвиток відносної гіпоксії, яка на тлі

інтенсифікації метаболічного навантаження призводила до порушення структури та життєдіяльності клітин (порушення асиметрії цитоплазматичних мембран, поява реактивних форм кисню, зовнішнього позаклітинного АТФ, БТШ, а у позаклітинному гуморальному середовищі – активних фрагментів комплементу 4b3a) [186,187].

Ці структури є алармінами (DAMP), які розпізнаються патерн-розпізнаючими рецепторами структурних клітин (епітелій, фібробласти, ендотеліальні клітини) та імунокомпетентних клітин, перш за все вродженого ряду (клітини Лангерганса, дендритні клітини, макрофаги, нейтрофіли) [188].

Проте при хронічному стресі підвищена концентрація гормонів порушує та пригнічує регуляцію вроджених і адаптивних реакцій, перш за все змінюючи баланс цитокінових реакцій 1-го типу (Th1) на тип 2 (Th2). Крім того, за високого титру, прозапальні цитокіни поступаються тим, що синтезуються під час фізіологічного розвитку запалення [189, 190].

Функціональна інтенсифікація ІКК прискорює їх старіння та апоптотичне оновлення [191]. Гормональне пригнічення рециркуляції у цей період призводить до зменшення кількості тканиноспецифічних клітин як вродженого, так і адаптивного імунітету, що, у підсумку, знижує їх функціональні можливості. При цьому одночасно збільшується кількість регуляторних клітин супресорного типу (T reg і CD8<sup>+</sup> - лімфоцитів) [192].

На підтвердження цього, при гістологічному аналізі шарів шкіри було виявлено багаторазове звуження шарів шкіри та зменшення васкуляризації. Тому у нашому досліді ще у вихідних зразках, до нанесення рани, тканинна інфільтрація ІКК системного рівня (нейтрофіли, макрофаги, лімфоцити) з периферичної крові була у 2 рази нижчою за контрольні значення. Таке зниження відносно контролю зберігалось на всіх стадіях загоєння рани.

Таким чином, пригнічення розгортання повноцінного гострого запалення через зменшення цитокінів Th1 та синтезу хемотаксичних факторів призвело до різкого, більш ніж у 3 рази, зниження нейтрофілів у прираневій області шкіри на 1-й день запальної реакції, тоді як деструктивна ситуація в рані вимагала їх більш

масштабної присутності. Недостатнє двократне рекрутування нейтрофілів зберігалось і на 3-й день спостереження, коли повинна була відбутися очищувальна підготовка рани від детриту та можливих патогенів. У цей період нейтрофіли готуються до апоптозу для подальшого ефероцитозу макрофагами.

Для виконання всіх завершальних функцій нейтрофіли разом з іншими мігруючими в шкіру ІКК (Т-клітинами, лімфоцитами, макрофагами) перепрограмовуються на відновлювальні морфогенетичні процеси. У цьому активно беруть участь макрофаги, які замінюють нейтрофіли у рані та змінюють свій фенотип із типу 1 на тип 2 [112,193].

Запальна фаза є ключовою як при фізіологічному (контрольному), так і патологічному загоєнні рани. Нейтрофіли, маючи високу чутливість до змін і ушкоджень внутрішнього середовища та виражену здатність до міграції, рекрутовані першими і домінують у рані протягом усієї запальної фази [112,130].

Однак дефіцит прозапальних цитокінів, таких як  $IL-1\beta$  та хемотаксичних молекул ( $IL-8$ ), під впливом протизапальних цитокінів (передусім  $IL-10$ ) перешкоджає нормальній інфільтрації та інтеграції нейтрофілів у рані, викликаючи їх різкий дефіцит. Недостатність ростових факторів ( $PDGF$ ,  $TGF-\beta 1$ ) негативно впливає на їх функціонування, знижує ефективність очищення рани від клітинного детриту, еритроцитів, розгортання NETs і секреції протеаз [11,194].

Через супресивний фон цитокінів Th2 запальна реакція не завершується до 3-го дня спостереження, і підготовчі очищувальні та фагоцитарні реконструктивні процеси у позаклітинному матриксі продовжуються і на наступній стадії загоєння – до 30-го дня. На 7-й день стадії проліферації кількість нейтрофілів залишається значно зниженою порівняно з контролем. На 14-й день їх кількість також залишається зниженою, а під час ремодуляційної фази нейтрофіли вже фіксуються на тканинному рівні шкіри.

Нейтрофіли мають високу здатність до міграції і чутливі до змін внутрішнього середовища. Навіть за відсутності інфекції чи травмування тканин вони беруть участь у фізіологічній регуляції клітин, внутрішнього середовища та

судин. Вони можуть перебувати як поза судинами (пул екстравааскулярних резистентних нейтрофілів), так і всередині судин (капілярні нейтрофіли), здатні до рециркуляції та повернення у гемопоетичні ніші, а повна утилізація макрофагами відбувається безпосередньо у тканинах (зокрема шкірі), селезінці, печінці та легенях.

Макрофаги, як великі вакуолізовані клітини шкіри (гістіоцити), представлені двома популяціями, що походять у дорослих особин унаслідок конститутивної міграції моноцитів із крові [195,196]. Перша популяція — це немігруючі гістіоцити, які постійно присутні в тканинах; за певних умов вони здатні до популяційного самопідтримання шляхом входження невеликої кількості клітин у проліферативні цикли G2–M (2–3 поділи) [197,198]. У нормі в шкірі вони містяться в меншій кількості, ніж друга популяція, яка формується за рахунок постійної репопуляції з крові та подальшої диференціації *in situ* в один із підтипів макрофагів залежно від клітинного мікрооточення [199]. Виходячи з цільових установок даного дослідження, нами наведено показники динаміки макрофагів (гістіоцитів).

У вихідних зразках шкіри контрольних тварин до нанесення рани кількість макрофагів була переважаючою порівняно з іншими клітинами вродженого імунітету і становила  $33,85 \pm 2,88$  клітин/мм<sup>2</sup>. Це кількісне домінування ще неушкодженої шкіри свідчить про їх особливу важливість в ієрархії клітинного імунітету. Численні дослідження підтверджують ключову роль макрофагів у підтриманні клітинного та гуморального імунітету всіх тканин організму, за що вони справедливо отримали назву «убіквітарних» гістіоцитів [200].

Макрофаги у фізіологічній нормі беруть участь в оновленні клітинного складу та міжклітинної тканинної рідини шляхом конститутивного мікропіноцитозу, інтенсивність якого настільки висока, що, як показано в культурі тканин, макрофаги оновлюють свою цитолему за рахунок пінофагоцитозу приблизно за 30 хвилин. Преапоптотичні та загиблі клітини елімінуються макрофагами шляхом ефроцитозу, тобто макропіноцитозу протизапальними макрофагами з фенотипом PD-L2<sup>+</sup>. При цьому на рівні

транскриптомного аналізу переконливо показано, що ці два способи фагоцитарної активності є незалежними та кодуються різними групами генів [200-202].

На філогенетичному рівні макрофаги, як рухливі клітини з імунологічними властивостями, як зазначав їх першовідкривач І. Мечников, набули еволюційної поліморфної та багатофункціональної різноманітності. Передусім ця різноманітність проявилася в цитокіновому та рецепторно-лігандному контролі взаємодії з іншими клітинними представниками тканинного різноманіття організму. Імунологічне розпізнавання генетичної ідентичності здійснюється через патерн-рецепторне розпізнавання структур PAMP та алармінів DAMP із подальшою ініціацією імунних реакцій [200,203]. Інтеграція макрофагальної системи з лімфоїдною відбулася через здатність макрофагів презентувати антиген у комплексі з МНС II та синтезувати костимулюючі молекули і провоспалювальні цитокіни [204].

У кінцевому підсумку функція макрофагів значно вийшла за межі фагоцитозу, реалізуючи рецепторно-лігандні зв'язки з нейро-імунно-ендокринною системою. Так, макрофаги мають різноманітні рецептори, у тому числі до нейропептидів шкіри, і здатні синтезувати нейромедіатори, цитокіни, хемокіни, фактори росту та протеолітичні пептиди (MMPs). Завдяки своїй поліфункціональності макрофаги беруть репаративну участь на всіх стадіях загоєння ран, проявляючи епігенетичну пластичність [200,202].

Ініціюючи та регулюючи запальну реакцію, макрофаги фенотипу M1 продукують прозапальні цитокіни (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ ), формуючи Th1-тип імунної відповіді, індукуючи синтез активних форм кисню, а також IL-2 та IFN- $\gamma$ . Крім того, M1-макрофаги разом із нейтрофілами очищають рану від детриту, патогенів, некротичної тканини, преапоптотичних і мертвих клітин. Тому кількість макрофагів у першу добу запальної реакції в контролі зростала майже вдвічі — до  $64,31 \pm 6,21$  клітин/мм<sup>2</sup> порівняно з інтактним рівнем  $33,85 \pm 2,88$  клітин/мм<sup>2</sup>.

За фізіологічного перебігу запальної стадії її резолюція настає на третю добу після нанесення рани. Переважаюча роль макрофагів зростає, про що свідчить збільшення їх кількості більш ніж у п'ять разів порівняно з інтактом — до  $195,32 \pm 18,64$  клітин/мм<sup>2</sup>. На цьому етапі деструктивні реакції рани змінюються конститутивними перетвореннями, основними регуляторами яких стають макрофаги M2-типу, що генерують Th2-антизапальні реакції із синтезом IL-4, IL-10, IL-17, TGF- $\beta$ 1 та VEGF-A, ініціюючи васкуляризацію і регенерацію тканин.

Резолюція запальної стадії за участю M2-типу полягає у фагоцитозі та остаточному очищенні рани з ефективною підготовкою до наступної фази загоєння. На початку стадії проліферації, на 7-му добу після ушкодження шкіри, макрофаги залишаються домінуючою популяцією в рані. Їх кількість у цей період досягає максимуму —  $409,59 \pm 35,16$  клітин/мм<sup>2</sup>, з подальшим збереженням підвищеного рівня і на 14-ту добу спостереження —  $176,70 \pm 15,88$  клітин/мм<sup>2</sup>.

Таке переважаюче значне присутність макрофагів на даному етапі репарації відповідає їх провідній ролі у забезпеченні успішності морфофізіологічних перетворень. Основний зміст цієї фази — утворення тимчасової тканини — грануляційної, що заміщує тимчасову матрицю (коагуляційне утворення). Основними учасниками даного перетворення є макрофаги фенотипу M2, які сприяють модуляції Th1-типу у Th2 шляхом синтезу цитокінів, провідним серед яких є IL-10 [103]. У цей період M2-макрофаги індукують синтез ключових ростових факторів: проангіогенних (VEGF-A), рістстимулюючих (PDGF, TGF- $\beta$ ) та інших, які активують ангіогенез, стимулюють фібробласти до синтезу позаклітинного матриксу, фіброгенез, а також проліферацію кератиноцитів з метою реепітелізації та закриття рани з трансформацією фібробластів у міофібробласти [11,205].

Макрофаги також активно регулюють експресію матриксних металопротеїназ під час перебудови грануляційної тканини, які модифікують

позаклітинний матрикс, полегшуючи міграцію кератиноцитів, ендотеліальних клітин, фібробластів і міофібробластів [206].

До стадії ремоделювання кількість макрофагів зменшується, але все ще залишається вищою за вихідний рівень — у контролі на 30-ту добу  $44,02 \pm 4,37$  клітин/мм<sup>2</sup> проти  $33,85 \pm 2,88$  клітин/мм<sup>2</sup> в інтактній шкірі. Основний зміст цієї фази — заміна тимчасової грануляційної тканини вихідною або рубцевою тканиною із закриттям рани. На цьому етапі роль макрофагів залишається високою. Вони беруть активну участь у репарації, але вже за значної участі інших клітинних компонентів рани: епітеліоцитів (регуляція контактного гальмування проліферації) та фібробластів (заміна колагену I типу на III). У цій фазі загоєння кількість судин різко зменшується, більшість ендотеліальних клітин, макрофагів і міофібробластів зазнають апоптозу.

Макрофаги, що змінюють нейтрофіли, прибувають у рану шкіри насамперед із прираневих ділянок у дослідних тварин, які вже вихідно були більш ніж у два рази збіднені макрофагами ( $17,54 \pm 1,45$  клітин/мм<sup>2</sup> проти  $33,85 \pm 2,88$  у контролі). У результаті в першу добу запальної реакції в гістологічних зразках різаної рани кількість макрофагів також була майже вдвічі нижчою за контрольні значення ( $41,47 \pm 3,73$  проти  $64,31 \pm 6,21$  клітин/мм<sup>2</sup>), попри дворазово підвищену концентрацію алармінів у рані.

На функцію макрофагів запальної стадії також впливала вихідна стресорна поляризація в рані, спрямована на переважання M2-типу над M1. Це означає, що запальні реакції, які розгортаються в рані, за своїм обсягом є неадекватними конкретній репаративній ситуації щодо синтезу провоспалювальних цитокінів Th1-типу (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) та індукції активних форм кисню. Альтернативно активовані протизапальні M2-макрофаги модифікують резолюцію запалення через синтез цитокінів і ростових факторів (IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, TGF- $\beta$ , PDGF), які сприяють активації очищувальних фагоцитарних реакцій нейтрофілів, фібробластів і самих макрофагів [207].

Однак резолюцію запального періоду загоєння ускладнює нещодавно виявлений вплив хронічного стресу на функцію активованих M2-макрофагів із

фенотипом PD-L2<sup>+</sup>. Як зазначалося вище, PD-L2<sup>+</sup>-макрофаги відіграють ключову роль у підтриманні протизапальної M2-реакції шляхом видалення мертвих клітин через ефроцитоз. За умов ХСС, надлишку глюкокортикоїдів і катехоламінів показано, що PD-L2-макрофаги у стресованих мишей (хронічний іммобілізаційний стрес) гірше фагоцитують загиблі клітини, що призводить до їх накопичення в рані. Якщо загиблі й преапоптотичні клітини не елімінуються вчасно, вони зазнають вторинного некрозу з вивільненням DAMP-алармінів, які розпізнаються провоспалювальними клітинами, посилюючи та пролонгуючи запальну стадію [207].

Норадреналін, асоційований зі стресом, через дисрегуляцію  $\beta$ 2-адренорецептора (Adrb2) знижує активність генів, що контролюють ефроцитоз макрофагів [208]. Зниження здатності до ефроцитозу зберігається навіть протягом тижня у макрофагів, які диференціювалися з моноцитів після припинення стресу, що було названо авторами «пам'яттю стресу». За даними RNA-seq, у стресованих мишей знижувалася активність генів ефроцитозу, тоді як гени класичного фагоцитозу залишалися незмінними [209].

Автори також виявили епігенетичний механізм формування пам'яті стресу в моноцитах, який включає модифікацію Adrb2-залежного сигналіngu та гістонові перебудови, що сумарно знижують експресію генів, відповідальних за ефроцитоз [209].

Таким чином, наші дані щодо зниження кількості запальних клітин (у тому числі макрофагів) у перші дні та результати наведених авторів щодо пригнічення їх кліренсних функцій переконливо свідчать, що стрес порушує передусім фазу резолюції запалення, пролонгуючи її у стадію проліферації та далі — у ремоделювання.

У гістологічних зразках після ХСС на 7-му добу кількість макрофагів була також знижена більш ніж у 2,5 рази ( $174,60 \pm 16,44$  проти  $409,59 \pm 35,16$  клітин/мм<sup>2</sup>). Цей період загоєння ран значною мірою залежить від кліренсних реакцій запальної фази та визначає ефективність подальших репаративних процесів.

Вирішальна роль макрофагів у ці періоди загоєння рани переконливо продемонстрована в експериментах з їх абляцією (антимакрофагальна сироватка або дифтерійний токсин), де показано суттєву затримку та неповноцінність репаративних процесів на всіх стадіях [209].

У нашому дослідженні дворазове зниження макрофагів супроводжувалося пролонгацією загоєння на всіх етапах, порушенням морфології, формування грануляційної тканини, її васкуляризації та епітелізації, а зрештою — ефективності закриття рани в період ремоделювання. Так, у 9% ран експериментальних тварин на 30-ту добу спостерігалася незавершеність процесів ремоделювання, що проявлялося збереженням залишкових дериватів грануляційної тканини у вигляді фрагментів струпа над фіброзним рубцем.

Проведений аналіз розподілу макрофагів контрольних тварин за основними компартментами шкіри з використанням молекулярного маркера CD68 виявив їх переважання у сосочковому шарі дерми. Кількість CD68<sup>+</sup> клітин в сітчастому шарі поступалося на 15-20%, тоді як кількість макрофагів CD68<sup>+</sup> в епідермісі була одиничною. Ця стартифікація відповідала особистим функціям окремих підгруп макрофагів за своїм мікрооточенням. Динаміка кількості CD68<sup>+</sup> макрофагів за стадіями обстеження співпадала з такою, яка була визначена за гістологічними зразками, пофарбованими гематоксиліном та еозином та яка відображала конкретну фізіологічне навантаження CD68<sup>+</sup> клітин в конкретному місці та в конкретний термін обстеження.

Співпадав і вплив ХСС на кількість CD68<sup>+</sup> макрофагів. Так, кількість CD68 макрофагів в шарах дослідних тварин був в 2 рази нижче, ніж в таких, які отримували у контрольних тварин, чим гістохімічно підтверджений інгібуючий вплив на макрофаги, як ведучу ланку вродженого імунітету.

Відповідно до наших даних, лімфоцити з характерними гістологічними ознаками (компактне ядро, вузький обідок цитоплазми), що забезпечують ефективну циркуляцію, були домінантними у всіх контрольних та дослідних зразках шкіри. За їх кількістю та динамікою змін у процесі загоєння різаної рани вони наближалися, а деколи перевищували значення макрофагів. Ці обставини

дозволяють вважати лімфоцити провідними клітинами у підтримці системного структурного та гуморального гомеостазу організму, які разом з макрофагами є основними клітинами не лише у загоєнні ран, але й у фізіологічній та репаративній регенерації.

Проте, враховуючи їх спільні та адитивні кількісні зміни в імунологічних ситуаціях, часто з переважанням саме лімфоцитів у кількісному та якісному аспектах, можна їх вважати ключовими клітинами в ієрархії імунологічних клітин. Якщо роль макрофагів у загоєнні шкіри досліджена досить широко [4,38,42,59,60,78,101-105,135,205-207,209-212], то дослідження лімфоцитів у цьому аспекті проведені менше, а результати не завжди однозначні щодо їх участі у конкретній репаративній ситуації.

Тому навіть досліди з частковою або повною абляцією підмножин лімфоцитів не завжди дають однозначні результати щодо участі конкретної групи у імунітеті. Незважаючи на складнощі, роль лімфоцитів у структурному та гуморальному імунітеті тканин, включно зі шкірою, під час фізіологічної та репаративної регенерації є загальноновизнаною та активно вивчається, поряд із протиінфекційним та протипухлинним імунітетом.

З цих позицій можна пояснити досить високий рівень лімфоцитів у контролі до нанесення різаної рани,  $41,27 \pm 3,74$  клітин/мм<sup>2</sup> в контролі і  $22,59 \pm 1,96$  клітин/мм<sup>2</sup> в експериментальній групі. Лімфоцити активно беруть участь на всіх стадіях репарації шкіри.

Так, у перший день після пошкодження кількість лімфоцитів у контролі збільшилась більш ніж у 2,5 рази ( $107,62 \pm 12,15$  клітин/мм<sup>2</sup>), що відображає їх міграцію з периферичної крові. У дослідних тварин під дією гострого хірургічного стресу та активації гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової осі кількість лімфоцитів підвищувалася повільніше — до  $58,45 \pm 5,30$  клітин/мм<sup>2</sup> (1-й день), відображаючи пригнічення імунної відповіді стресом.

На 3-й день стадії розв'язання запалення кількість лімфоцитів у контролі досягла  $180,67 \pm 17,32$  клітин/мм<sup>2</sup>, тобто зросла більш ніж у 4 рази порівняно з вихідним рівнем, що зумовлено міграцією з крові, прилеглих ділянок шкіри та

активацією проліферативних процесів у регіонарних лімфоїдних органах. У досліді під дією хронічного стресу лімфоцити зросли до  $93,77 \pm 8,71$  клітин/мм<sup>2</sup>, також демонструючи подібну динаміку, але у меншій мірі.

Разом із макрофагами це збільшення відображає нові імунологічні завдання: перехід стадії загоєння від прозапального Th1 до антизапального Th2, із поляризацією макрофагів від M1 до морфогенетично конструктивного M2. M2-макрофаги продукують відповідні цитокіни та фактори росту: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , IGF-1, які сприяють загоєнню [207].

Після кліренсу рани нейтрофілами та макрофагами, знешкодження патогенів, очищення від дебриса та пре- та апоптотичних клітин, рана переходить у проліферативну фазу. На цій стадії кількість лімфоцитів у контролі досягає  $314,89 \pm 26,99$  клітин/мм<sup>2</sup>, тобто зросла в 7,5 рази порівняно з вихідним рівнем. Макрофаги синхронно досягають свого максимуму.

Ці дві клітинні популяції тісно взаємодіють: патерн-активовані макрофаги, як представники вродженого імунітету, індують лімфоцити до імунологічних реакцій, як представники адаптивного імунітету. Підвищене навантаження на ці клітинні популяції, а також на інші ІКК та структурні клітини, зумовлене заміною тимчасової матриці рани грануляційною тканиною, у процесі якої відбувається епітелізація, васкуляризація та фіброплазія за рахунок проліферації епітеліальних, ендотеліальних, фібробластичних і макрофагальних клітин [103].

Антизапальні цитокіни IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 інгібують запалення та сприяють поляризації M1-макрофагів у M2, а IGF-1, що виділяється альфа- та гамма-лімфоцитами, підтримує виживання та проліферацію кератиноцитів і інших клітин. TGF- $\beta$  підтримує морфогенетичні реакції Th2 через індукцію Treg-клітин, які регулюють проліферативні та ефекторні реакції клітин у межах гомеостазу [213-215].

Добре відомо, що поділ загоєння ран на окремі стадії є досить умовним, оскільки вони плавно переходять одна в одну залежно від конкретного нейроімунно-ендокринного стану організму. Деструктивна запальна стадія скорочується, і репаративні процеси починаються вже на 3-тю добу, одночасно з

початковим запальним періодом. Те ж саме стосується і ремодуляційних процесів [8-13,16,24-29,216].

Так, у контролі на 14-й день проліферативної стадії кількість лімфоцитів у ранці різко зменшилася до  $98,64 \pm 8,52$  клітин/мм<sup>2</sup>, ймовірно, через зменшення обсягу морфогенетичних реакцій у рані. У цей період відбувається трансформація грануляційної тканини вихідними клітинними структурами, зменшуються проліферативні процеси. Проте лімфоцитарна інфільтрація залишається значною порівняно з вихідним рівнем ( $41,27 \pm 3,74$  клітини/мм<sup>2</sup>), сприяючи успішності розвитку ремодуляції.

До 30-го дня кількість лімфоцитів у контрольних тварин все ще залишалася вищою, ніж у інтактних зразках шкіри —  $52,02 \pm 4,75$  клітин/мм<sup>2</sup>, що підтверджує пролонгацію ремодуляційних процесів. Роль лімфоцитів у перетворенні грануляційної тканини є дуже важливою. Вони підтримують Th2-тип імунної відповіді, модифікуючи макрофаги у M2-фенотип з відповідним набором цитокінів і ростових факторів (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , IGF-1) [11,99,217]. Основна роль лімфоцитів у цей період полягає у забезпеченні морфологічного відновлення тканин у процесі їх репарації. Таким чином, ремодуляція є балансом між продукцією тканинної структури та її ремодельованням у вихідний стан рани [11,218].

Важливою популяцією лімфоцитів у цей період залишаються Трег-клітини (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), які контролюють цей баланс через секрецію ростових факторів, таких як TGF- $\beta$ , і підтримують гомеостатичні межі проліферації та диференціації [137,219,220].

Підтвердження диференціаційної ролі лімфоцитів у загоєнні ран шкіри продемонстрували на прикладі гібридних мишей Rag2<sup>-/-</sup>IL2R $\gamma$ <sup>-/-</sup>, у яких відсутні Т- та В-лімфоцити адаптивного імунітету. У цих мишей спостерігалось уповільнення загоєння ран вже з 3-го дня, що відповідало піку запальної реакції, від успішності розв'язання якої залежать усі наступні фази репарації. У досліді також спостерігалася зсув макрофагів у бік M1-фенотипу, підвищені рівні

активації активних форм кисню (АФК) та зниження реваскуляризації, що ускладнювало загоєння на стадії ремоделювання [221].

Отже, наші дані та сучасні експериментальні дослідження підтверджують важливість регуляції та покращення загоєння ран завдяки різноманіттю популяцій лімфоцитів у функціональній взаємодії з іншими ІКК та структурними клітинами.

Проведений аналіз динаміки субпопуляцій лімфоцитів показав їх природну відповідність функціональним властивостям. Так, кількість  $CD3^+$  лімфоцитів, до яких входять  $CD4^+$  та  $CD8^+$  клітини, відображала їх співвідношення в загальній популяції лімфоцитів. У початкових гістологічних зразках шкіри контрольних тварин  $CD3^+$  лімфоцити мали найбільшу частку серед інших субпопуляцій, що відповідає їхній гомеостатичній ролі.

Так, динаміка  $CD3^+$  лімфоцитів протягом загоєння також відображала зміни загальної популяції лімфоцитів. Наприклад, максимальні значення  $CD3^+$  лімфоцитів спостерігалися на 7-й день –  $14,0 \pm 1,0$  %, що співпадало з піком конструктивних морфологічних перетворень та формування грануляційної тканини.

Хвилеподібне зростання Т-лімфоцитів і їхніх основних субпопуляцій під час загоєння ран із наступним зниженням до оптимальних значень відзначали й інші дослідники [47,115,220], підтверджуючи важливість імунологічного впливу на клітинні та гуморальні процеси при загоєнні ран.

Аналогічну хвильову динаміку спостерігали і для  $CD4^+$  та  $CD8^+$  субпопуляцій, що відображає їхню участь у репаративних процесах. Проте більш демонстративні функціональні особливості кожної субпопуляції оцінювалися через регуляторний індекс:

$$PI = CD4^+ / CD8^+$$

Початкове значення PI в непошкодженій шкірі –  $2,8 \pm 0,2$  % – свідчить, що активуючі сигнали  $CD4^+$  субпопуляцій значно переважали над супресивними властивостями  $CD8^+$  субпопуляцій, що характерно для фізіологічного оновлення клітин у шкірі. Найвищі значення PI спостерігалися на 1-й день після ранового

процесу –  $3,2 \pm 0,2$  %, що обумовлено необхідністю високої активації хелперних реакцій Th1-типу та M1-поляризації макрофагів, які спільно контролюють синтез провоспалювальних цитокінів: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , а також факторів росту TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF та інших.

У міру резолюції запальної реакції до 3-го дня PI наближалася до нормалізації –  $2,43 \pm 0,2$  %, при цьому відбувалася зміна парадигми запалення: домінування M1 макрофагів поступалося M2, що, разом із CD4<sup>+</sup> і CD8<sup>+</sup> лімфоцитами, забезпечувало протизапальний Th2-тип імунної відповіді із секрецією цитокінів IL-4, IL-5, IL-10 та ін.

На фоні розгортання проліферативної реакції та в період активного формування грануляційної тканини на наступній стадії (7-й день спостереження) спостерігалось різке зниження регуляторного індексу до 1,38. Високі проліферативні показники в рані були підтверджені маркером проліферації Ki67: у дермі на 7-й день його значення досягло максимального показника –  $8,1 \pm 1,6$  %, а в епідермісі –  $12,5 \pm 1,5$  %.

Слід зазначити, що на 7-й день спостереження були зафіксовані найвищі рівні субпопуляцій CD4<sup>+</sup> і CD8<sup>+</sup> лімфоцитів –  $7,7 \pm 1,0$  % та  $5,6 \pm 0,8$  % відповідно. Важливість супресивного контролю над проліферативними та диференціаційними реакціями обумовлена необхідністю запобігання ускладнень у вигляді келоїдних рубців, надмірного рубцювання, а також аутоімунних порушень і потенційного канцерогенезу.

В імунній системі оптимальний баланс між продукцією ефektorних і регуляторних клітин забезпечується завдяки різноманіттю хелперних підпопуляцій (наприклад, Th1, Th2 та деяких ILC), тоді як субпопуляції з супресивними властивостями включають Treg, CD8<sup>+</sup> та деякі ILC [218,219]. На 14-й день проліферативного періоду починають переважати інволюційні процеси в трансформації грануляційної тканини, проте морфогенетичне навантаження на імунну систему, особливо на її адаптивну складову, залишалось високим. Це пояснює значне зниження регуляторного індексу до  $2,23 \pm 0,14$  % порівняно з попереднім значенням на 7-й день.

До 30-го дня регуляторний індекс підвищився, наближаючись до початкового рівня, але залишався дещо зниженим через триваючі ремоделюючі процеси, які можуть тривати ще 5–6 тижнів.

На важливість гомеостатичного співвідношення ефекторних та регуляторних субпопуляцій лімфоцитів вказують у своїх роботах і інші дослідники. Так, у роботах Wang було досліджено час інфільтрації Т-лімфоцитів у рану шкіри мишей та їх субпопуляцій у процесі фізіологічної репарації шкірної рани у мишей дикого типу та у мишей із важким комбінованим імунodefіцитом (SCID), у яких відсутні лімфоцити [115].

Рани мишей SCID характеризувалися прискореним загоєнням, збільшенням запалення, обмеженою неоваскуляризацією та прискореним грубим рубцюванням порівняно з нормальними мишами. При адаптивному перенесенні у мишей SCID як змішаних В- і Т-лімфоцитів, так і лише CD4<sup>+</sup> лімфоцитів, спостерігалось помірно за часом загоєння, подібне до нормальних тварин, та зменшене запалення [115].

Ці дані підтверджують ключову роль запалення для забезпечення репаративних процесів на наступних стадіях, а також провідну роль CD4<sup>+</sup> Т-клітин на даному етапі загоєння ризаних ран [118].

Диференціальна роль CD4<sup>+</sup> та CD8<sup>+</sup> лімфоцитів у заживленні ран була досліджена у мишей із дефіцитом CD4<sup>+</sup> або CD8<sup>+</sup> клітин [223]. У ранах мишей з дефіцитом CD4<sup>+</sup> інфільтрація CD8<sup>+</sup> клітин відбувалася із затримкою на ранніх етапах загоєння (запалення та рання проліферація), тоді як до 10-го дня та пізніше спостерігалось відносно збільшення CD8<sup>+</sup> клітин. У ранах мишей із дефіцитом CD8<sup>+</sup> спостерігалось зменшення інфільтрації CD4<sup>+</sup> клітин, нейтрофілів і макрофагів, а також експресії цитокінів IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL1 та підвищення експресії IL-4 [224].

Рідке виявлення В-лімфоцитів у ранах шкіри змушувало дослідників вважати, що ця популяція лімфоцитів не бере особливої участі у репаративних процесах, проте дослідження останніх років показали їх специфічну участь у

фізіології та патології шкіри. Очевидною причиною складності аналізу у рані є їх мала кількість на перших етапах загоєння ран.

Так, ще в ранніх дослідженнях у людей після видалення пилонідального синуса було вивчено динаміку В-клітин порівняно з Т-лімфоцитами. Було виявлено обернену кількісну динаміку між Т- та В-лімфоцитами. Кількість В-клітин у гістологічних зразках на початку лікування становила  $1,0 \pm 0,4$  % на поле зору, а наприкінці лікування (42-й день) —  $9,5 \pm 3,6$ , тоді як кількість Т-лімфоцитів у ці строки була  $36,8 \pm 9,8$  та  $25,9 \pm 3,0$  відповідно. При цьому регуляторний індекс (PI) знижувався з  $3,6 \pm 0,3$  до  $2,1 \pm 0,3$ . Тобто, Т-лімфоцити, які були численними на початку лікування, зменшуються до його завершення, тоді як поодинокі В-лімфоцити на початку загоєння рани збільшуються до моменту закриття рани, утворюючи помітну кількість пропорційно Т-лімфоцитам [225].

У наших гістологічних зразках ми виявили таку ж динаміку Т- та В-лімфоцитів на етапах загоєння рани. Ми підтвердили дані інших авторів про надзвичайно малу кількість В-лімфоцитів у шкірі тварин. Так, до нанесення рани CD20<sup>+</sup> лімфоцити були рідкісною знахідкою, і їхнє середнє значення становило  $0,5 \pm 0,2$  %. На третій день запалення кількість В-лімфоцитів у прираневій зоні становила  $1,2 \pm 0,4$  %. У шкірі тварин їхня кількість залишалася одиничною навіть на піку пластичних процесів утворення та перетворення грануляційної тканини на 7-й та 14-й дні стадії проліферації загоєння різаних ран ( $1,5 \pm 0,5$  % та  $1,0 \pm 0,3$  % відповідно).

Відсутність участі В-лімфоцитів у заживленні ран, включно зі шкірою, була спростована низкою досліджень. Наприклад, у роботі Sîrbulescu, 2017, показано, що очищені зрілі живі наївні В-клітини (B220<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>) покращують загоєння гострих та хронічних діабетичних ран у мишей. Одноразове місцеве застосування В-лімфоцитів у діабетичних тварин призводило до повного загоєння ран у 43 % випадків хронічних виразок проти 5 % у контрольній групі. Застосування еквівалентної кількості Т-лімфоцитів або лізованих В-лімфоцитів не давало адекватного позитивного ефекту. Було

переконливо доведено, що В-лімфоцити у рані створюють прорегенеративне молекулярне мікросередовище, яке активує і модуляє все клітинне оточення, направляючи його на вирішення репаративних процесів: підвищується проліферація фібробластів, зменшується їх апоптоз, прискорюється васкуляризація грануляційної тканини та ріст нервових волокон у заживаючій рубцевій тканині. Передбачуваним механізмом продемонстрованих ефектів аплікації живих В-лімфоцитів є їх основна функція у гуморальному імунітеті: синтезовані В-лімфоцитами імуноглобуліни покращують кліренсні процеси через опсонізацію детриту пре- та апоптотичних клітин. Не можна також виключати гомеостатичний ефект живих клітин через прямі контакти з клітинами мікросередовища. Ці припущення підтверджуються численними дослідженнями наявності у плазмі крові, хоча й у низькому титрі, нормальних аутоантитіл до всіх білкових структур тканин [116].

Кількість лімфоцитів у гістологічних зразках шкіри дослідних тварин була очікувано так само різко знижена, як і інших ІКК, на фоні недостатності маси структурних компонентів органа. Основною причиною цього пригнічення, як ми вже зазначали вище, є деструктивне мікросередовище в органі, що виникає внаслідок агресивного ХСС. Надлишок гормонів системної осі (гіпоталамо-гіпофізарно-надниркова система разом із симпатичною нервовою системою) [20-23] та її регіонарного аналога у шкірі [123] супроводжується пошкодженнями клітинних компонентів шкіри, що сприяє виходу алармінів DAMPs і підвищенню агресивності коменсальних PAMPs, які разом змінюють захисну реакцію лімфоцитів у вигляді запалення в судинах, включно з судинами шкіри [226].

Підвищене антигенне навантаження на лімфоїдну систему прискорює функціональну втрату лімфоцитів. Однією з головних особливостей нейрогормональної регуляції імунологічних реакцій є вплив на міграційні властивості ІКК [20-23]. Так, фізіологічні дози кортикостероїдів і катехоламінів прискорюють їхню міграцію, сприяючи тимчасовому депонуванню в «шокових» органах, мобілізуючи організм на адекватну та прискорену фізіологічну реакцію або репарацію [112].

Фізіологічні короткотривалі стреси не порушують нормальну міграцію та оновлення клітин у мікросередовищі шкіри. При тривалому стресовому впливі міграційні процеси порушуються, що ускладнює відновлення пулу клітин у шкірі [112].

Як зазначали інші дослідники, лімфоцити дуже чутливі до ГК гормональних впливів. Протизапальна дія опосередкована впливом малих фізіологічних доз на лімфоцити, що впливає на їхню міграційну здатність, депонуючи їх у тканинах. У надоптимальних дозах, як у нашому досліді з ХСС у щурів, ГК знижують проліферативну активність і індукують апоптоз [227,228].

Протизапальна дія глюкокортикоїдів проявляється через інгібування Th1-типу імунної відповіді в мікросередовищі шкіри, при цьому опосередковано через систему макрофагів, нейтрофілів, кератиноцитів та інших клітин пригнічується синтез провоспалювальних цитокінів та ростових факторів (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) [189,229]. Дослідники вважають, що пригнічення негативного впливу ХСС через інгібіцію надмірних запальних реакцій є патогномонічним, тим самим зменшується інтоксикація та ушкодження самої імунної системи [189].

Водночас тривале пригнічення імунної реактивності супроводжується ускладненнями: підвищенням частоти інфекційних захворювань, алергічними та аутоімунними реакціями, онкогенезом. ГК, негативно впливаючи на активацію Th1-типу імунної відповіді, знижують вироблення провоспалювальних цитокінів, таких як IL-12 та IL-18, опосередковано через моноцити/макрофаги, які є ключовими для диференціації Th1, що призводить до їхнього зменшення в мікросередовищі шкіри. Ці ефекти опосередковано сприяють збільшенню диференціації Th2 [189].

Крім того, показано, що ГК можуть безпосередньо стимулювати продукцію цитокінів Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF, TGF- $\beta$ ), що вказує на пряме індукцію диференціації Th2. Існують також повідомлення, що після первинної активації Th2 стають клітинами пам'яті і довго зберігаються в

тканинах, включно зі шкірою, ініціюючи швидку імунну відповідь вторинного типу [229].

Таким чином, під впливом підвищеної кількості глюкокортикоїдів і катехоламінів у мікросередовищі шкіри дослідних тварин у певному обсязі збалансовані два типи імунної відповіді: Th1, опосередковані відповідним провоспалювальним набором цитокінів і ростових факторів, та антивоспалювальний Th2 тип імунної відповіді з відповідним набором цитокінів і системою регуляторних клітин Treg [189,229].

Тому, виходячи з даних літератури та наших досліджень, можна пояснити різке, майже дворазове зниження кількості всіх популяцій лімфоцитів у гістологічних зразках шкіри дослідних тварин — від початкового рівня в інтактних зразках ( $CD3^+$   $2,8 \pm 0,6\%$ ;  $CD4^+$   $1,4 \pm 0,6\%$ ;  $CD8^+$   $1,2 \pm 0,2\%$ ;  $CD20^+$   $0,3 \pm 0,1\%$ ) до 30-го дня спостереження після нанесення різаної рани ( $CD3^+$   $2,5 \pm 0,5\%$ ;  $CD4^+$   $1,2 \pm 0,5\%$ ;  $CD8^+$   $1,1 \pm 0,2\%$ ;  $CD20^+$   $0,3 \pm 0,1\%$ ). Амплітуда динаміки змін кількості лімфоцитів на кожному етапі відповідала їх функціональному значенню на кожній стадії загоєння ран.

Функціональні значення кількісних змін лімфоцитів були детально проаналізовані у групі експериментальних тварин. Основні фактори, що впливають на показники лімфоцитів, включають: по-перше - гальмування вільної міграції лімфоцитів та їх депонування у шкірі під впливом надлишку глюкокортикоїдів і катехоламінів, по-друге - підвищену утилізацію лімфоцитів при активному вирішенні імунологічних завдань під впливом підвищеної кількості гормон-обумовлених алергенів та їх надходження під час нанесення рани та репарації, по-третє - недостатню рециркуляцію ІКК та стромальних клітин, необхідна для нормального морфогенезу.

Наші припущення підтвердив аналіз співвідношення ефекторних і регуляторних субпопуляцій лімфоцитів у вигляді регуляторного індексу ( $PI = CD4 / CD8$ ). У контрольній шкірі початкове значення PI було  $2,82 \pm 0,21$ , а у дослідних тварин на різних етапах спостереження PI коливався в межах  $0,91 - 1,17$ . Наприкінці проліферативного періоду та на початку ремодуляції PI був

найнижчим —  $0,83 \pm 0,09$  на 14-й день, що свідчить про супресивний тип імунорегуляторних реакцій.

Супресія імунної відповіді, відображена динамікою Т-ефекторних і хелперних лімфоцитів, впливала на всі репаративні процеси загоєння ран.

#### **4.3 Участь клітин вродженого тканинного (регіонарного типу): мастоцитів та еозинофілів приранової зони шкіри шурів у загоєнні різаної рани після впливу ХСС**

Отримані результати динаміки змін кількості на функціонального стану мастоцитів в шкірі переконливо підтверджують дані літератури щодо провідної ролі мастоцитів у ПВСТ та їх тісного функціонального зв'язку з головною регуляторною системою організму — нейроімуноендокринною системою [230]. Саме від функціонального стану мастоцитів значною мірою залежить метаболізм клітин, тканин і органів, що реалізується через циркуляцію гуморального внутрішнього середовища: плазма крові — тканинна рідина — лімфа.

Разом із тим адекватна інтерпретація отриманих результатів можлива лише за умови комплексної оцінки гістологічної динаміки мастоцитів у пухкій сполучній тканині. Відомо, що в цій тканині відбувається постійне оновлення популяції мастоцитів за рахунок прекурсорів кісткового мозку, які диференціюються в автономний клітинний тип, реалізують спектр регуляторних функцій і завершують клітинний цикл [231]. Кількісні зміни мастоцитів у процесі загоєння хірургічних ран тісно пов'язані з їх функціональною активністю, насамперед із синтезом і вивільненням БАР шляхом дегрануляції.

Фізіологічний перебіг ранового процесу в контрольній групі можна охарактеризувати таким чином. Нами встановлено, що вихідна кількість мастоцитів у контрольних тварин до нанесення рани становила  $0,95 \pm 0,09$  на  $0,01 \text{ мм}^2$ , що відповідає даним інших авторів [232]. Переважна більшість цих клітин належала до 1-го типу та мала середній розмір  $5,1 \pm 0,30 \text{ мкм}$ , який було прийнято за базовий показник для даної гістологічної серії. Незначна частка мастоцитів 2-

го типу з частковою дегрануляцією, імовірно, забезпечувала локальні фізіологічні потреби без додаткової інтенсифікації синтетичних процесів, що супроводжувалося зменшенням їх розмірів до  $3,5 \pm 0,09$  мкм.

Нанесення рани як чинник порушення структурного гомеостазу призводило до активації мастоцитів, спрямованої на забезпечення репаративної регенерації. У контрольних тварин це проявлялося помірним збільшенням їх кількості та підвищенням дегрануляційної активності, особливо в гострій фазі запалення. На 1-шу добу з'являлися клітини 3-го типу (до 55,2 %), а частка клітин 2-го типу сягала 19,1 %, що відображало інтенсивну реалізацію дренажної та протиінфекційної функцій.

Подальше зростання кількості мастоцитів у проліферативній фазі (7–14-та доби) до  $4,38 \pm 0,20$  та  $4,61 \pm 0,07$  на  $0,01$  мм<sup>2</sup> відповідно відбувалося на тлі зниження їх дегрануляційної активності. Це свідчить про зміну функціональних завдань клітин: від гострої запальної відповіді до регуляції реконструктивних процесів. Наприкінці проліферативної фази та в період ремоделювання (30-та доба) мастоцити були представлені виключно 1-м типом, що вказує на завершення активної фази секреції БАР і стабілізацію тканинного гомеостазу [232].

У ці періоди формування грануляційної тканини, її реваскуляризація, реепітелізація та рубцювання вимагали тонкої імунної корекції стадійно- та диференційно-специфічного гістогенезу в пухкій сполучній тканині. Функціонування мастоцитів у контрольній групі відбувалося в межах фізіологічних розмірів (5,1–6,6 мкм), що свідчить про адекватний баланс синтезу та екзоцитозу БАР із збереженням цитоскелетних структур. Виняток становили мастоцити 3-го типу, зафіксовані на 1-шу добу, розміри яких досягали  $10,2 \pm 0,11$  мкм; після повної дегрануляції та дезорганізації цитоскелета вони, ймовірно, вступали в апоптоз.

Соціальний стрес, подібно до інших його форм, є ушкоджувальним чинником, що через гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникову вісь порушує як системну нейроімуноендокринну регуляцію, так і локальні тканинні регуляторні

механізми, зокрема функціонування мастоцитів [232]. Гормоноподібні медіатори стресу (кортизол, хемокіни та інші гуморальні фактори) насамперед змінюють міграційну спрямованість клітин внутрішнього середовища, а при тривалій дії — модулюють проліферацію їх прекурсорів аж до індукції апоптозу. Саме з цих позицій можна пояснити контрастні кількісні та функціональні зрушення мастоцитів у експериментальній групі.

У тварин, які зазнали хронічного соціального стресу, вже в інтактній шкірі (до нанесення рани) реєструвалося багаторазове зростання кількості мастоцитів — у середньому до  $9,47 \pm 0,23$  на  $0,01 \text{ мм}^2$  проти  $0,95 \pm 0,03$  у контролі ( $p < 0,001$ ). Значна частка цих клітин ( $36,4 \pm \%$ ) належала до 2-го типу й мала збільшені розміри ( $7,9 \pm 0,08 \text{ мкм}$ ), що, ймовірно, відображало компенсаторну активацію синтетичних процесів.

З огляду на те, що зрілі мастоцити не проліферують у ПВСТ [231], таке зростання їх кількості можна пояснити лише посиленою міграцією клітин і їх попередників із кісткового мозку та інших органів. Подібна міграційна перерозподільна реакція клітин в умовах стресу розглядається як складова стадії напруження загального адаптаційного синдрому за Сельє [233].

Поєднання хронічного соціального стресу з хірургічним ушкодженням мало адитивний негативний ефект на перебіг репаративного процесу. У експериментальній групі максимальна дегрануляція мастоцитів 3-го типу з ознаками каріорексису та дезорганізації цитоскелета зберігалася до 7-ї доби, що свідчить про надмірне функціональне напруження клітин. Збільшення їх розмірів до  $24,1 \pm 3,54 \text{ мкм}$  на 3-тю добу, ймовірно, було наслідком цитоскелетної дезорганізації.

Протягом усього періоду спостереження (1–30-та доби) частка мастоцитів 2-го типу залишалася підвищеною, а їх розміри перевищували контрольні значення, що свідчить про інтенсивний синтез БАР. Зменшення загальної кількості мастоцитів у певні періоди можна пояснити їх активною утилізацією у фазах запалення та проліферації, що супроводжувалося стрес-індукованою дезорганізацією міграційних і проліферативних реакцій. Водночас повторне

зростання їх кількості на 30-ту добу ( $5,68 \pm 0,76$  на  $0,01 \text{ мм}^2$ ), понад половини з яких належали до 2-го типу, відображає компенсаторну відповідь на зтяжний характер регенерації.

Аналіз індексу дегрануляції підтверджує ці висновки. У контрольній групі він мав фонові значення ( $6,66 \pm 0,11 \%$ ), різко зростаючи у фазі запалення та знижуючись у проліферативній фазі до нуля. У експериментальній групі індекс дегрануляції залишався підвищеним протягом усього експерименту, що є переконливим свідченням хронізації репаративного процесу.

Кореляційний аналіз розмірів мастоцитів і типів дегрануляції також вказує на принципові відмінності між групами. У контролі зв'язок між цими показниками був переважно слабким або негативним і ставав позитивним лише в гострій фазі запалення. Натомість у експериментальній групі кореляція була здебільшого позитивною та досягала функціонально значущих рівнів, що відображає постійне функціональне напруження мастоцитів.

Проведене дослідження також продемонструвало високу інформативність цитоморфометричного аналізу. Регулярні зміни амплітуди розмірів мастоцитів у різні фази ранового процесу, ймовірно, пов'язані з міграцією постпроліферативних попередників із кісткового мозку. Такі клітини мають мінімальні розміри ( $3,1\text{--}3,5 \text{ мкм}$ ), що відповідає загальним уявленням про морфологію постпроліферативних клітинних популяцій [234] і зумовлено швидкими послідовними мітозами, за яких об'єм цитоплазми тимчасово зменшується.

Еозинофіли функціонально належать до запальної групи клітин вродженого імунітету, відомих своєю роллю у протипаразитарних, алергічних та автоімунних реакціях. Однак дослідження останніх років суттєво розширили уявлення про функціональні можливості еозинофілів, як і інших клітин вродженого імунітету — нейтрофілів, макрофагів та ін., з якими вони структурно й функціонально пов'язані в інтегровану систему клітин вродженого імунітету, що забезпечує гомеостаз органів і систем організму, включаючи слизові

оболонки, шкіру, серцево-судинну систему, нервову систему, скелетну мускулатуру та пухку волокнисту сполучну тканину [235-237].

Після утворення в кістковому мозку еозинофіли мігрують через кров у відповідні органи, займаючи в тканинах певні ніші. Їхня протекторна функція та виживання забезпечуються такими факторами, як IL-3, GM-CSF та IL-5. Останній також виступає хемоатрактантом для еозинофілів. Описані інфільтруючі субпопуляції еозинофілів і тканинні резидентні популяції. Показано, що еозинофіли, які перебувають у нормальних тканинах, мають імунорегуляторні властивості, тоді як при алергічних реакціях (наприклад, при астмі) у легеневу тканину мігрують запальні еозинофіли [236,238,239].

Запальні та регуляторні еозинофіли відрізняються за експресією маркерів CD101 (костимулюючий маркер) і CD62L (L-селектин — молекула адгезії). Запальний тип характеризується високою експресією CD101 і низькою CD62L, тоді як регуляторні еозинофіли мають низьку експресію CD101 і помірну CD62L [240].

У запальних реакціях еозинофіли підтримують Th2-тип імунної відповіді, формуючи протизапальне мікросередовище з секрецією протизапальних цитокінів (IL-4, IL-10, IL-12, IL-17) та факторів росту (TGF- $\beta$ ). Водночас еозинофіли сприяють модуляції макрофагів із M1-типу в M2-тип, забезпечуючи прорегенеративний напрям репаративних процесів. Зокрема, у дослідженнях показано, що за дефіциту еозинофілів відзначається затримка регенерації скелетної мускулатури, що свідчить про важливість секретованих ними факторів [241,242].

Нами було досліджено роль еозинофілів у фізіологічній регенерації шкірної рани та після впливу хронічного соціального стресу. У гістологічних зразках шкіри контрольних тварин еозинофіли виявлялися як до нанесення рани, так і після — на рівні поодиноких клітин (у середньому 0,02 клітин/мм<sup>2</sup>). Винятком був перший день після нанесення рани, коли їх кількість зросла у чотири рази (0,08  $\pm$  0,12 клітин/мм<sup>2</sup>).

Порівняльний аналіз динаміки мастоцитів і еозинофілів у стресованих тварин показав, що кількість мастоцитів в інтактних зразках шкіри до нанесення рани перевищувала контрольні показники у 10 разів ( $9,47 \pm 0,23$  клітин на  $0,01 \text{ мм}^2$  проти  $0,95 \pm 0,03$  клітин на  $0,01 \text{ мм}^2$ ) із індексом дегрануляції  $36,37 \pm 0,81 \%$ , а також зі збільшенням середніх розмірів клітин і щільності гранул. Біологічно активні речовини, що вивільнялися з гранул мастоцитів, у тому числі в позаклітинний матрикс, свідчили про ініціацію запальної реакції на аларміни стресу та активацію сапрофітної мікрофлори шкіри. Підвищена експресія нейропептиду CGRP додатково підтверджувала розвиток запалення.

У запальний період ранового процесу, попри зменшення кількості мастоцитів удвічі, їх функціональна активність досягала максимальних значень: частка повної дегрануляції значно зростала в перші дні. У цей же період кількість еозинофілів у перший день піку запалення різко збільшувалася, а в період резолуції зменшувалася, хоча й залишалася значно вищою за контрольні показники. Таким чином, протягом усього запального періоду інфільтрація еозинофілів у ранову зону була максимальною, що відповідає їхній регуляторній ролі.

На ранній стадії проліферації у контрольних тварин активно формувалася грануляційна тканина, тоді як у стресованих тварин утворення грануляцій мало острівцевий характер, а кількість еозинофілів залишалася підвищеною. З огляду на те, що еозинофіли разом із макрофагами M2 підтримують протизапальний (Th2) контекст мікросередовища, можна припустити, що у стресованих тварин запальний період хронізувався та частково переходив у проліферативну фазу.

Наприкінці проліферативного періоду та у фазі ремоделювання кількість еозинофілів знижувалася до контрольних значень, що свідчило про домінування репаративних процесів. Водночас відзначалося компенсаторне підвищення кількості мастоцитів із частковою дегрануляцією, однак без відповідного збільшення еозинофілів, як це спостерігалось після хронічного стресу до нанесення рани.

Багато дослідників описують функціональну взаємодію мастоцитів і еозинофілів при запальних реакціях [237,238,243]. Хронічний стрес супроводжується підвищеним синтезом гормонів наднирників, що сприяє накопиченню мастоцитів у шкірі та їх переорієнтації з прозапального на протизапальний цитокиновий профіль із домінуванням IL-10. Останній посилює дегрануляцію мастоцитів, модулює Th2-мікросередовище та сприяє рекрутингу еозинофілів [244,245].

Еозинофіли здатні взаємодіяти з мастоцитами через механізми формування позаклітинних пасток, фагоцитоз гранул і клітин, а також ефероцитоз. Вони відзначаються стійкістю до агресивного запального мікрооточення та здатністю до тривалого виживання. За наявності аутокринних протективних факторів (IL-3, особливо IL-5) блокуються шляхи спонтанного апоптозу, що подовжує тривалість їх життя до двох і більше тижнів [246-249].

#### **4.4 Взаємозв'язок між кількісними показниками імунокомпетентних клітин та репарацією шкіри після впливу хронічного соціального стресу**

Встановлена динаміка показників лейкоцитів у процесі загоєння різаної рани шкіри у контролі у лабораторних щурів та після перенесеного ХСС. Їхній аналіз виявив наступні закономірності:

Підтверджена концепція шкіри як імунокомпетентного органу [250], що тісно взаємодіючий із системними регуляторними комплексами: центральною та периферійною нервовими системами, ендокринною та імунною системами. Центральна регуляторна вісь здійснюється через ГГН за участю симпатичної нервової системи. Регіонарний компонент ШІНЕ включає імунні та неімунні структурні клітини (кератицити, фібробласти, ендотеліоцити), які в екстремальних ситуаціях можуть синтезувати подібні медіатори, активуючи регіонарну ГГН-вісь і адаптуючи її під конкретну фізіологічну ситуацію.

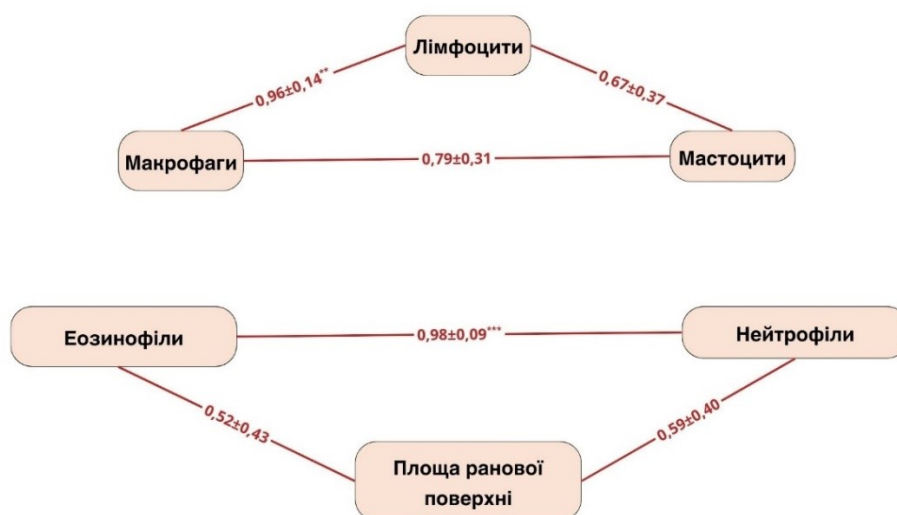
Виходячи з функціональної взаємодії центральної та регіонарної осі, функціональні особливості проявляли й лейкоцити, які можна поділити на

системного та регіонарного рівня регуляторної функції. Центральну системну ГГН-регуляцію проявляли нейтрофіли, моноцити/макрофаги, лімфоцити, здатні до периферичної міграції та рециркуляції. У лімфоцитів, як клітин адаптивного імунітету, ця функція найбільш виражена. Регіонарну автономну ГГН-регуляцію більше проявляли мастоцити та еозинофіли.

Виявлено субстрат, який переважно контролює конкретна популяція лейкоцитів. Регіонарні резидентні еозинофіли та системні нейтрофіли контролюють переважно гомеостаз внутрішнього середовища позаклітинного матриксу трофічної пухкої волокнистої сполучної тканини шкіри. Макрофаги та лімфоцити системного імунітету як провідні клітини здійснюють загальний контроль клітинного та гуморального гомеостазу організму, включно з усіма шарами шкіри. Мастоцити, належачи до регіонарних за місцем розташування та функціями, є центральними у системі ШІНЕ, відповідаючи за гомеостаз внутрішнього середовища ПВСТ та клітинний склад усіх шарів шкіри, що підтверджує їхню синаптичну взаємодію з периферійними відділами нервової системи.

Виходячи з наведених закономірностей, логічно пояснюються встановлені попарні кореляції та мережа взаємодій між клітинами. У групі контрольних тварин центральна та регіонарна осі збалансовано регулювали співвідношення імунних клітин відповідно до стадій загоєння різаної рани шкіри та функціонального відповідності мікрооточенню конкретної популяції імунних клітин, що підтверджується кореляційним аналізом.

Показники кореляційних взаємозв'язків у групі контролю представлені в рисунку 4.1.



**Рисунок 4.1** – Схема кореляційних взаємозв'язків ІКК у групі контролю. Рисунок створено авторкою за допомогою Canva.

Лімфоцити та макрофаги сильно корелюють між собою ( $r = 0,96 \pm 0,14$ ), оскільки кожна з цих популяцій, виходячи зі своєї ієрархічної специфічності, контролює структурний і гуморальний гомеостаз всього організму, включно з ранною шкіри, у тісній функціональній взаємодії. Макрофаги, як компонент вродженого імунітету, філогенетично контролюють загальний пластичний морфогенез, клітинну та гуморальну його складову, тоді як лімфоцити, представники системного адаптивного імунітету, забезпечують тканинний гомеостаз диференціації відповідно до генотипу конкретного організму. У зв'язку з цим їхні кількісні зсуви значно перекривають усі інші клітинні популяції імунної системи у тканинах шкіри.

Мастоцити помірно корелюють із лімфоцитами та макрофагами ( $0,67 \pm 0,37$  і  $0,79 \pm 0,31$ ). Мастоцити належать до клітин регіонарного тканинного рівня, але, будучи основними імунними клітинами конкретного органу — шкіри, контролюють структурний та гуморальний гомеостаз шарів шкіри у взаємозв'язку з системними популяціями імунних клітин — макрофагами та лімфоцитами.

Нейтрофіли та еозинофіли дуже сильно пов'язані ( $0,98 \pm 0,09$ ). Хоча нейтрофіли належать до системного рівня імунологічного контролю, а еозинофіли — до регіонарного тканинного, обидві популяції здійснюють

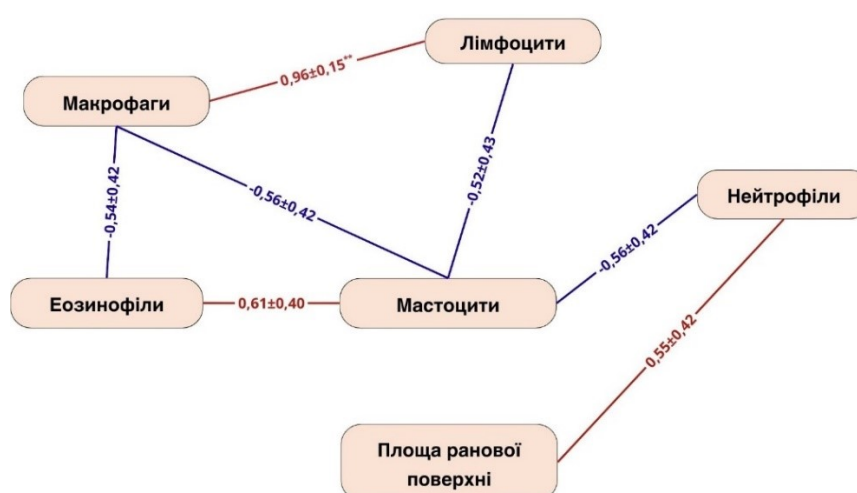
імунологічний контроль однієї субстанції — внутрішнього середовища організму, її позаклітинного матриксу трофічної ПВСТ, де розташована мікрокапілярна сітка кровоносних і лімфатичних судин.

Площа рани помірно корелює з кількістю нейтрофілів ( $0,59 \pm 0,40$ ) та еозинофілів ( $0,52 \pm 0,43$ ).

Загоєння різаної шкіри залежить від реваскуляризації кровоносних та лімфатичних капілярів, що розташовані у ПВСТ, забезпечуючи рециркуляцію гуморального компонента внутрішнього середовища — плазми крові, тканинної рідини та лімфи.

Слід враховувати, що корельовані члени відносяться до різних рівнів вимірювань: клітини — до мікроскопічного, площа загоєння — до макроскопічного, із різною мірою похибки, тому середні рівні кореляції у мережі рани можна вважати досить переконливими та достовірними.

Показники кореляційних взаємозв'язків у групі після ХСС представлені в рисунку 4.2.



**Рисунок 4.2** – Схема кореляційних взаємозв'язків ІКК у експериментальній групі. Рисунок створено авторкою за допомогою Canva.

Хронічний стрес змінює системні та регіонарні взаємодії імунних клітин у шкірі, зокрема при загоєнні ран. Підвищене кількість гормонів центральної та регіонарної мереж призводить до пошкодження клітин, виникають аларміни

(DAMP), активуються сапрофітні організми (PAMP), на які реагують запальними реакціями імунні та неімунні клітини шкіри.

У стресових умовах катехоламіни сприяють депонуванню мастоцитів та активують їх дегрануляцію у ПКМ шкіри та рани, посилюючи запальну реакцію. На регуляцію запалення інфільтрують у шкіру та рану еозинофіли, накопичуючись у місцях локалізації мастоцитів, регулюючи силу запальної реакції, ініційованої ними. Підвищення кортизолу при стресі гальмує рециркуляцію лейкоцитів системного рівня: нейтрофілів, моноцитів/макрофагів, лімфоцитів, внаслідок чого їхня кількість у шарах шкіри у прираневій зоні зменшилась більш ніж удвічі.

Таким чином, на всіх етапах загоєння ран, починаючи із запалення, відбувалась інгібіція провоспальних імунологічних реакцій Th1 з їх M1-клітинами, значно поступаючись протизапальному Th2 з модифікацією макрофагів у M2. Це порушення взаємодії імунних клітин призвело до недостатнього розвитку запальної реакції та її хронізації, від чого залежали наступні стадії загоєння, що ілюструється кореляційним аналізом:

Лімфоцити та макрофаги залишалися сильно пов'язаними ( $0,96 \pm 0,15$ ). Вони, як головні клітини вродженого та адаптивного імунітету системного рівня, кількісно та функціонально тісно взаємодіяли в фізіологічних і стресових умовах.

Еозинофіли позитивно пов'язані з мастоцитами ( $0,61 \pm 0,40$ ). Мастоцити та еозинофіли, як головні клітини вродженого імунітету регіонарного рівня, взаємопов'язані у контролі гомеостазу тканин внутрішнього середовища та їх ПКМ.

Площа рани помірно корелює з лімфоцитами, нейтрофілами, еозинофілами ( $0,47-0,55$ ).

Мастоцити та еозинофіли негативно корелюють з лімфоцитами, нейтрофілами та макрофагами ( $-0,52 - -0,56$ ). Це підкреслює тип їх участі в імунних реакціях (регіонарний і системний відповідно) і результат гормонального впливу: мастоцити та еозинофіли контролюються рекрутуванням

симпатичної нервової системи (катехоламінами), тоді як нейтрофіли, лімфоцити та макрофаги під впливом кортизолу гальмували своє оновлення у шкірі через рециркуляцію.

#### **4.5 Особливості молекулярно-клітинних взаємодій в процесі загоєння різаних ран в умовах ХСС**

Загоєння ран — це впорядкований процес, який починається передбачуваним чином при кожному ушкодженні тканин. У здорових людей загоєння послідовно проходить через три перекривні фази і оркеструється великою кількістю цитокінів, хемокінів та інших сигнальних молекул [8-13].

Успіх на пізніших фазах значною мірою залежить від резолюції попередніх фаз. Так, фаза запалення охоплює три критично важливі елементи, які потребують залучення клітин із кровообігу: пасивну агрегацію тромбоцитів для гемостазу, приплив нейтрофілів для контролю інфекції та накопичення макрофагів для ініціювання процесів репаративної регенерації [8-13].

Аутофагія відіграє важливу роль у різних фазах загоєння ран. Наприклад, у фазі запалення аутофагія запобігає інфікуванню та негативно регулює запальну реакцію, що запобігає надмірному запаленню й ушкодженню тканин [251].

У проліферативній фазі локальна гіпоксія в рані може викликати аутофагію, яка відіграє роль в анти- та проапоптозі, й оксидативному стресі й сприяє виживанню клітин. Одразу після формування грануляційної тканини, починається її ремоделювання й перехід до фінальної стадії загоєння ран. Завершальна стадія загоєння ран — це ремодуляція, під час якої грануляційна тканина поступово (інколи навіть протягом кількох місяців) регресує та перетворюється на зрілу функціональну тканину [251-254].

Аутофагія ендотеліоцитів судин покращує ангиогенезу в ран, а аутофагія кератиноцитів підтримує їхню диференціацію, проліферацію та міграцію, що сприяє завершенню реепітелізації ран. У фазі ремоделювання аутофагія фібробластів впливає на формування гіпертрофічних рубців. Крім того,

рефрактерна діабетична рана може бути пов'язана з підвищеним рівнем аутофагії, а регуляція аутофагії мезенхімальних стовбурових клітин може сприяти їх застосуванню для покращення загоєння ран [255-257].

Відома роль білків теплового шоку в загоєнні ран. Так, HSP70 прискорює закриття рани, що полягає у стимуляції опосередкованого макрофагами фагоцитозу залишків рани. Інгібування опосередкованого HSP70 посилення фагоцитозу нівелює опосередковане HSP прискорення процесу загоєння. HSP70 стимулює механізми ендогенної цитопротекції, позитивно впливає на енергозабезпечення процесів репаративної регенерації та пролонгує тривалість дії фактора, індукованого гіпоксією HIF-1 [258,259].

HIF-1 — фактор-1, індукований гіпоксією — як головний регулятор кисневого гомеостазу, є одним із чинників, що визначають результат репарації. HIF-1 бере участь у всіх стадіях загоєння ран завдяки своїй ролі в міграції клітин, їх виживанні в умовах гіпоксії, проліферації, вивільненні факторів росту та синтезі матриксу протягом усього процесу загоєння. Активація HIF-1 також є одним із стимулів ангіогенезу — утворення нових кровоносних судин із уже існуючих — як у фізіологічних, так і в патологічних умовах. HIF-1 регулює експресію фактора росту ендотелію судин (VEGF), потужного ангіогенного чинника, а також інших ангіогенних факторів росту, зокрема ангіопоетину-2 та фактора-1, у процесах загоєння ран [260,261]. Дефіцит HIF-1 за патологічних станів може призводити до уповільнення процесів загоєння ран [262-264].

Отримані нами дані про активацію апоптозу під час загоєння ран узгоджуються з сучасними уявленнями. Апоптоз є доволі дослідженим багатьма вченими у різноманітних фізіологічних процесах, в той час як в загоєнні ран шкіри він лише нещодавно став вивчатися. Апоптоз є необхідним для нормального загоєння ран, особливо для видалення запальних клітин та формування рубців. Оскільки популяції клітин швидко розмножуються під час проліферативної фази, їх кількість на подальших стадіях урівноважується апоптозом. Наприклад, ІКК повинні елімінуватися, щоб розпочалася наступна стадія загоєння; інакше постійне запалення може призвести до незагойних ран.

Аналогічно, грануляційна тканина має зменшити клітинність, щоб пройшла ремодуляція з формуванням рубця. Таким чином, прояснилися деякі ключові ролі апоптозу в процесі загоєння ран: запальні клітини піддаються апоптозу, забезпечуючи прогресування нормальної ркгенерації тканин [265-267].

Апоптоз постійно спостерігався в ІКК під переднім краєм мігруючого епітелію. Це може бути доказом того, що апоптоз є сигналом про завершення запальної фази загоєння ран. Відомо, що патологічні стани (діабет, атеросклероз, тощо) можуть пролонгувати апоптотичні реакції і негативно впливати на процеси загоєння ран на тлі пригнічення антиапоптотичного білка Bcl-2 [268,269].

Нами встановлено, що хронічний соціальний стрес пролонгував апоптотичні реакції і викликав дефіцит Bcl-2. Отримані нами дані також стосуються змін сигнального шляху SIRT1/Nrf2/p62 під час загоєння ран у нормі та після хронічного соціального стресу. Сигнальний шлях ядерного фактора еритроїдного 2 (NFE2L2 або NRF2) зменшує окислювальні ушкодження та бере участь у регуляції експресії антиоксидантних генів у відповідь на окислювальний стрес, тим самим покращуючи захист клітин. Також, активація сигнального шляху NRF2 підвищує стійкість клітин до хімічних канцерогенів і запалення. Цей сигнальний шлях регулює протизапальні та антиоксидантні ефекти, впливаючи на іони кальцію, мітохондріальний окислювальний стрес, аутофагію, ферроптоз, піроптоз і апоптоз. Після активації NRF2 він може підвищувати регенерацію епітелію [270-273]. Подальші дослідження показали, що активатори або промотори NRF2 використовуються як ефективний ранозагоюючий засіб [274]. Підвищені рівні NRF2 тимчасово модулюють експресію судинних генів у ранах, що може прискорювати загоєння хронічних ран. Механізм дії NRF2 досі не до кінця визначений, проте відомо, що NRF2 переважно впливає на запальну та проліферативну фази загоєння ран [275,276].

Стрес може впливати на протікання всіх стадій загоєння через численні імунні та нейроендокринні шляхи. Встановлено, що підвищена секреція глюкокортикоїдів, викликана стресом, впливає на уповільнення загоєння ран та

розвиток хронічних незагоєваних ран. Описано як підвищення, так і зниження регуляції про- та протизапальних цитокінів під впливом глюкокортикоїдів [118].

ХСС призводить до порушення аміноспецифічної системи мозку. Так, на моделі соціального стресу встановлено, що на фоні порушень настрою та тривожності спостерігалось зниження рівня серотоніну, його вивільнення, зворотного захоплення та зменшення експресії білка-транспортера серотоніну (SERT) [277-279].

Серотонін - моноаміновий нейротрансмітер, добре відомим своїми антидепресантними властивостями в ЦНС. Серотонін також впливає на встановлення гомостазу та репарацію тканин [280,281]. В різних органах також виявлено регенеративний та фібропроліферативний потенціал серотоніну. Блокування сигнальних шляхів серотоніну порушує регенерацію шкіри, а дефіцит серотоніну посилює апоптоз [282,283]. Інгібування апоптозу може стати новим напрямом комплексної терапії ранозагоювання. Досліджено роль серотоніну при використанні селективних антидепресантів — інгібіторів зворотного захоплення серотоніну у тварин з експериментальними ранами [284].

Відтворений нами хронічний соціальний стрес, виходячи з виявлених специфічних порушень психоемоційної поведінки тварин (тривожність, страх, депресія), протікав на фоні дефіциту серотоніну. Усе це дає підстави припустити, що негативний вплив хронічного соціального стресу на процеси репаративної регенерації шкіри може бути пов'язаний із пригніченням серотонінової трансмісії та дефіцитом серотоніну.

Відомо, що соціальний стрес призводить до пригнічення дофамінової трансмісії в мезолімбичній, тубероінфундибулярній та мезокортикальній системах мозку. Хронічні психосоціальні стреси викликають дофамінергічну дисфункцію. Довгостроковий вплив психосоціальних стресорів (соціальна ізоляція, дискримінація, віктимізація та інші негативні соціальні впливи) пов'язаний зі значним зниженням здатності до синтезу дофаміну [285-288].

Дофамін – це катехоламіновий нейротрансмітер, який виділяється симпатичними нервовими закінченнями, і останні дослідження

продемонстрували його потужну антиангіогенну дію. Також, дофамін регулює експресію транскрипційного фактора гомеобоксу *NoxD3* і його цільового інтегрину  $\alpha 5\beta 1$ , які впливають на ангіогенез ран [289-292]. Стимуляція дофамінових рецепторів, що присутні в дермальних фібробластих, відновлює продукцію цими клітинами VEGF-A через шлях протеїнкінази A (PKA), що призводить до адекватного ангіогенезу та подальшого загоєння шкіри [293]. В протифагу, дефіцит дофаміну призводить до порушення експресії VEGF-A та ранозагоєння [294-296]. Високі концентрації дофаміну можуть призводити до підвищення фосфорилування VEGFR-2 та серин/треонінової протеїнкінази) а також стимулювати міграцію мезенхімальних клітин-попередниць людини шляхом активації рецепторів D2 на їхній поверхні. Дофамін може посилювати ангіогенез і загоєння ран через вплив на дофамінові рецептори D1, водночас погіршуючи загоєння ран при активації рецепторів D2 [295-300].

Виходячи з даних авторів, можна зробити висновок, що змодельований нами хронічний соціальний стрес, з огляду на зміни в поведінці тварин — зниження загальної рухової активності, зменшення пізнавальної активності — свідчить про значне пригнічення дофамінової трансмісії, що також призводить до порушення процесу загоєння ран. Соціальний стрес може спричиняти тривалі за наслідками порушення в нітроксидергічній системі. Показано, що вирощування в ізоляції після відлучення від матері призводить до порушення експресії ізоформ білка nNOS та iNOS (зниження pNOS у корі головного мозку й мозочку та підвищення iNOS у гіпокампі). Підвищений оксидативний стан зумовлює інактивацію NO та посилене утворення пероксинітриту [301,302].

Ми не маємо прямих або опосередкованих експериментальних даних щодо змін системи NO у наших щурів після хронічного соціального стресу, однак, спираючись на наведені вище дослідження, можемо висловлювати відповідні припущення. Відомо, що NO та його цитотоксичні деривати підвищують клітинну чутливість до сигналів, опосередкованих через рецептори Fas. Пероксинітрит може пригнічувати експресію Bcl-2 [302]. Нітрозативний стрес пригнічує процес ангіогенезу, пригнічує транскрипційну активність і порушує

процеси загоєння ран [303-305]. Пероксинітрит негативно впливає на фізіологічні процеси шкіри — проліферацію кератиноцитів і фібробластів, синтез колагену, мікроциркуляцію, іннервацію та залучення ІКК при репарації [306]. АФК, NO та його цитотоксичні продукти при патологічних станах, що супроводжують загоєння ран (стрес, цукровий діабет, атеросклероз, злоякісні новоутворення), порушують сигнальний шлях тканинного фактора росту TGF- $\alpha$ 1, пригнічують експресію факторів росту FGF, HIF-1 $\alpha$ , HSP70, VEGF, порушують ангиогенез і спричиняють неконтрольоване посилення апоптозу [307-312].

Отримані нами результати дозволили виявити негативний вплив хронічного соціального стресу на процеси загоєння шкіри на різних рівнях та стадіях. Так, індуковані соціальним стресом нейро-імуно-ендокринні зміни викликають посилення й пролонгацію апоптотичної активності, зниження транскрипційної активності та експресії факторів ендогенної цитопротекції, що в кінцевому підсумку спричиняє затримку та порушення процесів загоєння різаної рани шкіри.

Незважаючи на фундаментальність отриманих результатів, дане дослідження має певні методологічні та трансляційні обмеження, які окреслюють перспективи для наших подальших наукових розвідок.

По-перше, гендерні та вікові обмеження. Використання виключно дорослих самців (віком 12–13 місяців) було необхідним для стандартизації стрес-реактивності. Проте це унеможливорює оцінку статевого диморфізму в реакції на соціальний стрес та його впливу на загоєння ран. За межами нашого дослідження залишився вплив естрогенів або модулююча дія тестостерону на регенераторний потенціал. Крім того, фокус на одній віковій групі залишає відкритими питання щодо перебігу цих процесів в організмах, дитячого віку, або за умов старіння.

По-друге, топографічні та морфологічні особливості. Моделювання рани проводилося на ділянках шкіри, вкритої волоссям. Відповідно, отримані результати слід з обережністю екстраполювати на процеси загоєння товстої шкіри (позбавленої волоссяних фолікулів), оскільки цикли росту волосся (анаген,

катаген, телоген) щільно пов'язані з активністю та кількістю стовбурових клітин волосяних фолікулів та здатні локально впливати на репаративні процеси.

По-третє, трансляційні обмеження. Оскільки дослідження виконано *in vivo* виключно на щурах (*Rattus norvegicus*), пряма екстраполяція виявлених молекулярних механізмів на людину потребує подальшої валідації на моделях із використанням клітин людини або в клінічних умовах. Також поведінкове фенотипування тварин базувалося переважно на тесті "Відкрите поле", тоді як залучення ширшої панелі когнітивних тестів у майбутньому дозволило б глибше оцінити зв'язок між нейропластичністю та репарацією.

## ВИСНОВКИ

1. Моделювання хронічного соціального стресу шляхом соціальної ізоляції та психоемоційного впливу протягом 21 доби призводить не тільки до стійких порушень орієнтовно-дослідницької активності (зниження перетинів квадратів у центрі на 15,5 %, а на периферії — на 53,1 %, а також падіння вертикальної рухової активності до 68,7 %), психоемоційної поведінки щурів (зменшення актів грумінгу на 68,3–69,2 %, збільшення кількості дефекацій і сечовипускань у 10 разів, а завмирань — на 80,5 %), але й до дискоординації серотонінергічної трансмісії аміноспецифічної системи головного мозку — пригнічення зворотного захоплення серотоніну за рахунок дворазового зменшення експресії білка-транспортера серотоніну (Slc6a4) ( $p < 0,0001$ ).

2. ХСС порушує структурний гомеостаз тканин шкіри та адитивно пригнічує місцевий імунітет, що при загоєнні різаної рани клінічно проявлялося сповільненим закриттям рани та затримкою формування рубця (на 14-ту добу відносна площа рани становила 53,3 % проти 17,5 % у контролі), а гістологічно — зменшенням до 50 % товщини шарів епідермісу та дерми, а також васкуляризації (щільність судин знижувалася до 19,48–51,66 у полі зору проти 31,58–79,12 у контролі), що призвело до хронізації фази запалення, що сповільнило резолюцію і наступних періодів.

3. ХСС призводить до порушення гормональної регуляції центральної ГГН осі та в її регіональному аналогу в шкірі, що призводить до дисрегуляції міграції ІКК та їх рециркуляторного оновлення, особливо лейкоцитів системного регуляторного рівня – нейтрофілів, лімфоцитів, макрофагів, кількість яких знижується в репаративній ділянці шкіри більш ніж у 2 рази, що супроводжувалося і зниженням їх популяційних функцій. Динаміка змін кількості клітин у різаній рані шкіри у стресованих тварин збігалася з такою у контрольних. Так, максимальне значення нейтрофілів у 1-й день гострого періоду загоєння становило  $49,98 \pm 4,58$  при  $145,25 \pm 13,74$  у контролі ( $p \leq 0,001$ ); а максимального значення макрофаги та лімфоцити досягали на 7-й день

проліферативного періоду, при цьому макрофаги становили  $174,60 \pm 16,44$  при  $409,59 \pm 35,16$  у контролі ( $p \leq 0,001$ ), а лімфоцити  $161,52 \pm 14,73$  при  $314,89 \pm 26,99$  у контролі ( $p \leq 0,001$ ). Кількісний дефіцит ІКК виразився затримкою репараційних процесів у рані шкіри.

4. Динаміка кількості еозинофілів по стадіям дослідження була залежна від активності дегрануляції в мозаклітинний матрикс мастоцитів по 2му (частковому) і 3му (повному) типу при запальній реакції. У стресованих тварин запальна реакція, підтверджена медіатором нейрогенного запалення CGRP, мала місце в шкірі ще до нанесення рани, тому кількість мастоцитів була високою ( $9,47 \pm 0,23$  клітин на  $0,01 \text{ мм}^2$ ) з дегрануляцією за 2-м типом у позаклітинний матрикс (ПКМ). Кількість еозинофілів була також кратно високою –  $7,13 \pm 0,67$  клітин/ $\text{мм}^2$ . У рановий період збільшені мастоцити масивно дегранулювали за 2-м і 3-м типами у ПКМ увесь запальний період (1-й та 3-й дні): індекс дегрануляції складав  $72,73 \pm 1,10 \%$  та  $87,40 \pm 1,34 \%$  відповідно, і на 7-й день, як показник хронізації запалення, –  $65,22 \pm 0,93 \%$ . Кількість еозинофілів в ці дні компенсаторно становила  $4,22 \pm 0,46$  (на 1-й день);  $0,53 \pm 0,28$  (на 3-й день) та  $0,16 \pm 0,12$  (на 7-й день) клітин/ $\text{мм}^2$ , що багатократно вище, ніж на 14-й та 30-й дні ( $0,03 \pm 0,10$  та  $0,02 \pm 0,08$  клітин/ $\text{мм}^2$  відповідно), коли показник досягав контрольних значень. Цей висновок свідчить, що еозинофіли регулюють силу запалення, яку ініціюють і підтримують мастоцити за участю й інших імунокомпетентних клітин.

5. Моделювання хронічного соціального стресу призводить до зміни направленості кореляційних взаємозв'язків між ІКК системного регуляторного рівня (лімфоцити, макрофаги, нейтрофіли) і регіонарного рівня (мастоцити, еозинофіли). Виявлено стійкі позитивні кореляційні зв'язки в межах групи системного рівня, як в нормі, так і при ХСС, тоді як клітини регіонарного рівня корелювали між собою лише в умовах ХСС. Найбільший вплив на динаміку закриття ранової поверхні в умовах ХСС мали нейтрофіли.

6. Моделювання хронічного соціального стресу негативно впливає на молекулярно-клітинні механізми репаративної регенерації шкіри після

нанесення різаної рани — зниження транскрипційної активності та порушення нейрогенної регуляції (максимальна експресія Ki-67 в епідермісі знижувалася на 45,4% ; SOX2 у дермі — на 97,6%; PDGFR $\beta$  — на 85,0%; CGRP у дермі зі зниженням на 1–7 добу та аномальним підвищенням на 53,0%).

7. Моделювання хронічного соціального стресу призводить до посилення та пролонгування поза- та внутрішньоклітинного апоптозу клітин шкіри після нанесення різаної рани (підвищення експресії каспази-3 у дермі на 402,5% у контролі на тлі дефіциту антиапоптотичного фактора Bcl-2, експресія якого знижувалася на 76,6%, а також асинхронність експресії каспази-9 у дермі, яка на 1-шу добу знижувалася на 64,4%).

8. Моделювання хронічного соціального стресу призводить до депривації механізмів ендогенної цитопротекції після нанесення механічної рани (зниження експресії HIF-1 $\alpha$  у дермі до 89,4% та NRF2 у дермі на 1–7 добу в середньому на 70%; підвищення експресією p62 у волосяних фолікулах на 7–30 добу в 16-18,3 рази, на тлі зниження LC3B у дерми на 86,3%).

9. Отримані нами результати дають можливість припустити, що опосередковані хронічним соціальним стресом нейрохімічні, гормональні, імунні порушення призводять до посилення та пролонгації апоптозу, зниження транскрипційної активності, зниження експресії факторів ендогенної цитопротекції, що в кінцевому підсумку призводять до погіршення загоєння різаної рани шкіри.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Li D, Fan S, Zhao H, Song J, Li W, Xu X. Global, regional and national burden of skin and subcutaneous diseases: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021. *Int Health*. 2025;0:1-14. DOI: 10.1093/inthealth/ihaf070
2. Silverberg B. A Structured Approach to Skin and Soft Tissue Infections (SSTIs) in an Ambulatory Setting. *Clin Pract*. 2021;11(1):65-74. DOI: 10.3390/clinpract11010011
3. Sen CK. Human wound and its burden: Updated 2020 compendium of estimates. *Adv Wound Care*. 2021;10(5):281-292. DOI: 10.1089/wound.2021.0026
4. Mahdavian DB, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011;216(7):753-762. DOI: 10.1016/j.imbio.2011.01.001
5. Peate I. The skin: largest organ of the body. *Br J Healthc Assist*. 2021;15(9):446-451. DOI: 10.12968/bjha.2021.15.9.446
6. Baker P, et al. Skin barrier function: the interplay of physical, chemical, and immunologic properties. *Cells*. 2023;12(23):2745. DOI: 10.3390/cells12232745
7. Zhou S, et al. New insights into balancing wound healing and scarless skin repair. *J Tissue Eng*. 2023;14:20417314231185848. DOI: 10.1177/20417314231185848
8. Peña OA, Martin P. Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2024;25(8):599-616. DOI: 10.1038/s41580-024-00715-1
9. Yampolsky M, Bachelet I, Fuchs Y. Reproducible strategy for excisional skin-wound-healing studies in mice. *Nat Protoc*. 2024;19(1):184-206. DOI: 10.1038/s41596-023-00917-w
10. Sorg H, Sorg CGG. Skin wound healing: of players, patterns, and processes. *Eur Surg Res*. 2023;64(2):141-157. DOI: 10.1159/000528682

11. Cioce A, et al. Role of the skin immune system in wound healing. *Cells*. 2024;13(7):624. DOI: 10.3390/cells13070624
12. Lux CN. Wound healing in animals: a review of physiology and clinical evaluation. *Vet Dermatol*. 2022;33(1):91-e27. DOI: 10.1111/vde.13032
13. Fernández-Guarino M, Hernández-Bule ML, Bacci S. Cellular and molecular processes in wound healing. *Biomedicines*. 2023;11(9):2526. DOI: 10.3390/biomedicines11092526
14. Maheshwari G. Chronic wounds: a rising public health concern. *Wounds APAC*. 2024;7(1):6-11.
15. Atkin L, Probst S. Clinical inertia in chronic wound care. *Wounds Int*. 2025;16(1):48-51.
16. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010;89(3):219-229. DOI: 10.1177/0022034509359125
17. Stress levels rise around the world [Internet]. Available from: <https://winmr.com/stress-levels-rise-around-the-world/>
18. Ipsos World Mental Health Day Report [Internet]. Available from: <https://www.ipsos.com/en/ipsos-world-mental-health-day-report>
19. Динаміка сприйняття рівня стресу українцями [Електронний ресурс]. Київський міжнародний інститут соціології. Режим доступу: <https://www.kiis.com.ua/?lang=ukr&cat=reports&id=1472&page=1>
20. Christian LM, et al. Stress and wound healing. *Neuroimmunomodulation*. 2007;13(5-6):337-346. DOI: 10.1159/000104862
21. Basu S, et al. Psychological stress on wound healing: a silent player in a complex background. *Int J Low Extrem Wounds*. 2024;23(3):365-371. DOI: 10.1177/15347346231154449
22. Summer M, et al. Revealing the molecular mechanisms in wound healing and the effects of different physiological factors including diabetes, age, and stress. *J Mol Histol*. 2024;55(5):637-654. DOI: 10.1007/s10735-024-10214-7
23. Glaser R, Kiecolt-Glaser J. How stress damages immune system and health. *Discov Med*. 2005;5(26):165-169.

24. Ojeh N, Pastar I, Tomic-Canic M, Stojadinovic O. Stem Cells in Skin Regeneration, Wound Healing, and Their Clinical Applications. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):25476-25501. DOI: 10.3390/ijms161025476
25. Yang R, et al. Epidermal stem cells in wound healing and their clinical applications. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):229. DOI: 10.1186/s13287-019-1312-z
26. Xue M, Zhao R, March L, Jackson C. Dermal Fibroblast Heterogeneity and Its Contribution to the Skin Repair and Regeneration. *Adv Wound Care.* 2022;11(2):87-107. DOI: 10.1089/wound.2020.1287
27. Dulmovits BM, Herman IM. Microvascular remodeling and wound healing: a role for pericytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(11):1800-1812. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.06.031
28. Doolin MT, Smith IM, Stroka KM. Fibroblast to myofibroblast transition is enhanced by increased cell density. *Mol Biol Cell.* 2021;32(22):ar41. DOI: 10.1091/mbc.E20-08-0536
29. Chandra P, et al. An Overview and Review of Growth Factors in Wound Healing: Emerging Trends and Innovations. *Curr Diabetes Rev.* 2025. DOI: 10.2174/0115733998332692241202072249
30. Дронько ЛМ, Беспалова ОЯ, Луценко ТМ. та ін. Перспективи застосування епідермального фактору росту в регенеративній медицині та біоінженерії. *Biomed Eng Technol.* 2023;12(4):1-11. DOI: 10.20535/2617-8974.2023.12.293373
31. Wang Z, Wang Y, Farhangfar F, Zimmer M, Zhang Y. Enhanced keratinocyte proliferation and migration in co-culture with fibroblasts. *PLoS ONE.* 2012;7(7):e40951. DOI: 10.1371/journal.pone.0040951
32. Smith J, Rai V. Novel Factors Regulating Proliferation, Migration, and Differentiation of Fibroblasts, Keratinocytes, and Vascular Smooth Muscle Cells during Wound Healing. *Biomedicines.* 2024;12(9):1939. DOI: 10.3390/biomedicines12091939

33. Taghdi MH, et al. Exploring Synergistic Effects of Bioprinted Extracellular Vesicles for Skin Regeneration. *Biomedicines*. 2024;12(7):1605. DOI: 10.3390/biomedicines12071605
34. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: An overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7S):1e-32e. DOI: 10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9
35. Gonzalez AC, Costa TF, Andrade ZA, Medrado AR. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol*. 2016;91(5):614-620. DOI: 10.1590/abd1806-4841.20164741
36. Theoharides TC. The impact of psychological stress on mast cells. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2020;125:388-392. DOI: 10.1016/j.anai.2020.07.007
37. Rippon MG, et al. The importance of periwound skin in wound healing: An overview of the evidence. *J Wound Care*. 2022;31(8):648. DOI: 10.12968/jowc.2022.31.8.648
38. Zavgorodniaia MI, Makeieva LV, Slavcheva OS, Sulaieva ON. Cellular and molecular basics of the wound healing. *Morphologia*. 2016;10(3):19-23.
39. Opneja A, Kapoor S, Stavrou EX. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. *Thromb Res*. 2019;179:56-63. DOI: 10.1016/j.thromres.2019.05.001
40. Hosgood G. Wound healing. The role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Vet Surg*. 1993;22(6):490-495. DOI: 10.1111/j.1532-950x.1993.tb00426.x
41. Irma J, et al. From Growth Factors to Structure: PDGF and TGF-beta in Granulation Tissue Formation. A Literature Review. *J Cell Mol Med*. 2025;29(11):e70374. DOI: 10.1111/jcmm.70374
42. Eom YW, et al. TGF-beta expressed by M2 macrophages promotes wound healing by inhibiting TSG-6 expression by mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*. 2025;20(4):e0316692. DOI: 10.1371/journal.pone.0316692

43. Jia J. Stimuli-responsive hydrogels based on cascade reactions: A novel strategy to promote the efficient repair of diabetic wounds. *Int J Nanomedicine*. 2025;20:1-20. DOI: 10.2147/IJN.S491234
44. Mascharak S, Griffin M. From growth factors to structure: PDGF and TGF-beta in granulation tissue formation. *J Tissue Eng*. 2025;16. DOI: 10.1177/20417314251215237
45. Miyawaki A, Oteiza A. Pericyte-mediated regulation of angiogenesis during cutaneous wound healing in adult zebrafish. *Nat Commun*. 2025;16(1):1229. DOI: 10.1038/s41467-025-56297-4
46. Wilkinson HN, Hardman MJ. Cellular and molecular mechanisms of wound repair: From biology to therapeutic innovation. *Cells*. 2025;14(23):1850. DOI: 10.3390/cells14231850
47. Chen L, DiPietro LA. Toll-Like Receptor Function in Acute Wounds. *Adv Wound Care*. 2017;6(10):344-355. DOI: 10.1089/wound.2017.0734
48. Chen R, et al. Pattern recognition receptors: function, regulation and therapeutic potential. *Signal Transduct Target Ther*. 2025;10(1):216. DOI: 10.1038/s41392-025-02264-1
49. Reno F, et al. Neutrophil Heterogeneity in Wound Healing. *Biomedicines*. 2025;13(3):694. DOI: 10.3390/biomedicines13030694
50. Yang L, et al. Neutrophils in Tissue Injury and Repair: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *MedComm*. 2025;6(5):e70184. DOI: 10.1002/mco2.70184
51. Liu Y, et al. Neutrophil heterogeneity and aging: implications for COVID-19 and wound healing. *Front Immunol*. 2023;14:1201651. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1201651
52. Mamun AA, et al. Recent advances in molecular mechanisms of skin wound healing and its treatments. *Front Immunol*. 2024;15:1395479. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1395479

53. Левчук НІ, Ковзун ОІ, Тронько МД. Участь основних типів клітин у процесі загоєння гострих ран шкіри. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2025;25(3):316-324. DOI: 10.31718/2077-1096.25.3.316
54. Brain SD. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology*. 1997;37(2-3):133-152. DOI: 10.1016/s0162-3109(97)00055-6
55. Blais M, et al. Sensory neurons accelerate skin reepithelialization via substance P in an innervated tissue-engineered wound healing model. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(15-16):2180-2188. DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0535
56. Shi X, Wang L, Clark JD, Kingery WS. Keratinocytes express cytokines and nerve growth factor in response to neuropeptide activation of the ERK1/2 and JNK MAPK transcription pathways. *Regul Pept*. 2013;186:92-103. DOI: 10.1016/j.regpep.2013.08.001
57. Pepin R, et al. Sensory neurons increase keratinocyte proliferation through CGRP release in a tissue engineered in vitro model of innervation in psoriasis. *Acta Biomater*. 2024;182:1-13. DOI: 10.1016/j.actbio.2024.05.021
58. Shi X, et al. Neuropeptides contribute to peripheral nociceptive sensitization by regulating interleukin-1beta production in keratinocytes. *Anesth Analg*. 2011;113(1):175-183. DOI: 10.1213/ANE.0b013e31821a0258
59. Ashcroft GS, et al. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest*. 2003;111(9):1309-1318. DOI: 10.1172/JCI16288
60. Lai JJ, et al. Monocyte/macrophage androgen receptor suppresses cutaneous wound healing in mice by enhancing local TNF-alpha expression. *J Clin Invest*. 2009;119(12):3739-3751. DOI: 10.1172/JCI39335
61. Coma M, et al. Molecular Changes Underlying Genistein Treatment of Wound Healing: A Review. *Curr Issues Mol Biol*. 2021;43(1):127-141. DOI: 10.3390/cimb43010011

62. Jin C, et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Wound Repair: From Biology to Therapeutic Innovation. *Cells*. 2025;14(23):1850. DOI: 10.3390/cells14231850
63. Qiang L, et al. Keratinocyte autophagy enables the activation of keratinocytes and fibroblasts and facilitates wound healing. *Autophagy*. 2021;17(9):2128-2143. DOI: 10.1080/15548627.2020.1816342
64. Pastar I, et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care*. 2014;3(7):445-464. DOI: 10.1089/wound.2013.0473
65. Seeger MA, Paller AS. The Roles of Growth Factors in Keratinocyte Migration. *Adv Wound Care*. 2015;4(4):213-224. DOI: 10.1089/wound.2014.0540
66. Bodnar RJ. Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor: The Yin and Yang in the Treatment of Cutaneous Wounds and Cancer. *Adv Wound Care*. 2013;2(1):24-29. DOI: 10.1089/wound.2011.0326
67. Darby IA, et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014;7:301-311. DOI: 10.2147/CCID.S50046
68. Gharbia FZ, et al. Adult skin fibroblast state change in murine wound healing. *Sci Rep*. 2023;13:886. DOI: 10.1038/s41598-022-27152-4
69. Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech*. 2003;60(1):107-114. DOI: 10.1002/jemt.10249
70. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv Wound Care*. 2014;3(10):647-661. DOI: 10.1089/wound.2013.0517
71. Qin X, et al. Controlled platelet-derived growth factor delivery by hyaluronic acid hydrogels with tunable crosslinking for accelerated chronic wound healing. *Int J Biol Macromol*. 2025;304(Pt 1):140710. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2025.140710
72. Leroux A, et al. The effect of CGRP and SP and the cell signaling dialogue between sensory neurons and endothelial cells. *Biol Res*. 2024;57(1):65. DOI: 10.1186/s40659-024-00538-6

73. Yari A, et al. Hair follicle stem cells promote cutaneous wound healing through the SDF-1alpha/CXCR4 axis: An animal model. *J Wound Care*. 2020;29(9):526-536. DOI: 10.12968/jowc.2020.29.9.526
74. Paramasivam T, et al. Effect of PDGF-B gene-activated acellular matrix and mesenchymal stem cell transplantation on full thickness skin burn wound in rat model. *Tissue Eng Regen Med*. 2021;18(2):235-251. DOI: 10.1007/s13770-020-00305-6
75. Razban V, et al. HIF-1alpha overexpression induces angiogenesis in mesenchymal stem cells. *Biores Open Access*. 2012;1(4):174-183. DOI: 10.1089/biores.2012.0227
76. Uchiyama A, et al. SOX2 Epidermal Overexpression Promotes Cutaneous Wound Healing via Activation of EGFR/MEK/ERK Signaling Mediated by EGFR Ligands. *J Invest Dermatol*. 2019;139(8):1809-1820.e8. DOI: 10.1016/j.jid.2019.02.004
77. Shi Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells facilitate diabetic wound healing through the restoration of epidermal cell autophagy via the HIF-1alpha/TGF-beta1/SMAD pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):314. DOI: 10.1186/s13287-022-02996-9
78. Chen L, et al. Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. *PLoS ONE*. 2008;3(4):e1886. DOI: 10.1371/journal.pone.0001886
79. Diller RB, Tabor AJ. The Role of the Extracellular Matrix (ECM) in Wound Healing: A Review. *Biomimetics*. 2022;7(3):87. DOI: 10.3390/biomimetics7030087
80. Lin P, Zhang G, Li H. The Role of Extracellular Matrix in Wound Healing. *Dermatol Surg*. 2023;49(5S):S41-S48. DOI: 10.1097/DSS.0000000000003779
81. Thapa RK, et al. Enhanced wound healing via collagen-turnover-driven transfer of PDGF-BB gene in a murine wound model. *ACS Appl Bio Mater*. 2020;3(6):3500-3517. DOI: 10.1021/acsbm.9b01147

82. Rohani MG, Parks WC. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biol.* 2015;44-46:113-121. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.03.002
83. Xu Y, et al. Autophagic degradation of SQSTM1 enables fibroblast activation to accelerate wound healing. *Autophagy.* 2025;21(11):2401-2421. DOI: 10.1080/15548627.2025.2508546
84. Moreno-Blas D, Adell T, González-Estévez C. Autophagy in Tissue Repair and Regeneration. *Cells.* 2025;14(4):282. DOI: 10.3390/cells14040282
85. Zhang G, et al. The mechanisms related to fibroblasts in burn surface. *Skin Res Technol.* 2023;29(8):e13431. DOI: 10.1111/srt.13431
86. Zhou Y, et al. The neuro-cutaneous axis: the role of nerve cells in wound healing. *Biochem Biophys Res Commun.* 2025;793:153038. DOI: 10.1016/j.bbrc.2025.153038
87. Kumar S, Tan Y, Berthiaume F. Neuropeptide Substance P Enhances Skin Wound Healing In Vitro and In Vivo under Hypoxia. *Biomedicines.* 2021;9(2):222. DOI: 10.3390/biomedicines9020222
88. Li Z, et al. Hormonal interventions in skin wounds - a mini review. *Mol Med.* 2024;30(1):217. DOI: 10.1186/s10020-024-00978-6
89. Berthiaume Fox KA, et al. Decoding wound healing: cellular insights and technological advances. *npj Biomed Innov.* 2026;3:1. DOI: 10.1038/s44385-025-00046-6
90. Vallée A, Lecarpentier Y. TGF-beta in fibrosis by acting as a conductor for contractile properties of myofibroblasts. *Cell Biosci.* 2019;9:98. DOI: 10.1186/s13578-019-0362-3
91. Cialdai F, Risaliti C, Monici M. Role of fibroblasts in wound healing and tissue remodeling on Earth and in space. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:958381. DOI: 10.3389/fbioe.2022.958381
92. desJardins-Park HE, Foster DS, Longaker MT. Fibroblasts and Wound Healing: an Update. *Regen Med.* 2018;13(5):491-495. DOI: 10.2217/rme-2018-0073

93. Agramunt J, Kang Y, Rinkevich Y. Spatiotemporal dynamics of mammalian wound healing. *Cell Discov.* 2026;12:4. DOI: 10.1038/s41421-025-00865-2
94. Anitua E, Troya M, Alkhraisat MH. Beyond Killing: The Overlooked Contribution of Neutrophils to Tissue Repair. *Int J Mol Sci.* 2025;26(17):8669. DOI: 10.3390/ijms26178669
95. Rizo-Téllez SA, Filep JG. Beyond host defense and tissue injury: the emerging role of neutrophils in tissue repair. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2024;326(3):C661-C683. DOI: 10.1152/ajpcell.00652.2023
96. Wang J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res.* 2018;371(3):531-539. DOI: 10.1007/s00441-017-2785-7
97. Kumar R. Emerging Role of Neutrophils in Wound Healing and Tissue Repair: The Routes of Healing. *Biomed J Sci Tech Res.* 2021;36(4):28687-28688. DOI: 10.26717/BJSTR.2021.36.005872
98. Zhu Z, et al. Neutrophil extracellular traps in wound healing. *Trends Pharmacol Sci.* 2024;45(11):1033-1045. DOI: 10.1016/j.tips.2024.09.007
99. Brazil JC, et al. Innate immune cell-epithelial crosstalk during wound repair. *J Clin Invest.* 2019;129(8):2983-2993. DOI: 10.1172/JCI124618
100. Shahzad A, et al. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in health and disease. *Mol Biomed.* 2025;6(1):130. DOI: 10.1186/s43556-025-00337-9
101. Krzyszczyk P, et al. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Front Physiol.* 2018;9:419. DOI: 10.3389/fphys.2018.00419
102. Hesketh M, et al. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1545. DOI: 10.3390/ijms18071545
103. Willenborg S, Injarabian L, Eming SA. Role of Macrophages in Wound Healing. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022;14(12):a041216. DOI: 10.1101/cshperspect.a041216
104. Hassanshahi A, et al. Macrophage-Mediated Inflammation in Skin Wound Healing. *Cells.* 2022;11(19):2953. DOI: 10.3390/cells11192953

105. Sim SL, et al. Macrophages in Skin Wounds: Functions and Therapeutic Potential. *Biomolecules*. 2022;12(11):1659. DOI: 10.3390/biom12111659
106. Bacci S. Fine Regulation during Wound Healing by Mast Cells, a Physiological Role Not Yet Clarified. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1820. DOI: 10.3390/ijms23031820
107. Komi DEA, Khomtchouk K, Santa Maria PL. A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020;58(3):298-312. DOI: 10.1007/s12016-019-08729-w
108. Ng MF. The role of mast cells in wound healing. *Int Wound J*. 2010;7(1):55-61. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2009.00651.x
109. Guth C, Limjunyawong N, Pundir P. The evolving role of mast cells in wound healing: insights from recent research and diverse models. *Immunol Cell Biol*. 2024;102(9):878-890. DOI: 10.1111/imcb.12824
110. Egozi EI, et al. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. *Wound Repair Regen*. 2003;11(1):46-54. DOI: 10.1046/j.1524-475x.2003.11108.x
111. Sousa P, et al. Advancements and Insights in Exosome-Based Therapies for Wound Healing: A Comprehensive Systematic Review (2018-June 2023). *Biomedicines*. 2023;11(8):2099. DOI: 10.3390/biomedicines11082099
112. Raziyeva K, et al. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules*. 2021;11(5):700. DOI: 10.3390/biom11050700
113. Tontini C, et al. Microenvironment-Driven Mast Cell Plasticity: Insights From Cytokine-Activated Gene Signatures in Skin and Respiratory Diseases. *Allergy*. 2025;80(11):3077-3094. DOI: 10.1111/all.70052
114. Wang Z, et al. Inflammatory Microenvironment of Skin Wounds. *Front Immunol*. 2022;13:789274. DOI: 10.3389/fimmu.2022.789274
115. Wang X, et al. T Lymphocytes Attenuate Dermal Scarring by Regulating Inflammation, Neovascularization, and Extracellular Matrix Remodeling. *Adv Wound Care*. 2019;8(11):527-537. DOI: 10.1089/wound.2019.0981

116. Sirbulescu RF, Boehm CK, Soon E, et al. Mature B cells accelerate wound healing after acute and chronic diabetic skin lesions. *Wound Repair Regen.* 2017;25(5):774-791. DOI: 10.1111/wrr.12584
117. Mochel K, Bronte J, Kasaba M, et al. The Impact of Psychological Stress on Wound Healing: Implications for Neocollagenesis and Scar Treatment Efficacy. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2025;18:1625-1637. DOI: 10.2147/CCID.S528730
118. Gouin JP, Kiecolt-Glaser JK. The impact of psychological stress on wound healing: methods and mechanisms. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2011;31(1):81-93. DOI: 10.1016/j.iac.2010.09.010
119. Romana-Souza B, Otranto M, Vieira AM, et al. Rotational stress-induced increase in epinephrine levels delays cutaneous wound healing in mice. *Brain Behav Immun.* 2010;24(3):427-437. DOI: 10.1016/j.bbi.2009.11.012
120. Pondeljnak N, Lugovic-Mihic L. Stress-induced Interaction of Skin Immune Cells, Hormones, and Neurotransmitters. *Clin Ther.* 2020;42(5):757-770. DOI: 10.1016/j.clinthera.2020.03.008
121. Nunez SG, Rabelo SP, Subotic N, et al. Chronic Stress and Autoimmunity: The Role of HPA Axis and Cortisol Dysregulation. *Int J Mol Sci.* 2025;26(20):9994. DOI: 10.3390/ijms26209994
122. Dhabhar FS. Psychological stress and immunoprotection versus immunopathology in the skin. *Clin Dermatol.* 2013;31(1):18-30. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2011.11.003
123. Shastri M, Sharma M, Sharma K, et al. Cutaneous-immuno-neuro-endocrine (CINE) system: A complex enterprise transforming skin into a super organ. *Exp Dermatol.* 2024;33(3):e15029. DOI: 10.1111/exd.15029
124. Chéret J, Lebonvallet N, Carré JL, et al. Role of neuropeptides, neurotrophins, and neurohormones in skin wound healing. *Wound Repair Regen.* 2014;22(4):460-471. DOI: 10.1111/wrr.12101
125. Oskeritzian CA. Mast Cells and Wound Healing. *Adv Wound Care.* 2012;1(1):23-28. DOI: 10.1089/wound.2011.0357

126. Wulff BC, Wilgus TA. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? *Exp Dermatol*. 2013;22(8):507-510. DOI: 10.1111/exd.12169
127. Caruntu C, Boda D, Musat S, et al. Stress-induced mast cell activation in glabrous and hairy skin. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:105950. DOI: 10.1155/2014/105950
128. Noli C, Miolo A. The mast cell in wound healing. *Vet Dermatol*. 2001;12(6):303-313. DOI: 10.1046/j.0959-4493.2001.00272.x
129. Iba Y, Shibata A, Kato M, Masukawa T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *Int Immunopharmacol*. 2004;4(14):1873-1880. DOI: 10.1016/j.intimp.2004.08.009
130. Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv Wound Care*. 2013;2(7):379-388. DOI: 10.1089/wound.2012.0383
131. Piipponen M, Li D, Landén NX. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8790. DOI: 10.3390/ijms21228790
132. Padgett DA, Marucha PT, Sheridan JF. Restraint stress slows cutaneous wound healing in mice. *Brain Behav Immun*. 1998;12(1):64-73. DOI: 10.1006/brbi.1997.0512
133. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-969. DOI: 10.1038/nri2448
134. Greenlee-Wacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev*. 2016;273(1):357-370. DOI: 10.1111/imr.12453
135. Yu T, Gao M, Yang P, et al. Insulin promotes macrophage phenotype transition through PI3K/Akt and PPAR-gamma signaling during diabetic wound healing. *J Cell Physiol*. 2019;234(4):4217-4231. DOI: 10.1002/jcp.27185
136. Larouche J, Sheoran S, Maruyama K, Martino MM. Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Adv Wound Care*. 2018;7(7):209-231. DOI: 10.1089/wound.2017.0761

137. Knoedler S, Knoedler L, Kauke-Navarro M, et al. Regulatory T cells in skin regeneration and wound healing. *Mil Med Res.* 2023;10(1):49. DOI: 10.1186/s40779-023-00484-6
138. Webster Marketon JJ, Glaser R. Stress hormones and immune function. *Cell Immunol.* 2008;252(1-2):16-26. DOI: 10.1016/j.cellimm.2007.09.006
139. Xiao M, Li L, Li C, et al. Role of autophagy and apoptosis in wound tissue of deep second-degree burn in rats. *Acad Emerg Med.* 2014;21(4):383-391. DOI: 10.1111/acem.12352
140. Mijaljica D, Spada F, Klionsky DJ, Harrison IP. Autophagy is the key to making chronic wounds acute in skin wound healing. *Autophagy.* 2023;19(9):2578-2584. DOI: 10.1080/15548627.2023.2194155
141. Ren H, Zhao F, Zhang Q, et al. Autophagy and skin wound healing. *Burns Trauma.* 2022;10:tkac003. DOI: 10.1093/burnst/tkac003
142. Qiang L, Yang S, Cui YH, He YY. Keratinocyte autophagy enables the activation of keratinocytes and fibroblasts and facilitates wound healing. *Autophagy.* 2021;17(9):2128-2143. DOI: 10.1080/15548627.2020.1816342
143. Wang F, Zhang C, Dai L, et al. Bafilomycin A1 Accelerates Chronic Refractory Wound Healing in db/db Mice. *Biomed Res Int.* 2020;2020:6265701. DOI: 10.1155/2020/6265701
144. Rygula R, Abumaria N, Flügge G, et al. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res.* 2005;162(1):127-134. DOI: 10.1016/j.bbr.2005.03.009
145. Golden SA, Covington HE 3rd, Berton O, Russo SJ. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc.* 2011;6(8):1183-1191. DOI: 10.1038/nprot.2011.361
146. Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A. Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1997;640:69-72.
147. Tornatzky W, Miczek KA. Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. *Physiol Behav.* 1993;53(5):983-993. DOI: 10.1016/0031-9384(93)90278-N

148. Masis-Calvo M, Schmidtner AK, de Moura Oliveira VE, et al. Animal models of social stress: the dark side of social interactions. *Stress*. 2018;21(5):417-432. DOI: 10.1080/10253890.2018.1462327
149. Koert A, Ploeger A, Bockting CLH, et al. The social instability stress paradigm in rat and mouse: a systematic review of protocols, limitations, and recommendations. *Neurobiol Stress*. 2021;15:100410. DOI: 10.1016/j.ynstr.2021.100410
150. Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol Behav*. 2001;73(3):261-271. DOI: 10.1016/s0031-9384(01)00449-8
151. Babygirija R, Yoshimoto S, Gribovskaja-Rupp I, et al. Social interaction attenuates stress responses following chronic stress in maternally separated rats. *Brain Res*. 2012;1469:54-62. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.06.007
152. Dorsett-Martin WA. Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Repair Regen*. 2004;12(6):591-599. DOI: 10.1111/j.1067-1927.2004.12601.x
153. Estevão LR de M, Cassini-Vieira P, Leite AGB, Bulhões AAV de C, Barcelos L da S, Evêncio-Neto J. Morphological evaluation of wound healing events in the excisional wound healing model in rats. *Bio-protocol*. 2019;9(13):e3285. doi:10.21769/BioProtoc.3285.
154. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991;324(1):1-8. DOI: 10.1056/NEJM199101033240101
155. Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: What is the relationship? *Arq Bras Cir Dig*. 2012;25(1):49-51. DOI: 10.1590/S0102-67202012000100011
156. Ben-Ami Bartal I, Rodgers DA, Bernardez Sarria MS, et al. Pro-social behavior in rats is modulated by social experience. *eLife*. 2014;3:e01385. DOI: 10.7554/eLife.01385
157. Parker GA, Picut CA. *Atlas of Histology of the Juvenile Rat*. Chennai: Elsevier Academic Press; 2016. 462 p. DOI: 10.1016/C2014-0-03225-8

158. Nakano Y. Stress-induced modulation of skin immune function: Two types of antigen-presenting cells in the epidermis are differentially regulated by chronic stress. *Br J Dermatol.* 2004;151(1):50-64. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2004.05980.x
159. Vileikyte L. Stress and wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25(1):49-55. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2006.09.005
160. Herman JP, Figueiredo HF, Mueller NK, et al. Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.* 2003;24(3):151-180. DOI: 10.1016/j.yfrne.2003.07.001
161. Sandig H, McDonald J, Gilmour J, et al. Fibronectin is a TH1-specific molecule in human subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(3):528-535. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.04.036
162. Dhabhar FS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:876-893. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05454.x
163. Passeron T, Zouboulis CC, Tan J, et al. Adult skin acute stress responses to short-term environmental and internal aggression from exposome factors. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2021;35(10):1963-1975. DOI: 10.1111/jdv.17432
164. Chapman CR, Tuckett RP, Song CW. Pain and stress in a systems perspective: Reciprocal neural, endocrine, and immune interactions. *J Pain.* 2008;9(2):122-145. DOI: 10.1016/j.jpain.2007.09.006
165. Picard K, St-Pierre MK, Vecchiarelli HA, et al. Neuroendocrine, neuroinflammatory, and pathological outcomes of chronic stress: A story of microglial remodeling. *Neurochem Int.* 2021;145:104987. DOI: 10.1016/j.neuint.2021.104987
166. Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med.* 2013;4(6):624-630. DOI: 10.4103/2008-7802.117402
167. Pereira VH, Campos I, Sousa N. The role of autonomic nervous system in susceptibility and resilience to stress. *Curr Opin Behav Sci.* 2017;14:102-107. DOI: 10.1016/j.cobeha.2017.01.003

168. Kyrou I, Tsigos C. Stress mechanisms and metabolic complications. *Horm Metab Res.* 2007;39(6):430-438. DOI: 10.1055/s-2007-981462
169. de Almeida TF, de Castro Pires T, Monte-Alto-Costa A. Blockade of glucocorticoid receptors improves cutaneous wound healing in stressed mice. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016;241(4):353-358. DOI: 10.1177/1535370215612940
170. Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. Cutaneous wound healing: Recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70:2059-2081. DOI: 10.1007/s00018-012-1152-9
171. Jiang D, Scharffetter-Kochanek K. Mesenchymal stem cells adaptively respond to environmental cues thereby improving granulation tissue formation and wound healing. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:697. DOI: 10.3389/fcell.2020.00697
172. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2000;5(1):40-46. DOI: 10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x
173. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35-43. DOI: 10.1159/000339613
174. Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, et al. Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(49):19426-19431. DOI: 10.1073/pnas.0805230105
175. Lin H, Lin R, Hou J, et al. Targeting endothelial PDGFR-beta facilitates angiogenesis-associated bone formation through the PAK1/NICD axis. *J Cell Physiol.* 2024;239(3):e31291. DOI: 10.1002/jcp.31291
176. Shim HB, Deniset JF, Kubes P. Neutrophils in homeostasis and tissue repair. *Int Immunol.* 2022;34(8):399-407. DOI: 10.1093/intimm/dxac029
177. Su Y, Richmond A. Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of Skin Wounds. *Adv Wound Care.* 2015;4(11):631-640. DOI: 10.1089/wound.2014.0559
178. Casanova-Acebes M, Nicolás-Ávila JA, Li JL, et al. Neutrophils instruct homeostatic and pathological states in naive tissues. *J Exp Med.* 2018;215(11):2778-2795. DOI: 10.1084/jem.20181468

179. Shafqat A, Khan JA, Alkachem AY, et al. How Neutrophils Shape the Immune Response: Reassessing Their Multifaceted Role in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2023;24(24):17583. DOI: 10.3390/ijms242417583
180. Delwatta SL, Gunatilake M, Baumans V, et al. Reference values for selected hematological, biochemical and physiological parameters of Sprague-Dawley rats at the Animal House, Faculty of Medicine, University of Colombo, Sri Lanka. *Anim Models Exp Med.* 2018;1(4):250-254. DOI: 10.1002/ame2.12041
181. Ge Y, Huang M, Yao YM. Efferocytosis and Its Role in Inflammatory Disorders. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:839248. DOI: 10.3389/fcell.2022.839248
182. Ellis S, Lin EJ, Tartar D. Immunology of Wound Healing. *Curr Dermatol Rep.* 2018;7(4):350-358. DOI: 10.1007/s13671-018-0234-9
183. Li H, Xu L, Chen J, et al. Neutrophil Extracellular Trap Formation Suppressed by Ro 106-9920 Enhances Diabetic Wound Healing by Blocking NLRP3 Inflammasome Activation. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2025;30(5):37393. DOI: 10.31083/FBL37393
184. Jones HR, Robb CT, Perretti M, et al. The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin Immunol.* 2016;28(2):137-145. DOI: 10.1016/j.smim.2016.03.007
185. Sousa AB, Barbosa JN. The Role of Neutrophils in Biomaterial-Based Tissue Repair—Shifting Paradigms. *J Funct Biomater.* 2023;14(6):327. DOI: 10.3390/jfb14060327
186. Bobok N, Taskesen T. Stress-Induced Changes of the Skin: A Narrative Review. *Cureus.* 2025;17(11):e96285. DOI: 10.7759/cureus.96285
187. Pujos M, Chamayou-Robert C, Parat M, et al. Impact of Chronic Moderate Psychological Stress on Skin Aging: Exploratory Clinical Study and Cellular Functioning. *J Cosmet Dermatol.* 2025;24(1):e16634. DOI: 10.1111/jocd.16634
188. Ma M, Jiang W, Zhou R. DAMPs and DAMP-sensing receptors in inflammation and diseases. *Immunity.* 2024;57(4):752-771. DOI: 10.1016/j.immuni.2024.03.002

189. Elenkov IJ. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1024:138-146. DOI: 10.1196/annals.1321.010
190. Feng X, Jia M, Cai M, et al. Central-peripheral neuroimmune dynamics in psychological stress and depression: insights from current research. *Mol Psychiatry.* 2025;30:4881-4898. DOI: 10.1038/s41380-025-03085-y
191. Reed RG. Stress and Immunological Aging. *Curr Opin Behav Sci.* 2019;28:38-43. DOI: 10.1016/j.cobeha.2019.01.012
192. Zhang M, Cui J, Chen H, et al. Increased SOAT2 expression in aged regulatory T cells is associated with altered cholesterol metabolism and reduced anti-tumor immunity. *Nat Commun.* 2025;16:630. DOI: 10.1038/s41467-025-56002-w
193. Gandolfi S, Sanouj A, Chaput B, et al. The role of adipose tissue-derived stromal cells, macrophages and bioscaffolds in cutaneous wound repair. *Biol Direct.* 2024;19:85. DOI: 10.1186/s13062-024-00534-6
194. Mihaila AC, Ciortan L, Tucureanu MM, et al. Anti-Inflammatory Neutrophils Reprogram Macrophages toward a Pro-Healing Phenotype with Increased Efferocytosis Capacity. *Cells.* 2024;13(3):208. DOI: 10.3390/cells13030208
195. Hoeffel G, Ginhoux F. Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Front Immunol.* 2015;6:486. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00486
196. Haldar M, Murphy KM. Origin, development, and homeostasis of tissue-resident macrophages. *Immunol Rev.* 2014;262(1):25-35. DOI: 10.1111/imr.12215
197. Honold L, Nahrendorf M. Resident and Monocyte-Derived Macrophages in Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2018;122(1):113-127. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311071
198. Wermuth PJ, Jimenez SA. The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases. *Clin Trans Med.* 2015;4:2. DOI: 10.1186/s40169-015-0047-4
199. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol.* 2014;5:514. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00514

200. Guan F, Wang R, Yi Z, et al. Tissue macrophages: origin, heterogeneity, biological functions, diseases and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2025;10(1):93. DOI: 10.1038/s41392-025-02124-y
201. Rasheed A, Rayner KJ. Macrophage Responses to Environmental Stimuli During Homeostasis and Disease. *Endocr Rev.* 2021;42(4):407-435. DOI: 10.1210/endrev/bnab004
202. Ji Y, Li X, Yao X, et al. Macrophage polarization: molecular mechanisms, disease implications, and targeted therapeutic strategies. *Front Immunol.* 2025;16:1732718. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1732718
203. Lendeckel U, Venz S, Wolke C. Macrophages: shapes and functions. *ChemTexts.* 2022;8:12. DOI: 10.1007/s40828-022-00163-4
204. Guillaume J, Leufgen A, Hager FT, et al. MHCII expression on gut macrophages supports T cell homeostasis and is regulated by microbiota and ontogeny. *Sci Rep.* 2023;13:1509. DOI: 10.1038/s41598-023-28554-8
205. Joorabloo A, Liu T. Recent advances in nanomedicines for regulation of macrophages in wound healing. *J Nanobiotechnol.* 2022;20:407. DOI: 10.1186/s12951-022-01616-1
206. Yu Y, Yue Z, Xu M, et al. Macrophages play a key role in tissue repair and regeneration. *PeerJ.* 2022;10:e14053. DOI: 10.7717/peerj.14053
207. Urakami H, Yoshikawa S, Nagao K, et al. Stress-experienced monocytes/macrophages lose anti-inflammatory function via beta2-adrenergic receptor in skin allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2025;155(3):865-879. DOI: 10.1016/j.jaci.2024.10.038
208. Momcilovic S, Milosevic M, Kocovic DM, et al. Macrophages at the Crossroads of Chronic Stress and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2025;26(14):6838. DOI: 10.3390/ijms26146838
209. Mirza R, DiPietro LA, Koh TJ. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *Am J Pathol.* 2009;175(6):2454-2462. DOI: 10.2353/ajpath.2009.090248

210. Clayton SM, Shafikhani SH, Soulika AM. Macrophage and Neutrophil Dysfunction in Diabetic Wounds. *Adv Wound Care*. 2024;13(9):463-484. DOI: 10.1089/wound.2023.0149
211. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med*. 2011;13:e23. DOI: 10.1017/S1462399411001943
212. Al Sadoun H. Macrophage Phenotypes in Normal and Diabetic Wound Healing and Therapeutic Interventions. *Cells*. 2022;11(15):2430. DOI: 10.3390/cells11152430
213. Lin CW, Hung CM, Chen WJ, et al. New Horizons of Macrophage Immunomodulation in the Healing of Diabetic Foot Ulcers. *Pharmaceutics*. 2022;14(10):2065. DOI: 10.3390/pharmaceutics14102065
214. Deng Z, Fan T, Xiao C, et al. TGF-beta signaling in health, disease and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9:61. DOI: 10.1038/s41392-024-01764-w
215. Jackson J, Samarah H, Palmer W, et al. The impact of biomaterial characteristics on macrophage phenotypes in tissue engineering: a review. *Plast Aesthet Res*. 2025;12:12. DOI: 10.20517/2347-9264.2024.166
216. Hu W, Zhang X, Sheng H, et al. The mutual regulation between gammadelta T cells and macrophages during wound healing. *J Leukoc Biol*. 2024;115(5):840-851. DOI: 10.1093/jleuko/qiad087
217. Sousa AB, Águas AP, Barbosa MA, et al. Immunomodulatory biomaterial-based wound dressings advance the healing of chronic wounds via regulating macrophage behavior. *Regen Biomater*. 2022;9:rbac065. DOI: 10.1093/rb/rbac065
218. Lacina L, Kolár M, Pfeiferová L, et al. Wound healing: insights into autoimmunity, ageing, and cancer ecosystems through inflammation and IL-6 modulation. *Front Immunol*. 2024;15:1403570. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1403570
219. Nosbaum A, Prevel N, Truong HA, et al. Cutting Edge: Regulatory T Cells Facilitate Cutaneous Wound Healing. *J Immunol*. 2016;196(5):2010-2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1502139

220. Li J, Tan J, Martino MM, et al. Regulatory T-Cells: Potential Regulator of Tissue Repair and Regeneration. *Front Immunol.* 2018;9:585. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00585
221. Seraphim PM, Leal EC, Moura J, et al. Lack of lymphocytes impairs macrophage polarization and angiogenesis in diabetic wound healing. *Life Sci.* 2020;254:117813. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117813
222. Zhu X, Zhu J. CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):8011. DOI: 10.3390/ijms21218011
223. Chapoval S, Dasgupta P, Dorsey NJ, et al. Regulation of the T helper cell type 2 (Th2)/T regulatory cell (Treg) balance by IL-4 and STAT6. *J Leukoc Biol.* 2010;87(6):1011-1018. DOI: 10.1189/jlb.1209772
224. Chen L, Mehta ND, Zhao Y, et al. Absence of CD4 or CD8 lymphocytes changes infiltration of inflammatory cells and profiles of cytokine expression in skin wounds, but does not impair healing. *Exp Dermatol.* 2014;23(3):189-194. DOI: 10.1111/exd.12346
225. Boyce DE, Jones WD, Ruge F, et al. The role of lymphocytes in human dermal wound healing. *Br J Dermatol.* 2000;143(1):59-65. DOI: 10.1046/j.1365-2133.2000.03591.x
226. Chen H, Wang Y, Zippi M, et al. Oxidative stress, DAMPs, and immune cells in acute pancreatitis: molecular mechanisms and therapeutic prospects. *Front Immunol.* 2025;16:1608618. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1608618
227. Smith LK, Cidlowski JA. Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Prog Brain Res.* 2010;182:1-30. DOI: 10.1016/S0079-6123(10)82001-1
228. Schmidt S, Rainer J, Ploner C, et al. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ.* 2004;11(Suppl 1):S45-S55. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401456
229. Ramírez F, Fowell DJ, Puklavec M, et al. Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4<sup>+</sup> T cells in vitro. *J Immunol.* 1996;156(7):2406-2412.

230. Bhuiyan P, Wang YW, Sha HH, et al. Neuroimmune connections between corticotropin-releasing hormone and mast cells: novel strategies for the treatment of neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.* 2021;16(11):2184-2197. DOI: 10.4103/1673-5374.310608
231. Yukihiro K, Keisuke O, Akihiko I. Molecular mechanisms of mast cell development. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2006;26(3):387-405. DOI: 10.1016/j.iac.2006.05.004
232. Bayat M, Vasheghani M, Razavie N, et al. Effects of low-level laser therapy on mast cell number and degranulation in third-degree burns of rats. *J Rehabil Res Dev.* 2008;45(6):931-938. DOI: 10.1682/jrrd.2007.07.0110
233. Stefanski V, Peschel A, Reber S. Social stress affects migration of blood T cells into lymphoid organs. *J Neuroimmunol.* 2003;138(1-2):17-24. DOI: 10.1016/S0165-5728(03)00076-6
234. Jamur MC, Moreno AN, Mello LF, et al. Mast cell repopulation of the peritoneal cavity: contribution of mast cell progenitors versus bone marrow derived committed mast cell precursors. *BMC Immunol.* 2010;11:32. DOI: 10.1186/1471-2172-11-32
235. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(1):9-22. DOI: 10.1038/nri3341
236. Gurtner A, Crepez D, Arnold IC. Emerging functions of tissue-resident eosinophils. *J Exp Med.* 2023;220(7):e20221435. DOI: 10.1084/jem.20221435
237. Wechsler ME, Munitz A, Ackerman SJ, et al. Eosinophils in Health and Disease: A State-of-the-Art Review. *Mayo Clin Proc.* 2021;96(10):2694-2707. DOI: 10.1016/j.mayocp.2021.04.025
238. Palacionyte J, Januskevicius A, Vasyle E, et al. IL-5 and GM-CSF, but Not IL-3, Promote the Proliferative Properties of Inflammatory-like and Lung Resident-like Eosinophils in the Blood of Asthma Patients. *Cells.* 2022;11(23):3804. DOI: 10.3390/cells11233804

239. Weller PF, Spencer LA. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(12):746-760. DOI: 10.1038/nri.2017.95
240. Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J Clin Invest*. 2016;126(9):3279-3295. DOI: 10.1172/JCI85664
241. Kolbinger A, Schäufele TJ, Steigerwald H, et al. Eosinophil-derived IL-4 is necessary to establish the inflammatory structure in innate inflammation. *EMBO Mol Med*. 2023;15:EMMM202216796. DOI: 10.15252/emmm.202216796
242. Heredia JE, Mukundan L, Chen FM, et al. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell*. 2013;153(2):376-388. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.053
243. Minai-Fleminger Y, Levi-Schaffer F. Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. *Inflamm Res*. 2009;58(10):631-638. DOI: 10.1007/s00011-009-0042-6
244. Ranjitkar S, Krajewski D, Garcia C, et al. IL-10 Differentially Promotes Mast Cell Responsiveness to IL-33, Resulting in Enhancement of Type 2 Inflammation and Suppression of Neutrophilia. *J Immunol*. 2024;212(9):1407-1419. DOI: 10.4049/jimmunol.2300884
245. Nagata K, Nishiyama C. IL-10 in Mast Cell-Mediated Immune Responses: Anti-Inflammatory and Proinflammatory Roles. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4972. DOI: 10.3390/ijms22094972
246. Yousefi S, Gold JA, Andina N, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*. 2008;14(9):949-953. DOI: 10.1038/nm.1855
247. Mukherjee M, Lacy P, Ueki S. Eosinophil Extracellular Traps and Inflammatory Pathologies-Untangling the Web! *Front Immunol*. 2018;9:2763. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02763
248. Ueki S, Melo RC, Ghiran I, et al. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. *Blood*. 2013;121(11):2074-2083. DOI: 10.1182/blood-2012-05-432088

249. Zustakova M, Kratochvilova L, Slama P. Apoptosis of Eosinophil Granulocytes. *Biology*. 2020;9(12):457. DOI: 10.3390/biology9120457
250. Куц О. Г. Особливості будови шкіри і асоційованої з нею лімфоїдної тканини у щурів в ранньому постнатальному періоді в нормі та після внутрішньоплідного уведення антигенів (анатоמו-експериментальне дослідження): дис. канд. мед. наук: 14.03.01 - нормальна анатомія. Запоріжжя; 2001. 235 с.
251. Ren H, Zhao F, Zhang Q, et al. Autophagy and skin wound healing. *Burns Trauma*. 2022;10:tkac003. DOI: 10.1093/burnst/tkac003
252. Stroncek JD, Reichert WM. Overview of Wound Healing in Different Tissue Types. In: *Indwelling Neural Implants: Strategies for Contending with the In Vivo Environment*. 2008. Chapter 1. DOI: 10.1201/9781420004526.ch1
253. Lin Z, Li LY, Chen L, et al. Lonicerin promotes wound healing in diabetic rats by enhancing blood vessel regeneration through Sirt1-mediated autophagy. *Acta Pharmacol Sin*. 2024;45(4):815-830. DOI: 10.1038/s41401-023-01193-5
254. Mijaljica D, Spada F, Klionsky DJ, et al. Autophagy is the key to making chronic wounds acute in skin wound healing. *Autophagy*. 2023;19(9):2578-2584. DOI: 10.1080/15548627.2023.2194155
255. Moreno-Blas D, Adell T, González-Estévez C. Autophagy in Tissue Repair and Regeneration. *Cells*. 2025;14:282. DOI: 10.3390/cells14040282
256. Shi S, Wu B, Zhang J, et al. Autophagy protein LC3 regulates the fibrosis of hypertrophic scar by controlling Bcl-xL in dermal fibroblasts. *Oncotarget*. 2017;8(55):93757-93770. DOI: 10.18632/oncotarget.20771
257. Ma Y, Liu Z, Miao L, et al. Mechanisms underlying pathological scarring by fibroblasts during wound healing. *Int Wound J*. 2023;20(6):2190-2206. DOI: 10.1111/iwj.14097
258. Kovalchin JT, Wang R, Wagh MS, et al. In vivo delivery of heat shock protein 70 accelerates wound healing by up-regulating macrophage-mediated

phagocytosis. *Wound Repair Regen.* 2006;14(2):129-137. DOI: 10.1111/j.1743-6109.2006.00102.x

259. Belenichev IF, Aliyeva OG, Popazova OO, et al. Involvement of heat shock proteins HSP70 in the mechanisms of endogenous neuroprotection: the prospect of using HSP70 modulators. *Front Cell Neurosci.* 2023;17:1131683. DOI: 10.3389/fncel.2023.1131683

260. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int.* 2015;2015:549412. DOI: 10.1155/2015/549412

261. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2010;86(2):236-242. DOI: 10.1093/cvr/cvq045

262. Belenichev I, Aliyeva O, Popazova O, et al. Molecular and biochemical mechanisms of diabetic encephalopathy. *Acta Biochim Pol.* 2023;70(4):751-760. DOI: 10.18388/abp.2020\_6953

263. Hong WX, Hu MS, Esquivel M, et al. The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing. *Adv Wound Care.* 2014;3(5):390-399. DOI: 10.1089/wound.2013.0520

264. Steiner CA, Cartwright IM, Taylor CT, et al. Hypoxia-inducible factor as a bridge between healthy barrier function, wound healing, and fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022;323(3):C866-C878. DOI: 10.1152/ajpcell.00227.2022

265. Nauta TD, Van Hinsbergh VWM, Koolwijk P. Hypoxic Signaling During Tissue Repair and Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2014;15:19791-19815. DOI: 10.3390/ijms151119791

266. Pender MP, Rist MJ. Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia. *Glia.* 2001;36(2):137-144. DOI: 10.1002/glia.1103

267. Haanen C, Vermes I. Apoptosis and inflammation. *Mediators Inflamm.* 1995;4(1):5-15. DOI: 10.1155/S0962935195000020

268. Bock FJ, Riley JS. When cell death goes wrong: inflammatory outcomes of failed apoptosis and mitotic cell death. *Cell Death Differ.* 2023;30:293-303. DOI: 10.1038/s41418-022-01082-0
269. Szondy Z, Sarang Z, Kiss B, et al. Anti-inflammatory Mechanisms Triggered by Apoptotic Cells during Their Clearance. *Front Immunol.* 2017;8:909. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00909
270. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep.* 2019;39(1):BSR20180992. DOI: 10.1042/BSR20180992
271. Li M, Wang ZW, Fang LJ, et al. Programmed cell death in atherosclerosis and vascular calcification. *Cell Death Dis.* 2022;13:467. DOI: 10.1038/s41419-022-04923-5
272. Seminotti B, Grings M, Tucci P, et al. Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2 Signaling in the Neuropathophysiology of Inherited Metabolic Disorders. *Front Cell Neurosci.* 2021;15:785057. DOI: 10.3389/fncel.2021.785057
273. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2020;21(13):4777. DOI: 10.3390/ijms21134777
274. Swamy SM, Rajasekaran NS, Thannickal VJ. Nuclear Factor-Erythroid-2-Related Factor 2 in Aging and Lung Fibrosis. *Am J Pathol.* 2016;186(7):1712-1723. DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.02.022
275. Ngo V, Duennwald ML. Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants.* 2022;11:2345. DOI: 10.3390/antiox11122345
276. Liu Y, Yang X, Liu Y, et al. NRF2 signalling pathway: New insights and progress in the field of wound healing. *J Cell Mol Med.* 2021;25(13):5857-5868. DOI: 10.1111/jcmm.16597
277. Süntar I, Çetinkaya S, Panieri E, et al. Regulatory Role of Nrf2 Signaling Pathway in Wound Healing Process. *Molecules.* 2021;26(9):2424. DOI: 10.3390/molecules26092424

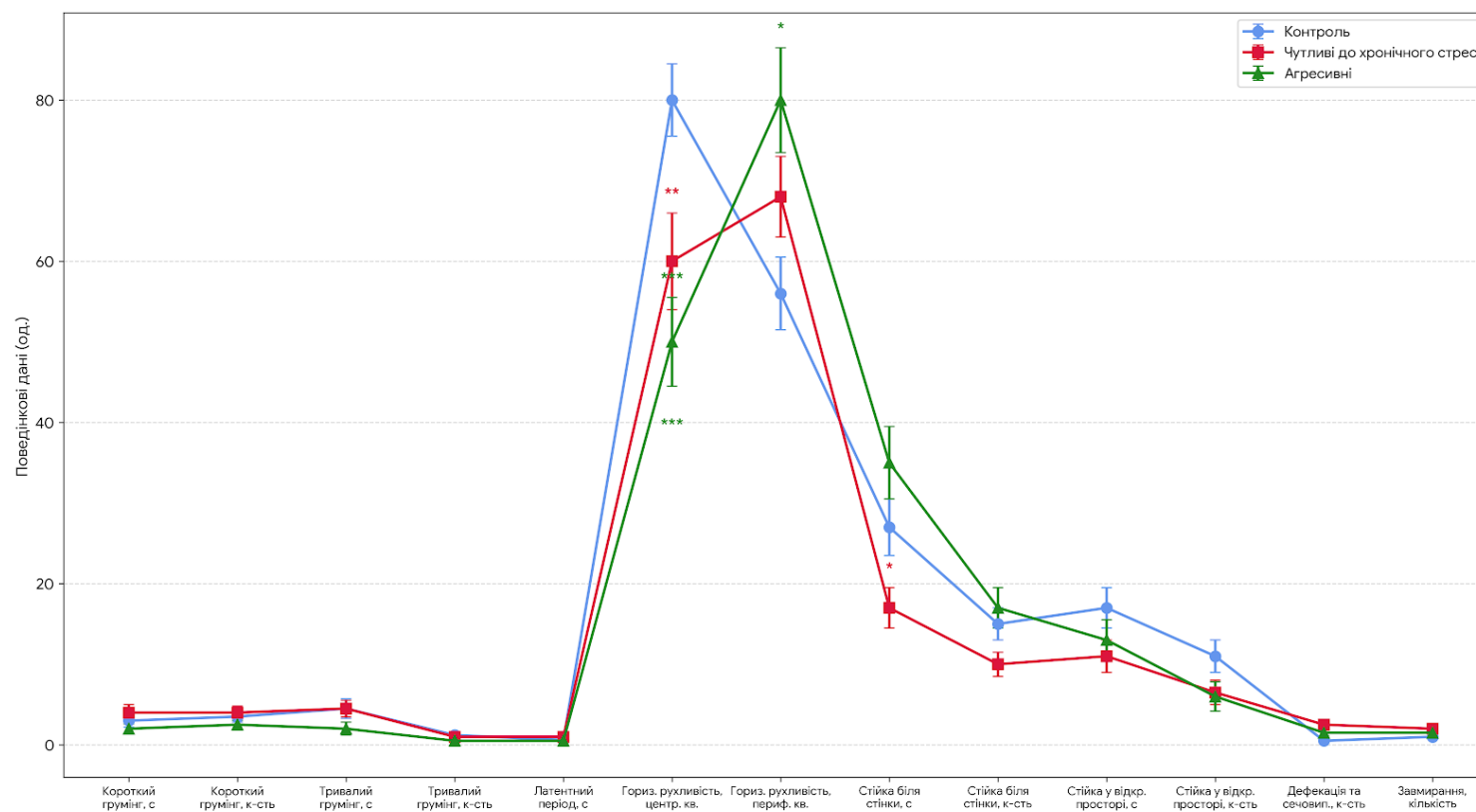
278. Hiebert P, Werner S. Regulation of Wound Healing by the NRF2 Transcription Factor—More Than Cytoprotection. *Int J Mol Sci.* 2019;20:3856. DOI: 10.3390/ijms20163856
279. Lim CH, Soga T, Parhar IS. Social stress-induced serotonin dysfunction activates spexin in male Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023;120(3):e2117547120. DOI: 10.1073/pnas.2117547120
280. Araki R, Kita A, Ago Y, et al. Chronic social defeat stress induces anxiety-like behaviors via downregulation of serotonin transporter in the prefrontal serotonergic system in mice. *Neurochem Int.* 2024;174:105682. DOI: 10.1016/j.neuint.2024.105682
281. Zou WJ, Song YL, Wu MY, et al. A discrete serotonergic circuit regulates vulnerability to social stress. *Nat Commun.* 2020;11:4218. DOI: 10.1038/s41467-020-18010-w
282. Lv J, Liu F. The Role of Serotonin beyond the Central Nervous System during Embryogenesis. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:74. DOI: 10.3389/fncel.2017.00074
283. McCorvy JD, Roth BL. Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 2015;150:129-142. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.01.009
284. Xiao M, Li L, Li C, et al. Role of autophagy and apoptosis in wound tissue of deep second-degree burn in rats. *Acad Emerg Med.* 2014;21(4):383-391. DOI: 10.1111/acem.12352
285. Riwaldt S, Corydon TJ, Pantalone D, et al. Role of Apoptosis in Wound Healing and Apoptosis Alterations in Microgravity. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:679650. DOI: 10.3389/fbioe.2021.679650
286. Chen L, Chen G, Guo Y, et al. Ketanserin, a serotonin 2A receptor antagonist, alleviates ischemia-related biliary fibrosis following donation after cardiac death liver transplantation in rats. *Liver Transpl.* 2014;20(11):1317-1326. DOI: 10.1002/lt.23947

287. Bloomfield MA, McCutcheon RA, Kempton M, et al. The effects of psychosocial stress on dopaminergic function and the acute stress response. *Elife*. 2019;8:e46797. DOI: 10.7554/eLife.46797
288. Morgan C, Charalambides M, Hutchinson G, et al. Migration, ethnicity, and psychosis: toward a sociodevelopmental model. *Schizophr Bull*. 2010;36(4):655-664. DOI: 10.1093/schbul/sbq051
289. McCutcheon R, Bloomfield MAP, Dahoun T, et al. Amygdala reactivity in ethnic minorities and its relationship to the social environment: an fMRI study. *Psychol Med*. 2018;48(12):1985-1992. DOI: 10.1017/S0033291717003506
290. Zhao T, Gao X, Huang GB. Effects of Chronic Social Defeat Stress on Behavior and Dopamine Receptors in Adolescent Mice With 6-Hydroxydopamine Lesions of the Medial Prefrontal Cortex. *Front Behav Neurosci*. 2021;15:731373. DOI: 10.3389/fnbeh.2021.731373
291. Shome S, Rana T, Ganguly S, et al. Dopamine regulates angiogenesis in normal dermal wound tissues. *PLoS One*. 2011;6(9):e25215. DOI: 10.1371/journal.pone.0025215
292. Shome S, Dasgupta PS, Basu S. Dopamine regulates mobilization of mesenchymal stem cells during wound angiogenesis. *PLoS One*. 2012;7(2):e31682. DOI: 10.1371/journal.pone.0031682
293. Chakroborty D, Goswami S, Basu S, et al. Catecholamines in the regulation of angiogenesis in cutaneous wound healing. *FASEB J*. 2020;34(11):14093-14102. DOI: 10.1096/fj.202001701R
294. Pan L, Tang J, Liu H, et al. Sympathetic nerves: How do they affect angiogenesis, particularly during wound healing of soft tissues? *Clin Hemorheol Microcirc*. 2016;62(2):181-191. DOI: 10.3233/CH-152019
295. Chakroborty D, Sarkar C, Lu K, et al. Activation of Dopamine D1 Receptors in Dermal Fibroblasts Restores Vascular Endothelial Growth Factor-A Production by These Cells and Subsequent Angiogenesis in Diabetic Cutaneous Wound Tissues. *Am J Pathol*. 2016;186(9):2262-2270. DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.05.008

296. Liu GQ, Liu ZX, Lin ZX, et al. Effects of Dopamine on stem cells and its potential roles in the treatment of inflammatory disorders: a narrative review. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14(1):230. DOI: 10.1186/s13287-023-03454-w
297. Mendoza-Torreblanca JG, Cárdenas-Rodríguez N, Carro-Rodríguez J, et al. Antiangiogenic Effect of Dopamine and Dopaminergic Agonists as an Adjuvant Therapeutic Option in the Treatment of Cancer, Endometriosis, and Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2023;24:10199. DOI: 10.3390/ijms241210199
298. Vaughn AR, Davis MJ, Sivamani RK, et al. A Concise Review of the Conflicting Roles of Dopamine-1 versus Dopamine-2 Receptors in Wound Healing. *Molecules.* 2018;23:50. DOI: 10.3390/molecules23010050
299. Sinha S, Vohra PK, Bhattacharya R, et al. Dopamine regulates phosphorylation of VEGF receptor 2 by engaging Src-homology-2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 18):3385-3392. DOI: 10.1242/jcs.053124
300. Yang GL, Li LY. Counterbalance: modulation of VEGF/VEGFR activities by TNFSF15. *Signal Transduct Target Ther.* 2018;3:21. DOI: 10.1038/s41392-018-0023-8
301. Brami-Cherrier K, Valjent E, Garcia M, et al. Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation. *J Neurosci.* 2002;22(20):8911-8921. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-20-08911.2002
302. Vrankova S, Galandakova Z, Benko J, et al. Duration of Social Isolation Affects Production of Nitric Oxide in the Rat Brain. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19):10340. DOI: 10.3390/ijms221910340
303. Belenichev I, Popazova O, Bukhtiyarova N, et al. Modulating Nitric Oxide: Implications for Cytotoxicity and Cytoprotection. *Antioxidants.* 2024;13:504. DOI: 10.3390/antiox13050504
304. Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep.* 2005;57(Suppl):108-119. PMID: 16415491

305. Kar S, Kavdia M. Endothelial NO and O<sub>2</sub> production rates differentially regulate oxidative, nitroxidative, and nitrosative stress in the microcirculation. *Free Radic Biol Med.* 2013;63:161-174. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.024
306. Polaka S, Katare P, Pawar B, et al. Emerging ROS-Modulating Technologies for Augmentation of the Wound Healing Process. *ACS Omega.* 2022;7(35):30657-30672. DOI: 10.1021/acsomega.2c02675
307. Tampa M, Nicolae I, Ene CD, et al. The Interplay between Nitrosative Stress, Inflammation, and Antioxidant Defense in Patients with Lichen Planus. *Antioxidants (Basel).* 2024;13(6):670. DOI: 10.3390/antiox13060670
308. Kumar MA, Baba SK, Sadida HQ, et al. Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9:27. DOI: 10.1038/s41392-024-01735-1
309. Shen L, Tian Q, Ran Q, et al. Z-Ligustilide: A Potential Therapeutic Agent for Atherosclerosis Complicating Cerebrovascular Disease. *Biomolecules.* 2024;14:1623. DOI: 10.3390/biom14121623
310. Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer.* 2011;2(12):1117-1133. DOI: 10.1177/1947601911423654
311. Tammam BMH, Habotta OA, El-Khadragy M, et al. Therapeutic role of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on skin burn healing and rejuvenation: A focus on scar regulation, oxido-inflammatory stress and apoptotic mechanisms. *Heliyon.* 2023;9(9):e19452. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e19452
312. Ukaegbu K, Allen E, Svoboda KKH. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Wound Healing: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Int Wound J.* 2025;22(5):e70330. DOI: 10.1111/iwj.70330

## ДОДАТОК А1



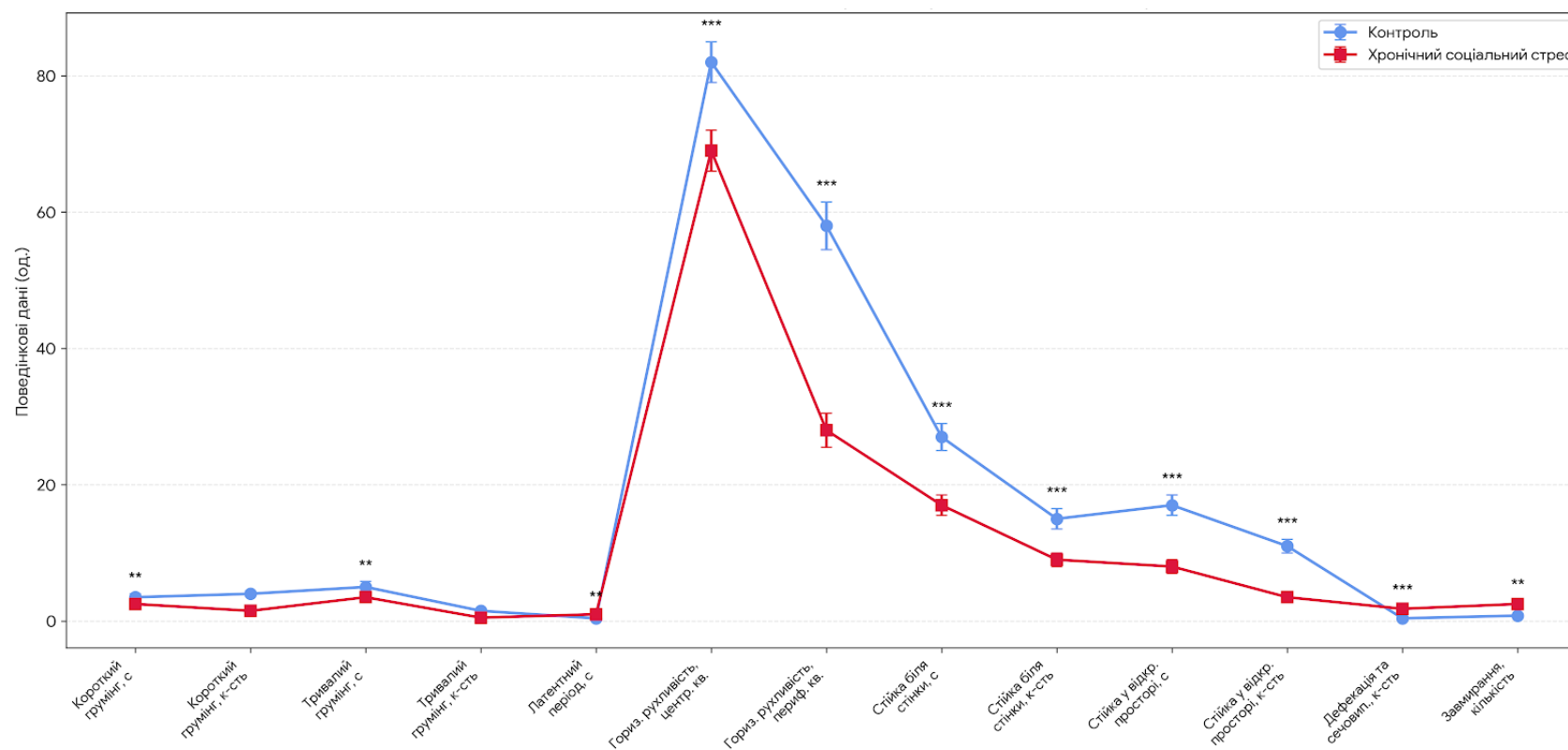
**Рисунок А.1** – Результати тесту «Відкрите поле» до моделювання хронічного соціального стресу.

Примітки: \*- зміни статистично значимі, порівняно з контролем ( $p \leq 0.05$ ).

\*\* - зміни статистично значимі, порівняно з контролем ( $p \leq 0.01$ ).

\*\*\* - зміни статистично значимі, порівняно з контролем ( $p \leq 0.001$ ).

## ДОДАТОК А2



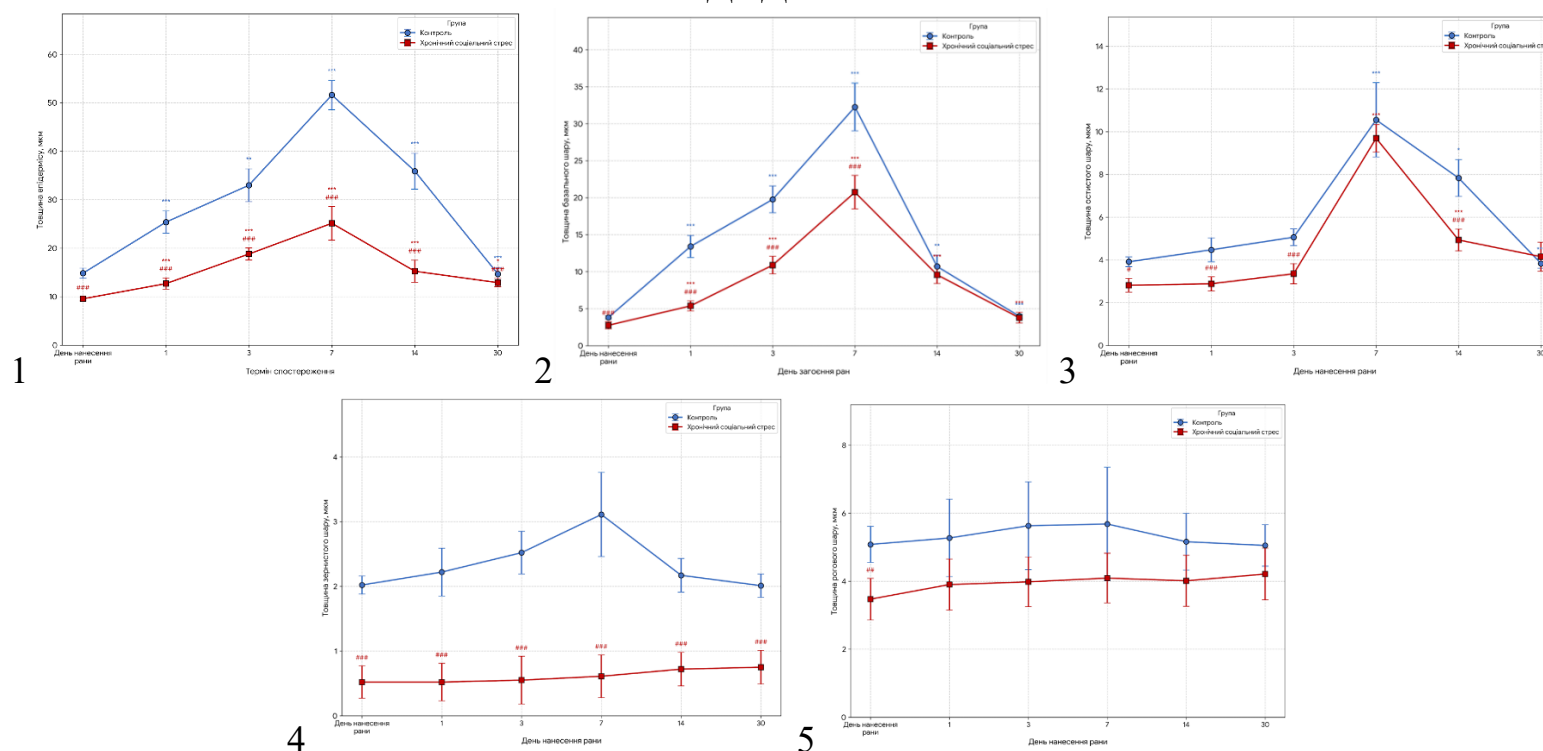
**Рисунок А2.** – Результати тесту «Відкрите поле» після моделювання хронічного соціального стресу.

Примітки: \*- зміни статистично значимі, порівняно з контролем ( $p \leq 0.05$ ).

\*\* - зміни статистично значимі, порівняно з контролем ( $p \leq 0.01$ ).

\*\*\* - зміни статистично значимі, порівняно з контролем ( $p \leq 0.001$ ).

## ДОДАТОК АЗ



**Рисунок АЗ** - Динаміка змін товщини епідермісу (1) та його базального (2), остистого (3), зернистого (4) та рогового (5) шарів крайової зони ран шкіри щурів в контролі та після впливу хронічного соціального стресу у процесі загоєння. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

Примітки: \* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

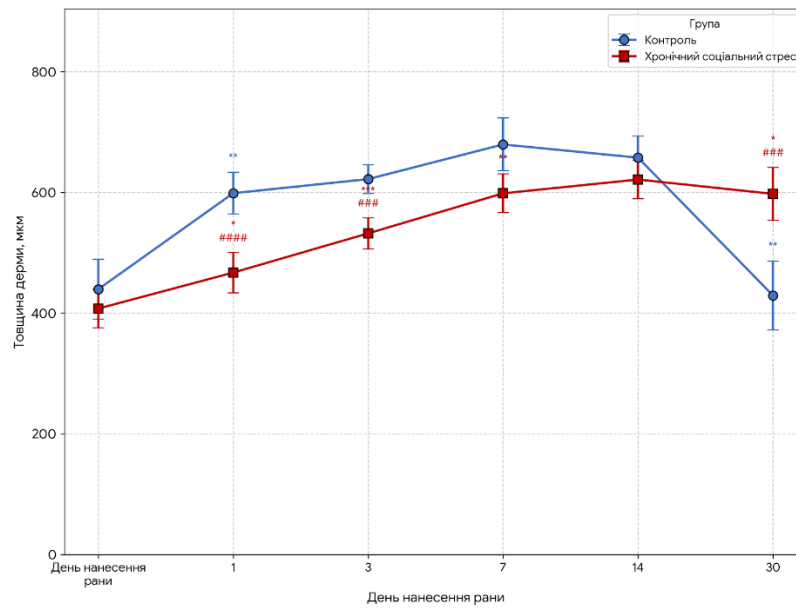
\*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

# - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ );

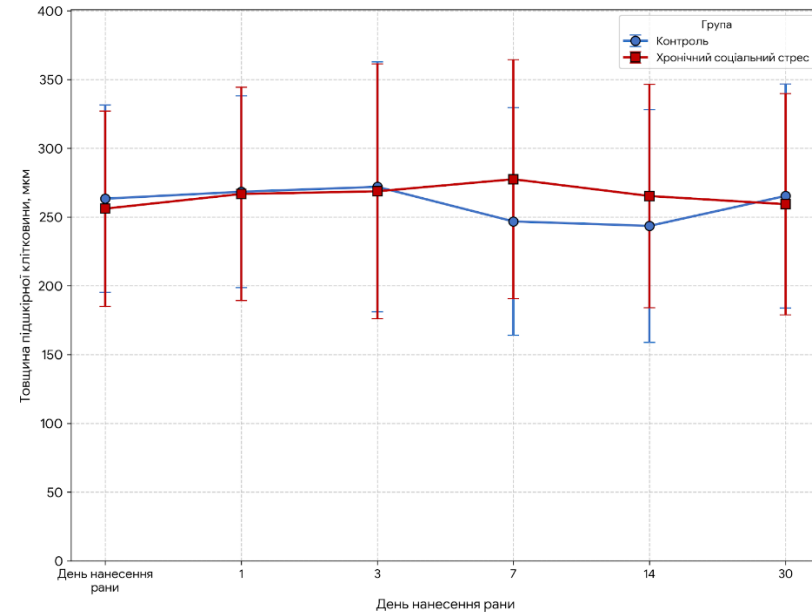
## - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,01$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

## ДОДАТОК А4



1



2

**Рисунок А4** - Динаміка змін товщини дерми (1) та підшкірної клітковини (2) крайової зони ран шкіри щурів в контролі та після впливу хронічного соціального стресу у процесі загоєння. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

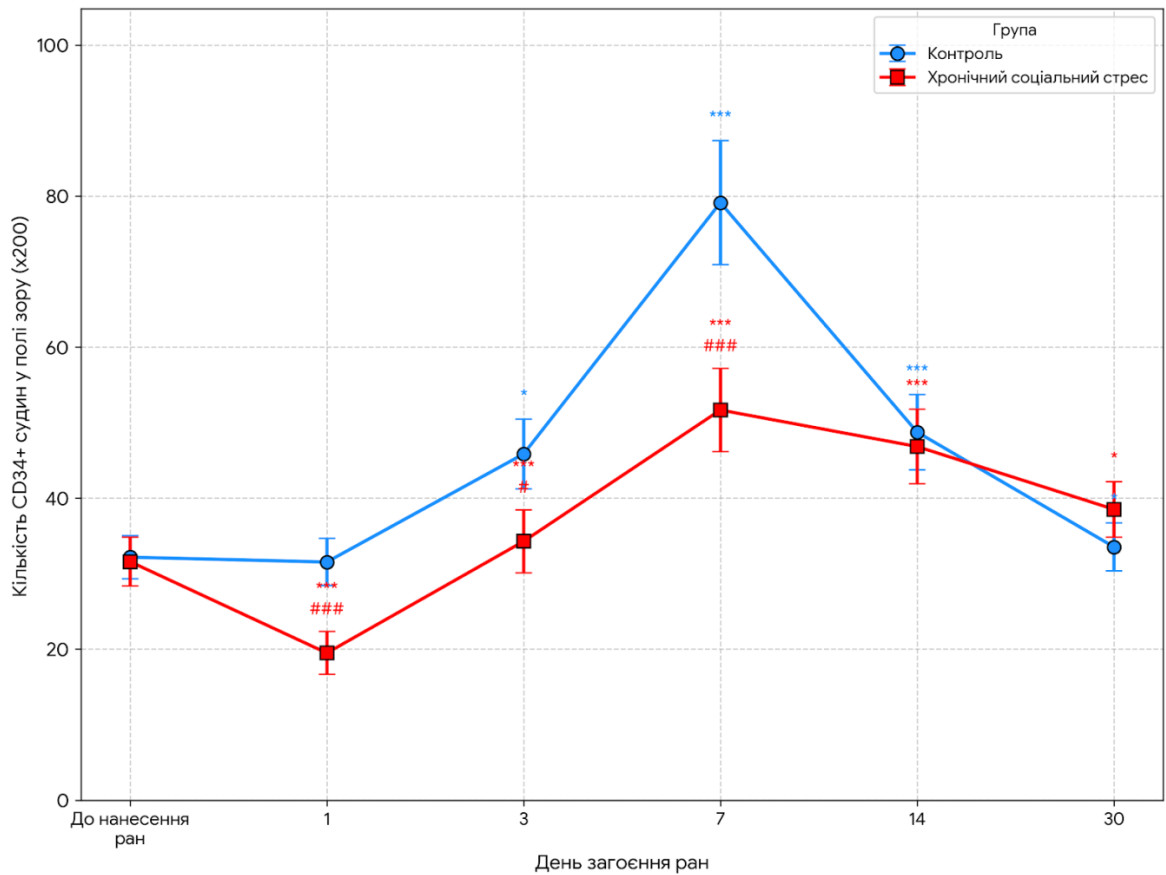
Примітки: \* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

\*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

## ДОДАТОК А5



**Рисунок А.5** - Динаміка васкуляризації крайової зони ран шкіри щурів після впливу соціального хронічного стресу в процесі загоєння. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

Примітки. \*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

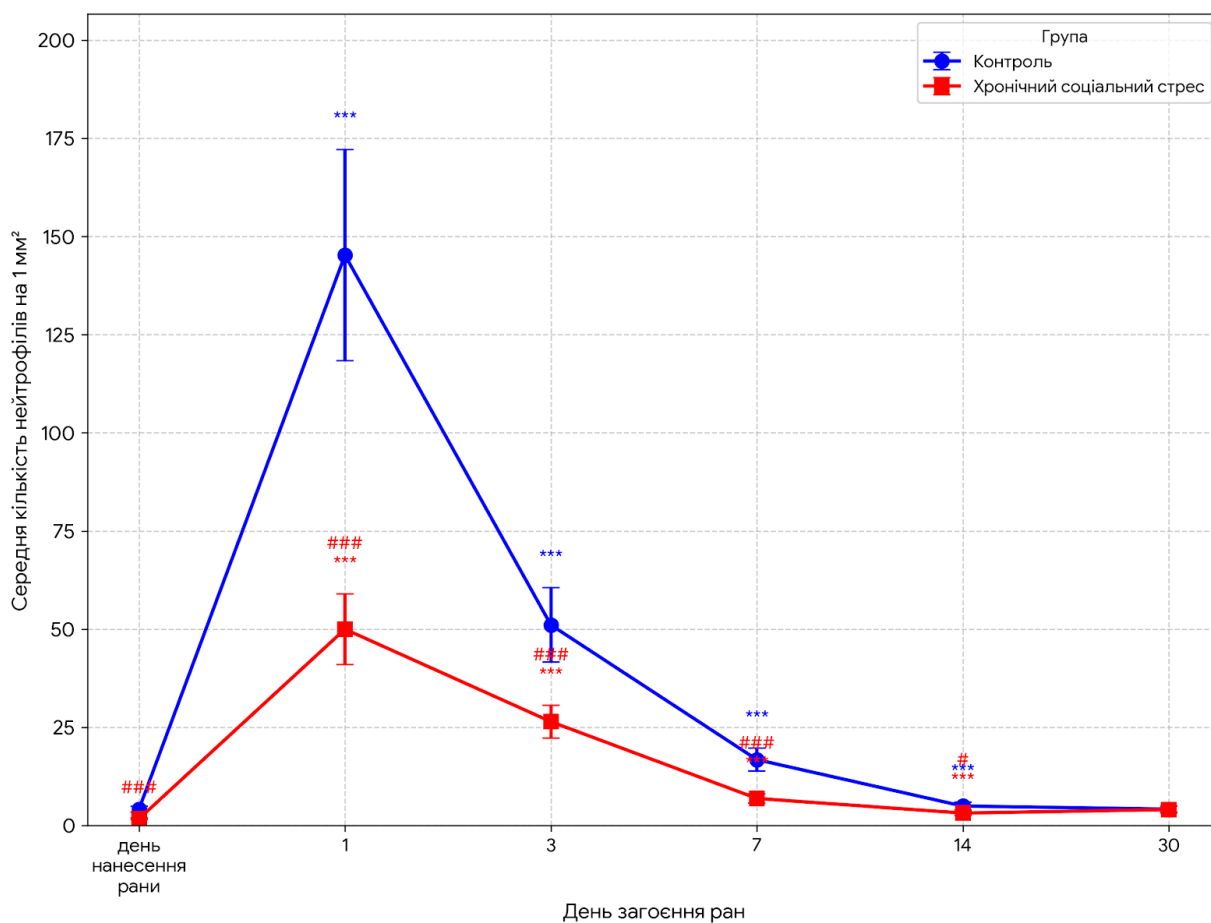
\*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

# - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ );

## - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,01$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

## ДОДАТОК А6



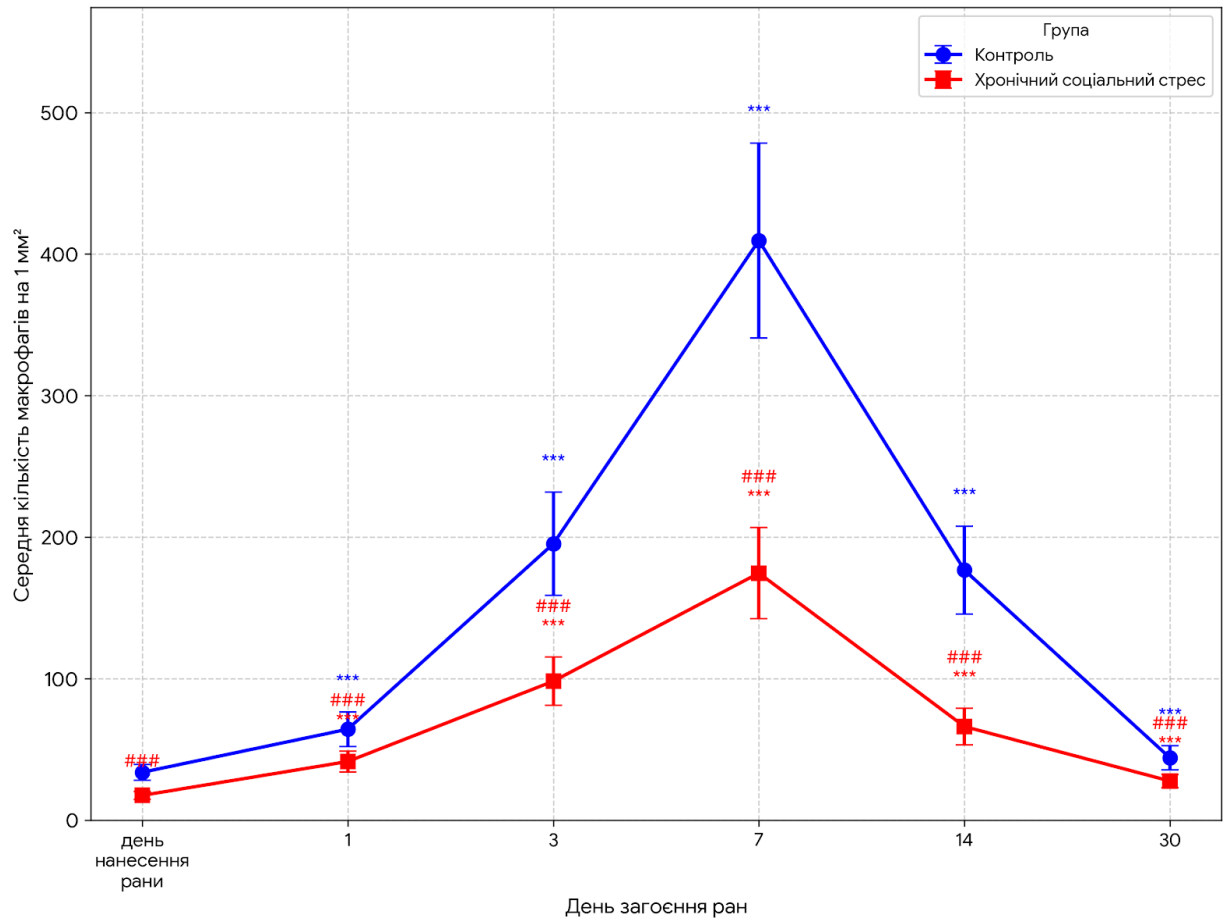
**Рисунок А.6** - Динаміка інфільтрації нейтрофілів крайової зони ран шкіри щурів після впливу соціального хронічного стресу в процесі загоєння. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

Примітки: \*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

# - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

## ДОДАТОК А7

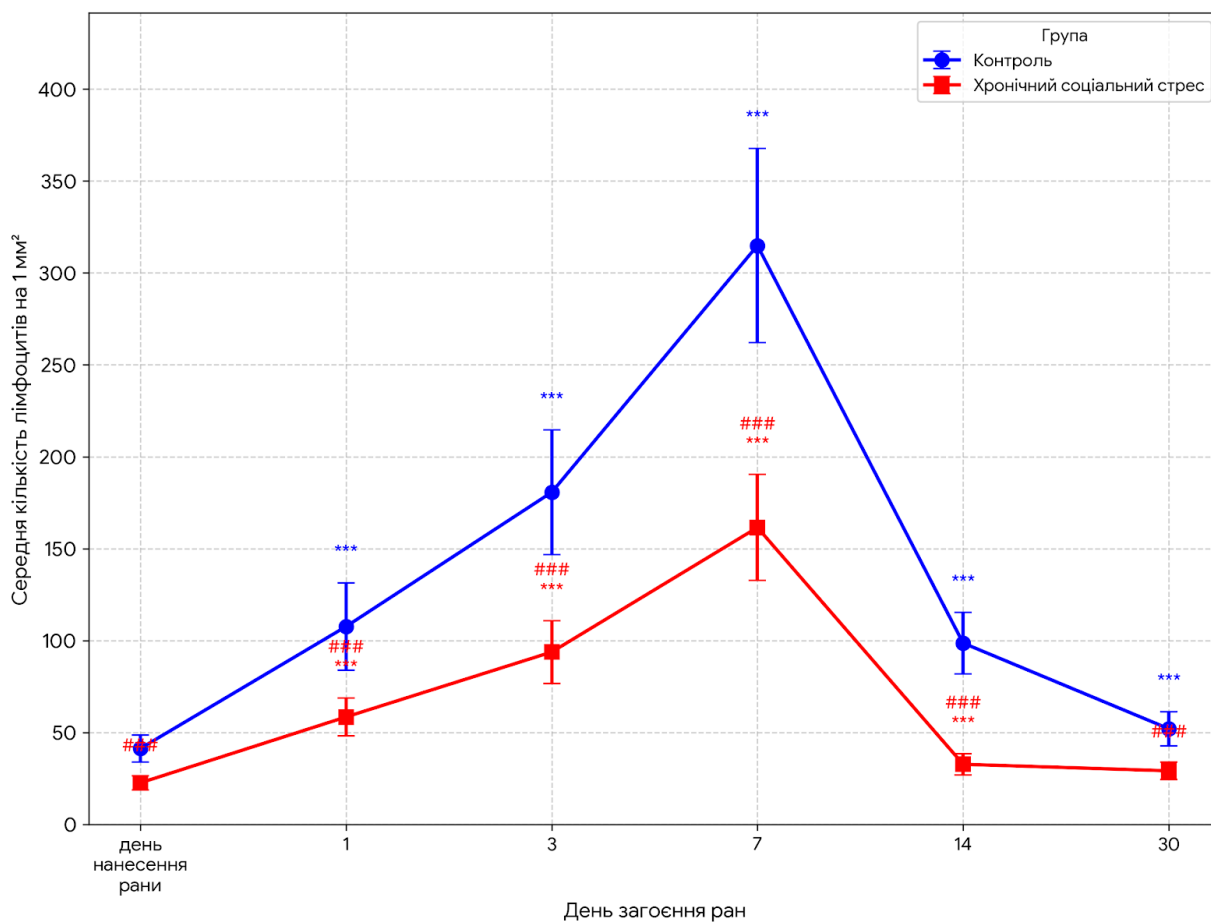


**Рисунок А.7** - Динаміка інфільтрації макрофагів крайової зони ран шкіри щурів після впливу соціального хронічного стресу в процесі загоєння. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

Примітки: \*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

## ДОДАТОК А8

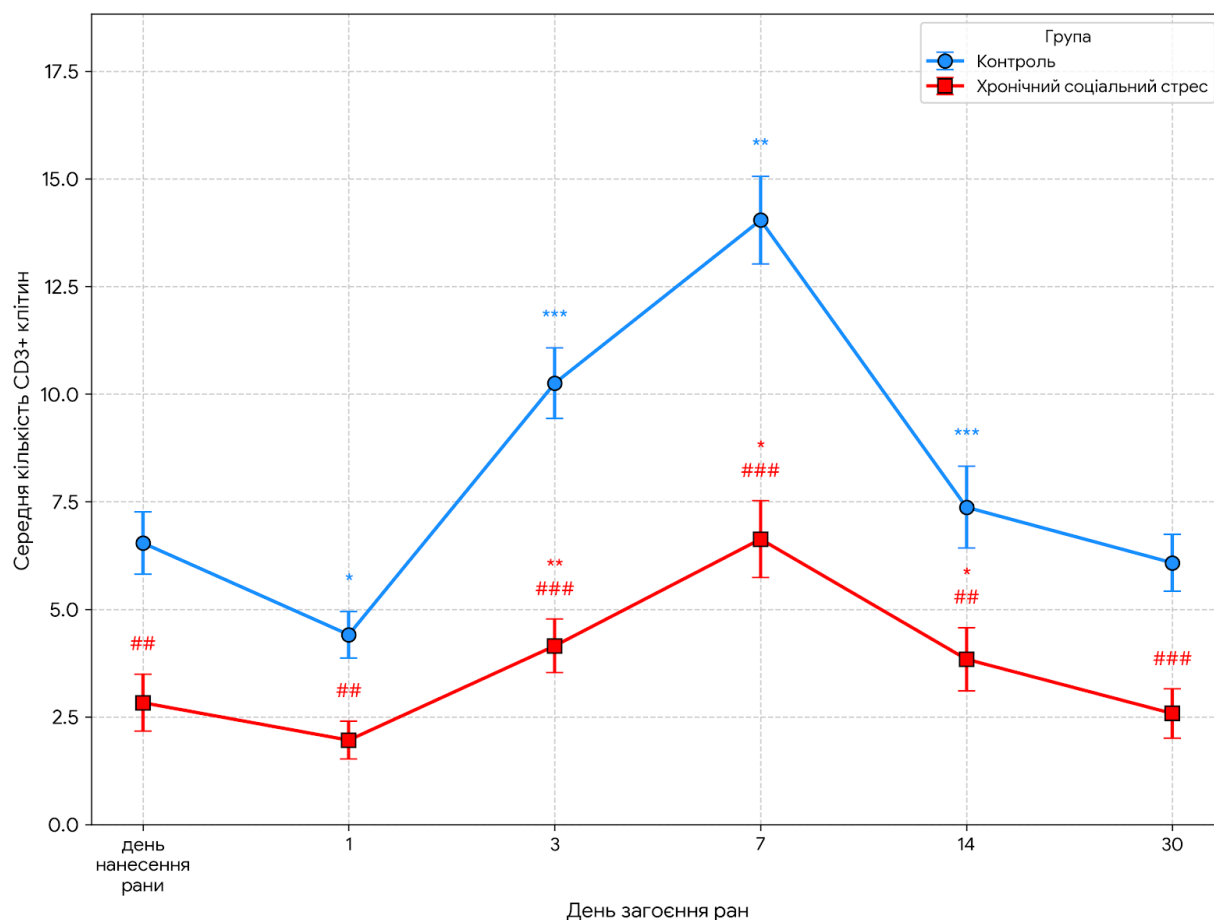


**Рисунок А.8** - Динаміка інфільтрації лімфоцитів крайової зони ран шкіри щурів після впливу соціального хронічного стресу в процесі загоєння. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

Примітки: \*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

## ДОДАТОК А9



**Рисунок А.9** - Динаміка інфільтрації CD3<sup>+</sup>- лімфоцитів крайової зони ран шкіри щурів після впливу соціального хронічного стресу в процесі загоєння. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

Примітки: \* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

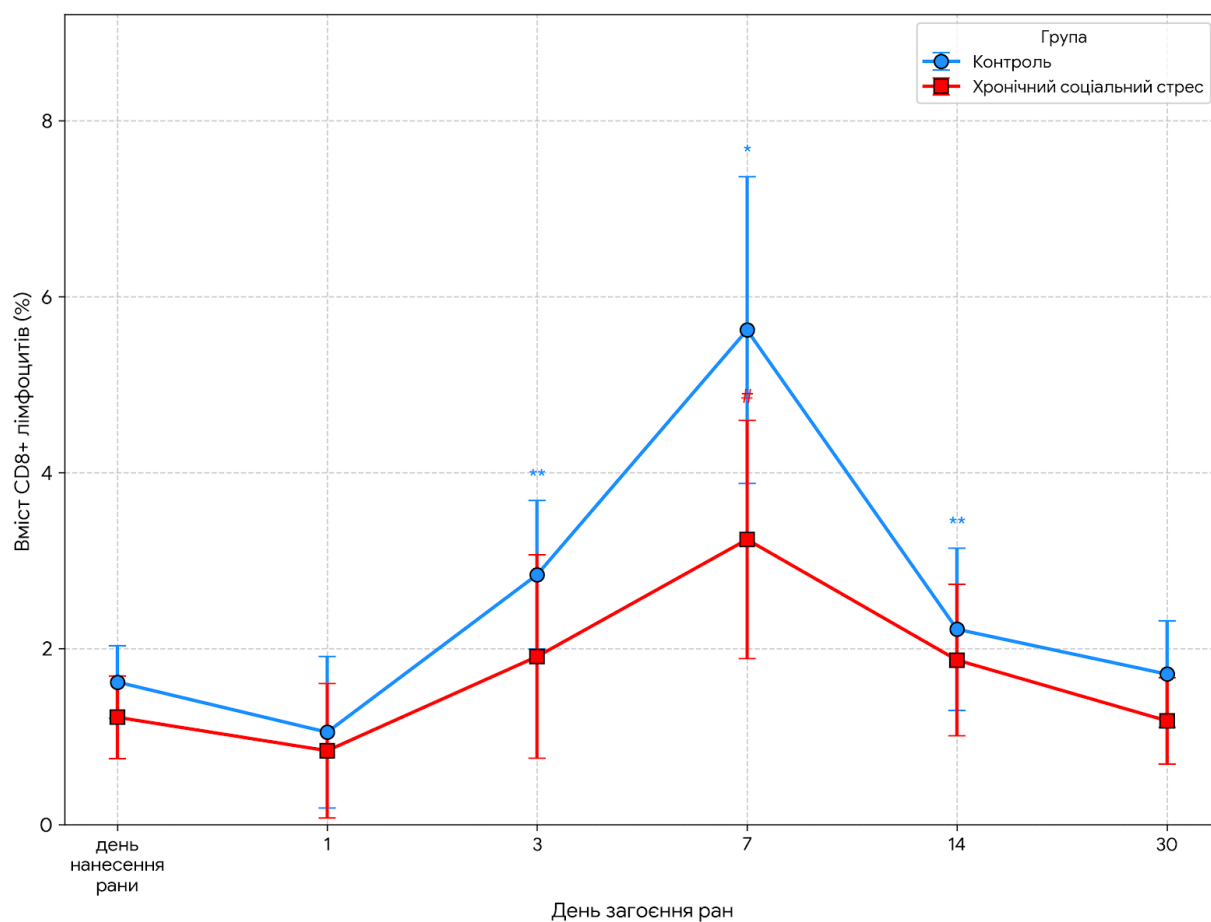
\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

\*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

## - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,01$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

## ДОДАТОК А10



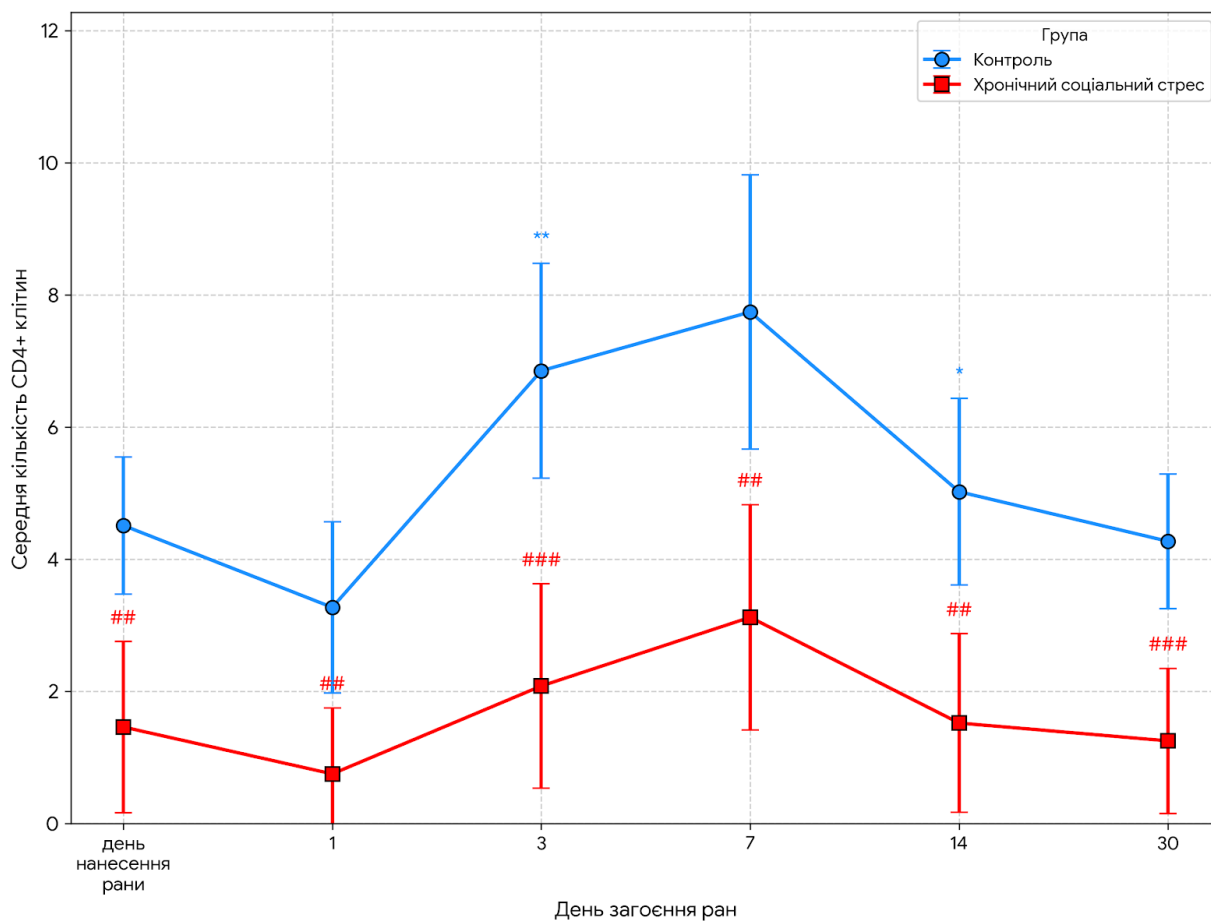
**Рисунок А.10** - Динаміка інфільтрації CD8<sup>+</sup>- лімфоцитів крайової зони ран шкіри щурів після впливу соціального хронічного стресу в процесі загоєння. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

Примітки: \* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

# - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ );

## ДОДАТОК А11



**Рисунок А.11** - Динаміка інфільтрації CD4<sup>+</sup>- лімфоцитів крайової зони ран шкіри щурів після впливу соціального хронічного стресу в процесі загоєння. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

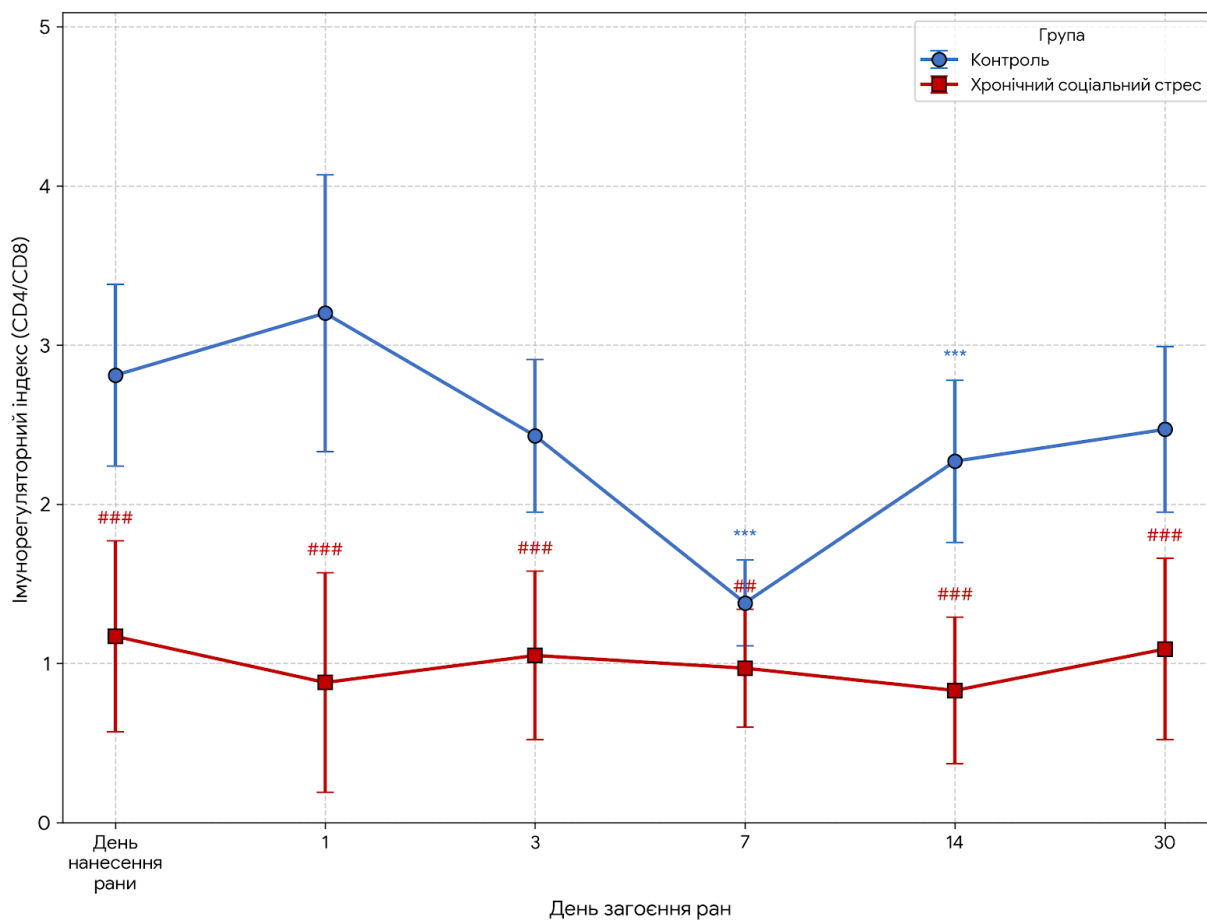
Примітки: \* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

## - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,01$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

## ДОДАТОК А12



**Рисунок А.12** - Динаміка індексу CD4/CD8 лімфоцитів крайової зони ран шкіри щурів після впливу соціального хронічного стресу в процесі загоєння. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

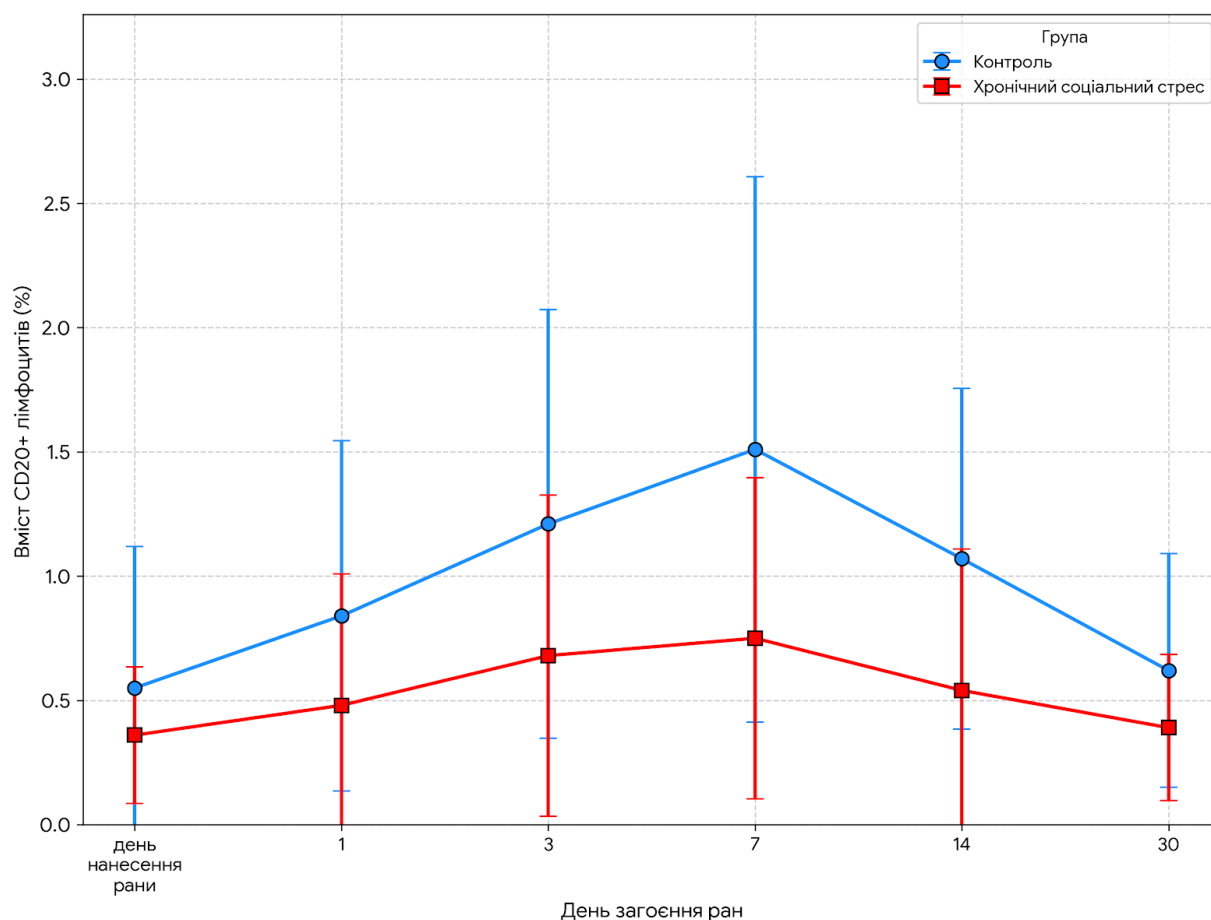
Примітки: \* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

\*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

## - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,01$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

## ДОДАТОК А13



**Рисунок А.13** - Динаміка інфільтрації CD20<sup>+</sup>- лімфоцитів крайової зони ран шкіри щурів після впливу соціального хронічного стресу в процесі загоєння. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

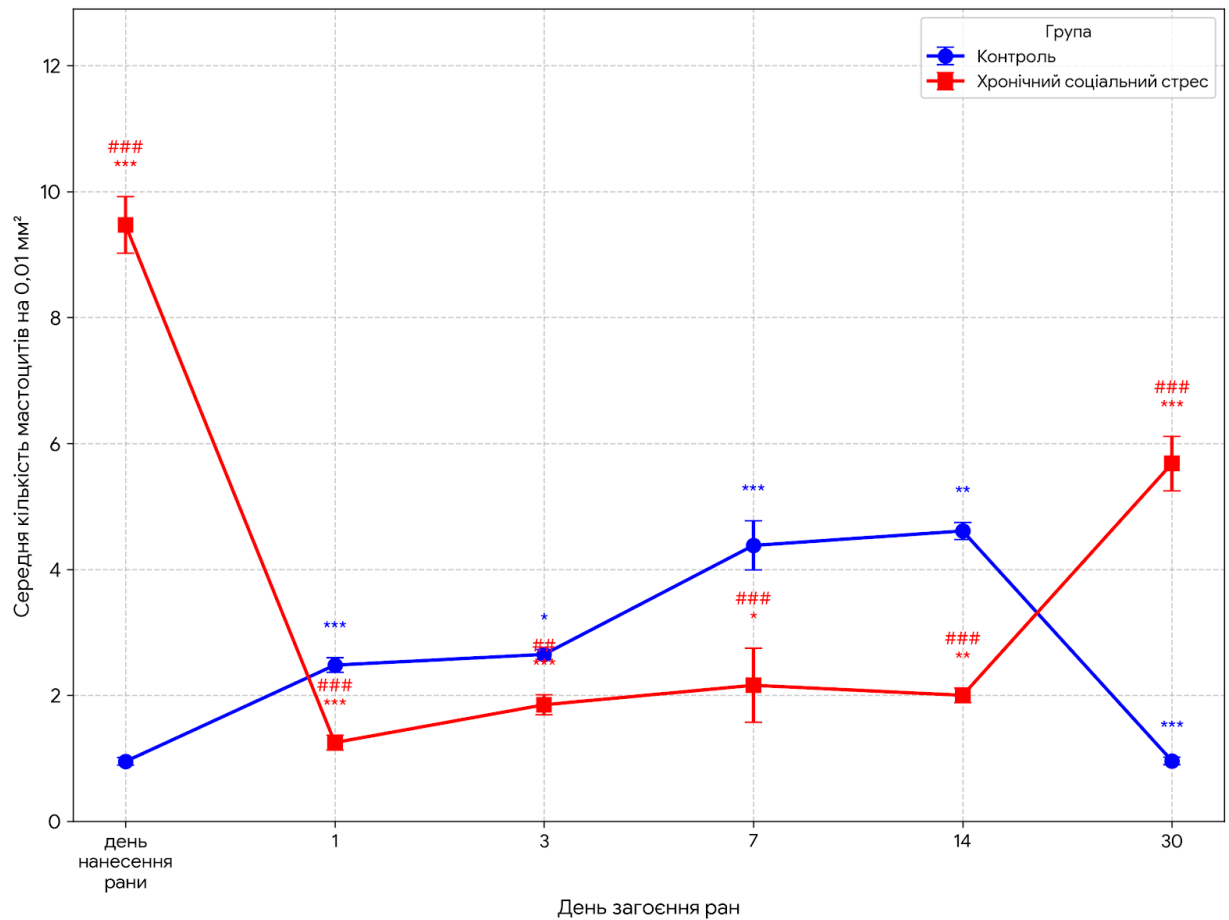
Примітки: \* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

## - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,01$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

## ДОДАТОК А14



**Рисунок А.14** - Динаміка інфільтрації мастоцитів крайової зони ран шкіри щурів після впливу соціального хронічного стресу в процесі загоєння. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

Примітки: \* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

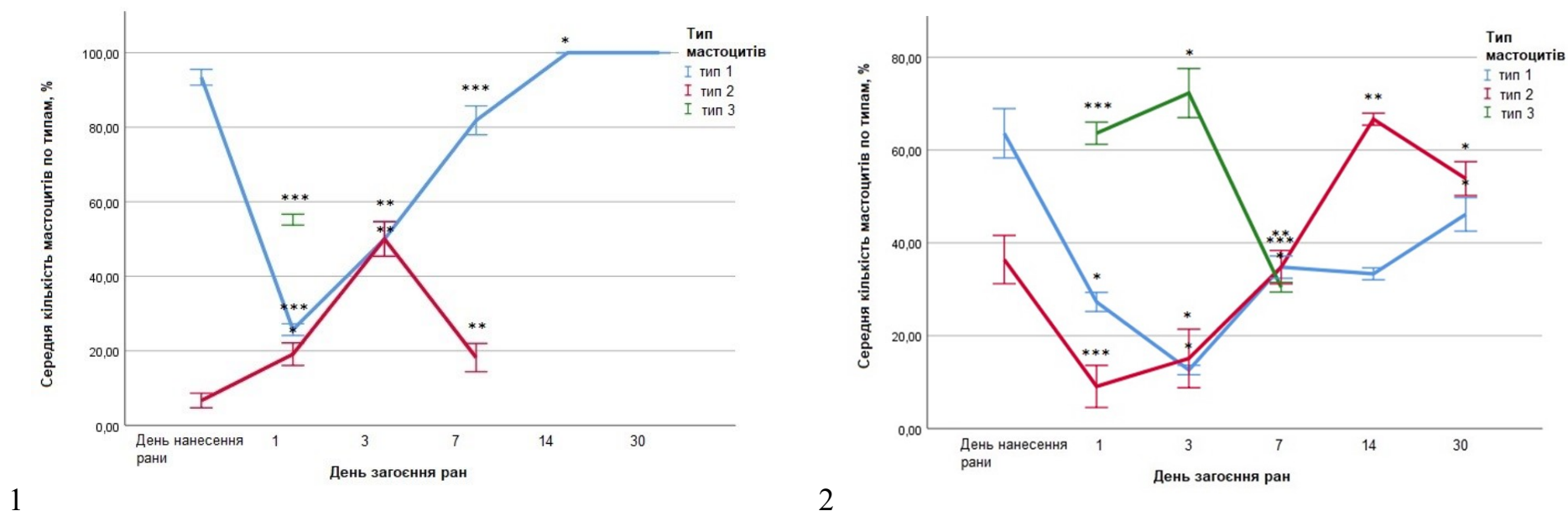
\*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

# - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ );

## - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,01$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

## ДОДАТОК А15



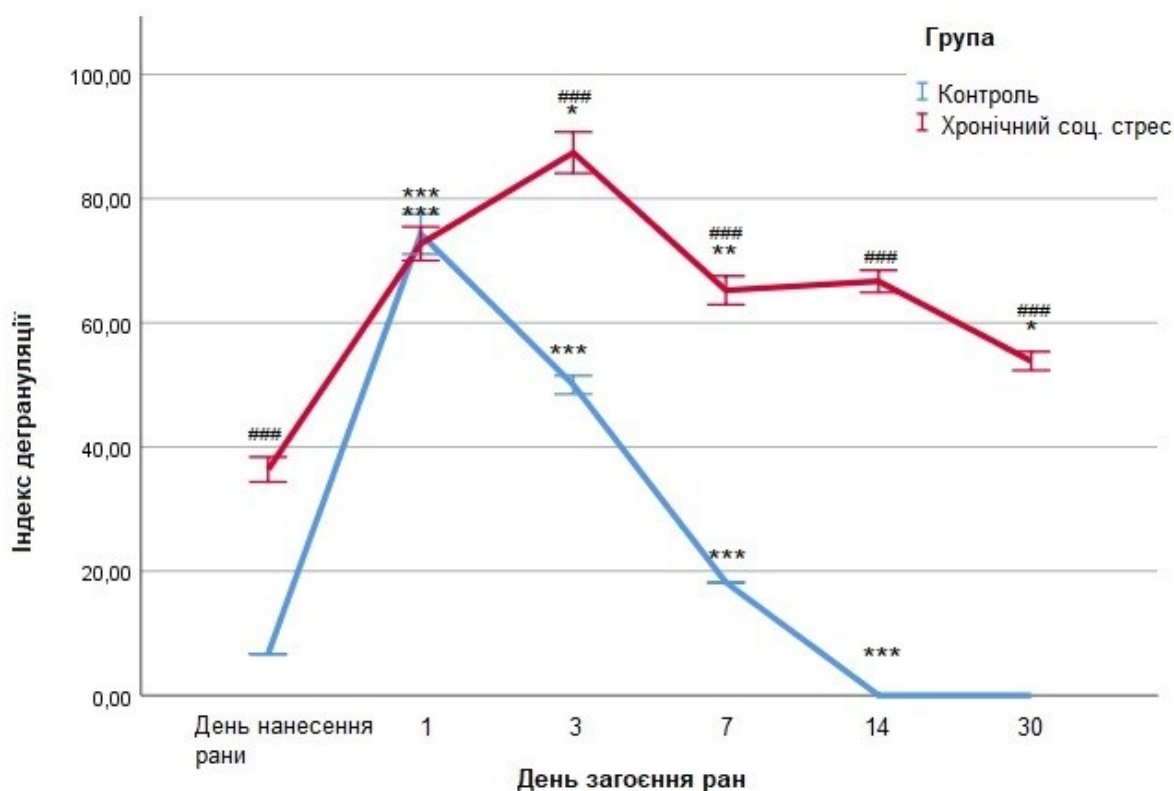
**Рисунок А.15** - Співвідношення типів мастоцитів (1, 2, 3) у шкірі щурів у процесі загоєння різаних ран в контрольній та експериментальній групах, %. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

Примітки: \* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

\*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ ).

## ДОДАТОК А16



**Рисунок А.16** - Динаміка індексу дегрануляції мастоцитів крайової зони ран шкіри щурів після впливу соціального хронічного стресу в процесі загоєння. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

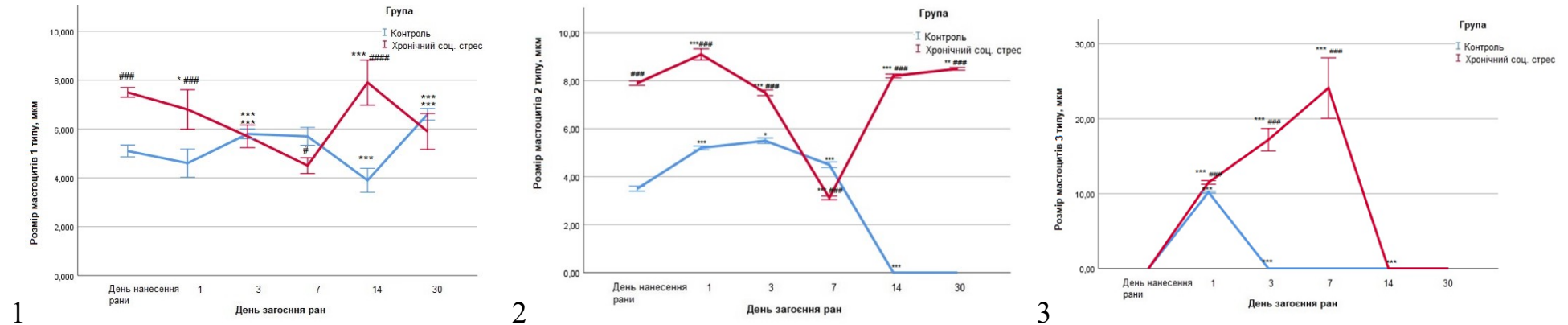
Примітки: \* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

\*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

## ДОДАТОК А17



**Рисунок А.17** - Динаміка розмірів мастоцитів 1 типу крайової зони ран шкіри щурів після впливу соціального хронічного стресу в процесі загоєння. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

Примітки: \* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

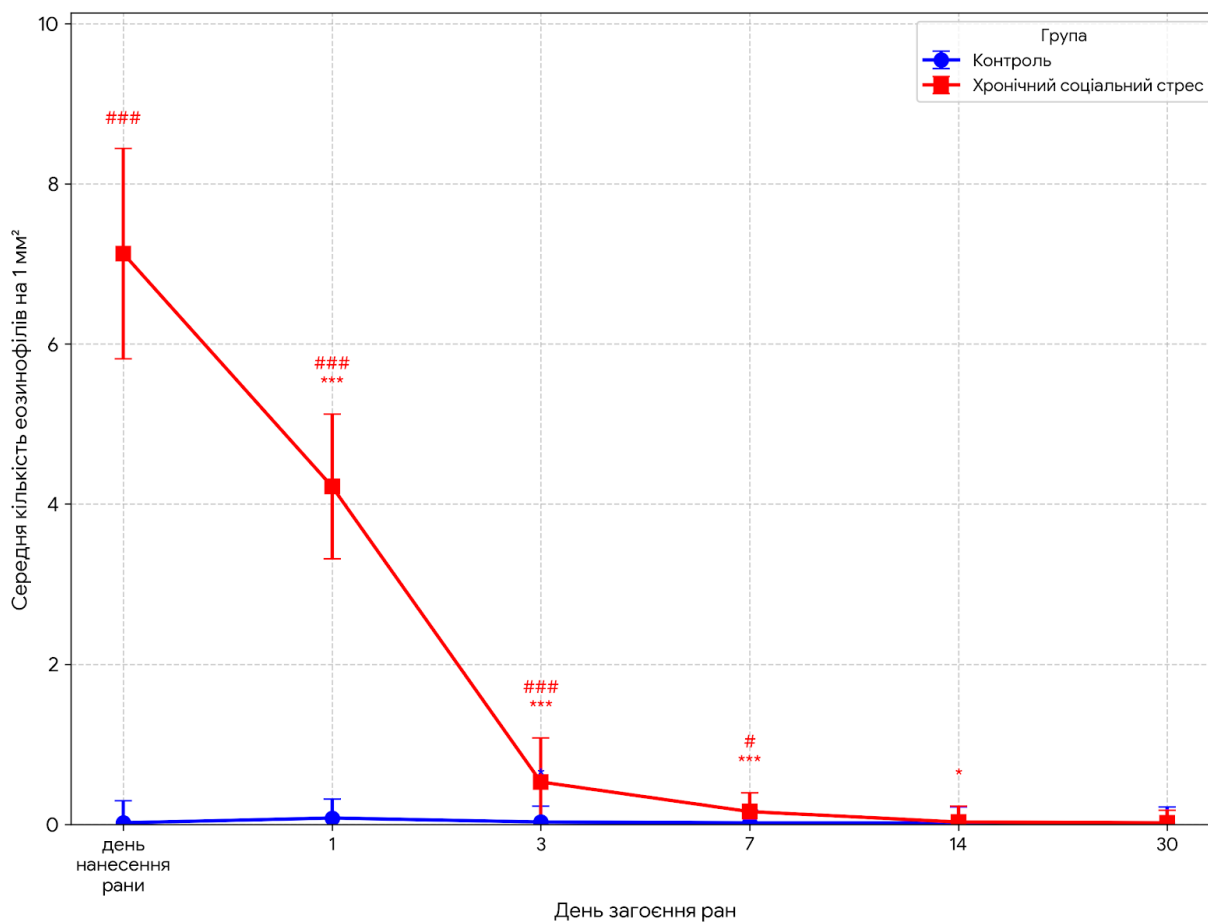
\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

\*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

# - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

## ДОДАТОК А18



**Рисунок А.18** - Динаміка інфільтрації еозинофілів крайової зони ран шкіри щурів після впливу соціального хронічного стресу в процесі загоєння. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

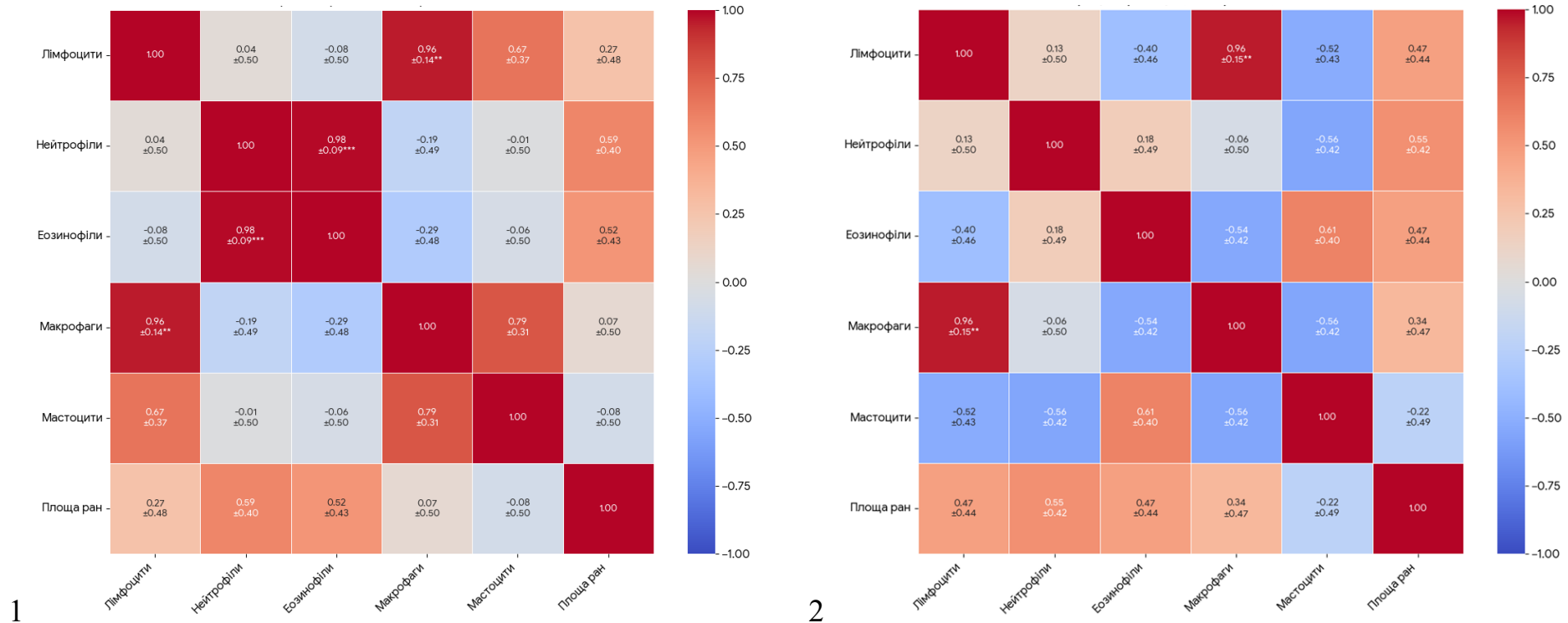
Примітки: \* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

\*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

# - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

## ДОДАТОК А19



**Рисунок А.19** - Матриця кореляцій типів ІКК та площі ран в загоєння ран в контрольній (1) та експериментальній (2) групах ( $r \pm m_r$ ).

## ДОДАТОК А20

Динаміка експресії маркерів апоптозу в різних шарах шкіри щурів у процесі загоєння різаної рани після впливу соціального хронічного стресу. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

Маркер	Розташування	Група	День загоєння ран %					
			До нанесення ран	1	3	7	14	30
Каспаза-3	дерма	контроль	0,30 ± 0,03	0,68 ± 0,05 ***	1,98 ± 0,20 ***	1,61 ± 0,14	0,71 ± 0,06 **	0,69 ± 0,06
		експеримент	8,28 ± 0,51 ###	8,72 ± 0,83 ###	9,95 ± 1,00 ###	5,83 ± 0,58 *** ###	3,12 ± 0,31 *** ###	3,11 ± 0,31 ###
	Волосяні фолікули	контроль	1,16 ± 0,12	0,15 ± 0,02	1,11 ± 0,11	0,45 ± 0,05***	0,73 ± 0,07*	1,09 ± 0,11*
		експеримент	0,79 ± 0,08 <sup>#</sup>	1,33 ± 0,13* <sup>#</sup>	2,93 ± 0,29*###	0,42 ± 0,04**	0,38 ± 0,04 <sup>##</sup>	0,96 ± 0,10**
	епідерміс	контроль	0,31 ± 0,03	0,40 ± 0,04	0,50 ± 0,05	0,57 ± 0,06	0,55 ± 0,06	0,30 ± 0,03 *
		експеримент	0,10 ± 0,01 <sup>#</sup>	0,51 ± 0,05	2,08 ± 0,21 ***###	1,49 ± 0,15 * ###	1,13 ± 0,11 <sup>##</sup>	0,33 ± 0,03
Каспаза-9	дерма	контроль	3,01 ± 0,19	6,44 ± 0,48 **	1,37 ± 0,12 ***	3,26 ± 0,29 ***	2,81 ± 0,22	1,3 ± 0,11 **
		експеримент	2,79 ± 0,14	2,29 ± 0,17 ###	0,97 ± 0,09 ***	2,51 ± 0,23 ***	3,10 ± 0,29	1,87 ± 0,16 **
	Волосяні фолікули	контроль	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,35 ± 0,03	0,63 ± 0,05 *	0,46 ± 0,03	0,35 ± 0,03

		експеримент	$0,17 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,03$ #	$0,29 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,02$ #	$0,18 \pm 0,02$ #	$0,25 \pm 0,03$
		експеримент	$0,02 \pm 0,01$ ###	$0,10 \pm 0,02$ **#	$0,46 \pm 0,04$ #	$0,13 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$
Vcl-2	епідерміс	експеримент	$0,17 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,03$ #	$0,29 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,02$ #	$0,18 \pm 0,02$ #	$0,25 \pm 0,03$
		експеримент	$0,02 \pm 0,01$ ###	$0,10 \pm 0,02$ **#	$0,46 \pm 0,04$ #	$0,13 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$
	дерма	експеримент	$2,90 \pm 0,33$	$1,99 \pm 0,23$	$3,42 \pm 0,41$ *	$2,81 \pm 0,32$	$1,70 \pm 0,13$ **	$0,48 \pm 0,05$ ***
		експеримент	$2,48 \pm 0,32$	$0,68 \pm 0,08$ ***###	$0,77 \pm 0,09$ ###	$1,10 \pm 0,12$ ##	$1,63 \pm 0,18$ *	$1,17 \pm 0,18$ ##
	Волосяні фолікули	експеримент	$0,97 \pm 0,07$	$1,25 \pm 0,15$	$0,49 \pm 0,05$ **	$0,54 \pm 0,07$	$0,23 \pm 0,03$ *	$0,45 \pm 0,03$
		експеримент	$0,46 \pm 0,03$ #	$0,63 \pm 0,07$ #	$0,33 \pm 0,05$ *	$0,27 \pm 0,04$ #	$0,24 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,03$
	епідерміс	експеримент	$2,73 \pm 0,21$	$4,02 \pm 0,46$ **	$2,11 \pm 0,24$ **	$1,50 \pm 0,17$ *	$0,91 \pm 0,09$ **	$1,04 \pm 0,12$
		експеримент	$2,27 \pm 0,19$	$3,22 \pm 0,35$ **	$1,03 \pm 0,10$ ***#	$1,20 \pm 0,13$	$1,36 \pm 0,14$ #	$1,41 \pm 0,15$ #

\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

\*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

# - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ );

## - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,01$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

## ДОДАТОК А21

Динаміка експресії маркерів ендогенної цитопротекції в різних шарах шкіри щурів у процесі загоєння різаної рани після впливу соціального хронічного стресу. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

Маркер	Розташування	Група	День загоєння ран %					
			До нанесення ран	1	3	7	14	30
SOX2	дерма	контроль	0,96 ± 0,07	1,66 ± 0,12***	0,92 ± 0,08***	0,94 ± 0,09	0,93 ± 0,09	0,95 ± 0,10
		експеримент	0,12 ± 0,02####	0,04 ± 0,01***####	н/в	н/в	н/в	н/в
	Волосяні фолікули	контроль	2,01 ± 0,18	0,52 ± 0,05***	0,35 ± 0,04	0,20 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,41 ± 0,05***
		експеримент	0,63 ± 0,06####	0,24 ± 0,02*	0,63 ± 0,07*	0,41 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,18 ± 0,02
	епідерміс	контроль	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,05 ± 0,01*	н/в	н/в
		експеримент	н/в	0,01 ± 0,01####	0,01 ± 0,01####	0,03 ± 0,01##	н/в	н/в
HIF-1α	дерма	контроль	7,10 ± 0,63	11,73 ± 1,22*	3,42 ± 0,36***	4,75 ± 0,51	6,25 ± 0,66*	7,02 ± 0,71
		експеримент	2,39 ± 0,25####	1,24 ± 0,13***####	0,17 ± 0,02***####	1,51 ± 0,17***####	3,28 ± 0,41* **###	5,22 ± 0,48
	Волосяні фолікули	контроль	0,18 ± 0,01	0,25 ± 0,03	0,66 ± 0,10*	0,39 ± 0,05*	0,25 ± 0,04	0,56 ± 0,07*

	експеримент	н/в	0,09 ± 0,02*###	0,10 ± 0,02###	0,14 ± 0,03##	0,29 ± 0,04	0,44 ± 0,06
епідерміс	контроль	0,28 ± 0,05	0,35 ± 0,08	0,25 ± 0,06	0,21 ± 0,05	0,19 ± 0,04	0,17 ± 0,04
	експеримент	0,21 ± 0,04	0,16 ± 0,03#	0,16 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,18 ± 0,04	0,22 ± 0,03

\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

\*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

# - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ );

## - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,01$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

н/в – дані не визначилися

## ДОДАТОК А22

Динаміка експресії транскрипційних факторів в різних шарах шкіри щурів у процесі загоєння різаної рани після впливу соціального хронічного стресу. Вказано середні значення та їх стандартні похибки.

Маркер	Розташування	Група	День загоєння ран %					
			До нанесення ран	1	3	7	14	30
PDGFR $\beta$	дерма	контроль	6,65 $\pm$ 0,51	8,10 $\pm$ 1,02*	12,19 $\pm$ 1,33**	4,61 $\pm$ 0,50***	2,55 $\pm$ 0,32***	0,44 $\pm$ 0,04***
		експеримент	2,63 $\pm$ 0,24###	3,36 $\pm$ 0,39*#####	1,83 $\pm$ 0,20*###	3,30 $\pm$ 0,37**####	6,27 $\pm$ 0,68*#####	3,75 $\pm$ 0,37*#####
	Волосяні фолікули	контроль	1,71 $\pm$ 0,16	1,00 $\pm$ 0,12***	0,30 $\pm$ 0,04***	0,18 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,02
		експеримент	0,16 $\pm$ 0,02###	0,22 $\pm$ 0,04*###	0,20 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,03###	0,19 $\pm$ 0,02
	епідерміс	контроль	0,55 $\pm$ 0,08	0,56 $\pm$ 0,07	0,27 $\pm$ 0,04*	0,20 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,02###
		експеримент	н/в	0,10 $\pm$ 0,02###	0,05 $\pm$ 0,01*###	н/в	н/в	н/в
CGRP	дерма	контроль	6,02 $\pm$ 0,57	2,18 $\pm$ 0,33***	0,66 $\pm$ 0,07***	3,16 $\pm$ 0,42***	5,04 $\pm$ 0,52**	4,36 $\pm$ 0,47
		експеримент	4,28 $\pm$ 0,48###	1,19 $\pm$ 0,22*#####	1,57 $\pm$ 0,17##	1,79 $\pm$ 0,19###	7,71 $\pm$ 0,83*#####	3,65 $\pm$ 0,44**
	Волосяні фолікули	контроль	0,93 $\pm$ 0,08	0,34 $\pm$ 0,05**	0,12 $\pm$ 0,02*	0,63 $\pm$ 0,08**	0,25 $\pm$ 0,04*	0,89 $\pm$ 0,09**

	епідерміс	експеримент	$0,20 \pm 0,02^{##}$	$0,63 \pm 0,07^{***}$	$0,13 \pm 0,02^{***}$	$0,24 \pm 0,03^{##}$	$0,17 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,02^{###}$
		контроль	$0,90 \pm 0,07$	$0,36 \pm 0,06^{***}$	$0,08 \pm 0,01^{***}$	$0,76 \pm 0,09^{***}$	$0,11 \pm 0,01^{***}$	$0,23 \pm 0,03^*$
		експеримент	$0,72 \pm 0,06$	$0,32 \pm 0,04^{**}$	$0,17 \pm 0,03^*$	$0,52 \pm 0,06^{***}$	$0,28 \pm 0,04^*$	$0,19 \pm 0,02$
LC3B	дерма	контроль	$6,70 \pm 0,59$	$8,19 \pm 0,96$	$3,44 \pm 0,37^{***}$	$5,02 \pm 0,63^{**}$	$0,50 \pm 0,06^{***}$	$0,18 \pm 0,02^{**}$
		експеримент	$7,21 \pm 0,68$	$1,12 \pm 0,17^{***###}$	$1,84 \pm 0,20^{###}$	$3,90 \pm 0,41^{***}$	$0,28 \pm 0,03^{***#}$	$0,93 \pm 0,88^{*##}$
	Волосяні фолікули	контроль	$0,28 \pm 0,03$	$1,04 \pm 0,15^{***}$	$0,42 \pm 0,06^{**}$	$0,31 \pm 0,05$	$0,38 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,02^*$
		експеримент	$0,22 \pm 0,03$	$1,33 \pm 0,18^{***}$	$0,21 \pm 0,04^{***#}$	$0,19 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,02^{\#}$	$0,20 \pm 0,03$
	епідерміс	контроль	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
		експеримент	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
p62	дерма	контроль	$4,25 \pm 0,39$	$6,80 \pm 0,75^*$	$4,63 \pm 0,52^*$	$7,70 \pm 0,83^{**}$	$4,32 \pm 0,49^{***}$	$2,10 \pm 0,27^{***}$
		експеримент	$2,83 \pm 0,30^{###}$	$2,22 \pm 0,29^{###}$	$2,40 \pm 0,31^{###}$	$4,11 \pm 0,48^{###}$	$6,80 \pm 0,75^{###}$	$7,50 \pm 0,83^{###}$
	Волосяні фолікули	контроль	$10,20 \pm 1,36$	$2,13 \pm 0,27^{***}$	$1,72 \pm 0,22$	$1,20 \pm 0,17$	$0,81 \pm 0,11$	$0,12 \pm 0,02^{**}$
		експеримент	$4,80 \pm 0,53^{###}$	$1,81 \pm 0,24^{***}$	$1,60 \pm 0,21$	$2,23 \pm 0,29^{\#}$	$1,92 \pm 0,27^{\#}$	$2,20 \pm 0,28^{###}$
	епідерміс	контроль	$0,13 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,06$	$0,40 \pm 0,06$
		експеримент	н/в	н/в	н/в	$0,10 \pm 0,02^{\#}$	$0,11 \pm 0,02^{\#}$	$0,30 \pm 0,04$

NRF2	дерма	контроль	4,02 ± 0,38	5,06 ± 0,54	4,07 ± 0,46	6,90 ± 0,73*	3,93 ± 0,42***	2,71 ± 0,29
		експеримент	2,50 ± 0,29###	2,08 ± 0,27###	2,01 ± 0,28###	2,18 ± 0,31###	4,35 ± 0,49**	3,57 ± 0,44
	Волосяні фолікули	контроль	2,13 ± 0,24	1,91 ± 0,25	1,22 ± 0,23	1,00 ± 0,16	1,10 ± 0,18	0,76 ± 0,10
		експеримент	1,50 ± 0,17#	1,04 ± 0,18	0,53 ± 0,06##	0,34 ± 0,04###	0,65 ± 0,08*	0,80 ± 0,10
	епідерміс	контроль	0,10 ± 0,04	0,17 ± 0,06	0,21 ± 0,05	0,24 ± 0,06	0,26 ± 0,08	0,18 ± 0,04
		експеримент	н/в	н/в	н/в	0,07 ± 0,02###	0,11 ± 0,03	0,14 ± 0,03

\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,05$ );

\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,01$ );

\*\*\* - зміни статистично значущі, порівняно з попереднім періодом загоєння рани ( $p \leq 0,001$ );

# - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ );

## - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,01$ );

### - зміни статистично значущі порівняно з контролем ( $p \leq 0,001$ )

н/в – дані не визначилися

## ДОДАТОК Б1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор з науково-педагогічної роботи  
ДНП «Львівський національний  
медичний університет імені Данила Галицького»  
к. біол. н., доцент Ірина СОЛОНИНКО

  
«05» лютого 2026 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Морфофункціональні особливості імункомпетентних клітин шкіри при загоєнні ран шурів після впливу хронічного соціального стресу.
2. **Установа-розробник:** Запорізький національний університет МОН України, кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини (69011, м. Запоріжжя, вул. Університетська, 66), Макеєва Людмила Валеріївна.
3. **Джерело інформації:**
  - 3.1 Makyeyeva L., Belenichev I., Aliyeva O., Frolov O., Petakh P., Kamyshnyi O. Impact of chronic social stress on molecular markers of skin regeneration during experimental excisional wounding // *Frontiers in Immunology*. – 2025. – Vol. 16. – Article 1656214. – DOI: 10.3389/fimmu.2025.1656214.
  - 3.2 Makyeyeva L., Frolov O., Aliyeva O. Functional changes in skin mast cells during surgical wound healing in rats after the influence of chronic social stress // *Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal*. – 2024. – Vol. 2. – P. 36-46. DOI: 10.32782/2522-9680-2024-2-36
  - 3.3 Makyeyeva L. V., Frolov O. K., Aliyeva O. G. Morphometric changes in rat periwound skin during healing of excisional wounds after exposure to chronic social stress // *Innov Biosyst Bioeng*. – 2025. – Vol. 9, № 1. – P. 13–25. DOI:10.20535/ibb.2025.9.1.310092.
  - 3.4 Makyeyeva L. V., Aliyeva O. G., Frolov O. K. Quantitative characteristics of mast cells in the course of wound healing in rats with chronic social stress // *Acta Biologica Ukrainica*. – 2021. – № 1. – P. 34–41.
4. **Де і коли впроваджено:** у освітньо-науковий процес кафедри гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри гістології, цитології та ембріології, протокол № 2 від «03» лютого 2026 року.
5. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:  
д. мед. н, доцент, завідувачка кафедри  
гістології, цитології та ембріології



Ліна ЧЕЛПАНОВА

## ДОДАТОК Б2



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи  
Дніпровський державний  
медичний університет  
д. мед. наук, професор  
Олександр Гудар'ян

«03» 02 2026 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Морфофункціональні особливості імунокомпетентних клітин шкіри при загоєнні ран шурів після впливу хронічного соціального стресу.
2. **Установа-розробник:** Запорізький національний університет МОН України, кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини (69011, м. Запоріжжя, вул. Університетська, 66), Макеєва Людмила Валеріївна.
3. **Джерело інформації:**
  - 3.1 Makyeyeva L., Belenichev I., Aliyeva O., Frolov O., Petakh P., Kamyshnyi O. Impact of chronic social stress on molecular markers of skin regeneration during experimental excisional wounding // *Frontiers in Immunology*. – 2025. – Vol. 16. – Article 1656214. – DOI: 10.3389/fimmu.2025.1656214.
  - 3.2 Makyeyeva L., Frolov O., Aliyeva O. Functional changes in skin mast cells during surgical wound healing in rats after the influence of chronic social stress // *Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal*. – 2024. – Vol. 2. – P. 36-46. DOI: 10.32782/2522-9680-2024-2-36
  - 3.3 Makyeyeva L. V., Frolov O. K., Aliyeva O. G. Morphometric changes in rat periwound skin during healing of excisional wounds after exposure to chronic social stress // *Innov Biosyst Bioeng*. – 2025. – Vol. 9, № 1. – P. 13–25. DOI:10.20535/ibb.2025.9.1.310092.
  - 3.4 Makyeyeva L. V., Aliyeva O. G., Frolov O. K. Quantitative characteristics of mast cells in the course of wound healing in rats with chronic social stress // *Acta Biologica Ukrainica*. – 2021. – № 1. – P. 34–41.
4. **Де і коли впроваджено:** у освітньо-науковий процес кафедри медичної біології, фармакогнозії та ботаніки Дніпровського державного медичного університету кафедри фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри медичної біології, фармакогнозії, ботаніки та гістології, протокол № 4 від «27» 01. 2026 року.
5. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

д. біол. н, професор,  
завідувач кафедри  
медичної біології,  
фармакогнозії, ботаніки та гістології

Віра ШАТОРНА

## ДОДАТОК БЗ



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи  
Запорізький державний  
медико-фармацевтичний університет  
д. мед. наук, професор  
Валерій Гуманський

«*10*» *лютого* 2026 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 4. Пропозиція для впровадження:** Морфологічно-функціональні особливості імунотропних клітин шкіри при загоєнні ран шурів після впливу хронічного соціального стресу.
- 5. Установа-розробник:** Запорізький національний університет МОН України, кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини (69011, м. Запоріжжя, вул. Університетська, 66), Макеєва Людмила Валеріївна.
- 6. Джерело інформації:**
- 3.1** Makyeyeva L., Belenichev I., Aliyeva O., Frolov O., Petakh P., Kamyshnyi O. Impact of chronic social stress on molecular markers of skin regeneration during experimental excisional wounding // *Frontiers in Immunology*. – 2025. – Vol. 16. – Article 1656214. – DOI: 10.3389/fimmu.2025.1656214.
- 3.2** Makyeyeva L., Frolov O., Aliyeva O. Functional changes in skin mast cells during surgical wound healing in rats after the influence of chronic social stress // *Fitoterapia. Chasopys – Phytotherapy. Journal*. – 2024. – Vol. 2. – P. 36-46. DOI: 10.32782/2522-9680-2024-2-36
- 3.3** Makyeyeva L. V., Frolov O. K., Aliyeva O. G. Morphometric changes in rat periwound skin during healing of excisional wounds after exposure to chronic social stress // *Innov Biosyst Bioeng*. – 2025. – Vol. 9, № 1. – P. 13–25. DOI:10.20535/ibb.2025.9.1.310092.
- 3.4** Makyeyeva L. V., Aliyeva O. G., Frolov O. K. Quantitative characteristics of mast cells in the course of wound healing in rats with chronic social stress // *Acta Biologica Ukrainica*. – 2021. – № 1. – P. 34–41.
- 4. Де і коли впроваджено:** у освітньо-науковий процес кафедри патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, протокол № від «*03*» *лютого* 2026 року..
- 5. Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:  
д. м. н., професор, завідувач кафедри  
патологічної фізіології з курсом  
нормальної фізіології

Ольга ГАНЧЕВА

## ДОДАТОК Б4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи  
Запорізький державний

медико-фармацевтичний університет

д. мед. наук, професор

Валерій Туманський

«16» шото 2026 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Морфофункціональні особливості імунокомпетентних клітин шкіри при загоєнні ран щурів після впливу хронічного соціального стресу.
2. **Установа-розробник:** Запорізький національний університет МОН України, кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини (69011, м. Запоріжжя, вул. Університетська, 66), Макеєва Людмила Валеріївна.
3. **Джерело інформації:**
  - 3.1 Makyeyeva L., Belenichev I., Aliyeva O., Frolov O., Petakh P., Kamyshnyi O. Impact of chronic social stress on molecular markers of skin regeneration during experimental excisional wounding // *Frontiers in Immunology*. – 2025. – Vol. 16. – Article 1656214. – DOI: 10.3389/fimmu.2025.1656214.
  - 3.2 Makyeyeva L., Frolov O., Aliyeva O. Functional changes in skin mast cells during surgical wound healing in rats after the influence of chronic social stress // *Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal*. – 2024. – Vol. 2. – P. 36-46. DOI: 10.32782/2522-9680-2024-2-36
  - 3.3 Makyeyeva L. V., Frolov O. K., Aliyeva O. G. Morphometric changes in rat periwound skin during healing of excisional wounds after exposure to chronic social stress // *Innov Biosyst Bioeng*. – 2025. – Vol. 9, № 1. – P. 13–25. DOI:10.20535/ibb.2025.9.1.310092.
  - 3.4 Makyeyeva L. V., Aliyeva O. G., Frolov O. K. Quantitative characteristics of mast cells in the course of wound healing in rats with chronic social stress // *Acta Biologica Ukrainica*. – 2021. – № 1. – P. 34–41.
4. **Де і коли впроваджено:** у освітньо-науковий процес кафедри анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії, протокол № від «03» шото 2026 року.
5. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

к. мед. н, доцент, в.о. завідувача кафедри  
анатомії людини, оперативної хірургії та  
топографічної анатомії

Максим ЩЕРБАКОВ

## ДОДАТОК Б5

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи  
Запорізький державний  
медико-фармацевтичний університет  
д. мед. наук, професор  
Валерій Туманський



«15» січня 2026 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 10. Пропозиція для впровадження:** Морфофункціональні особливості імункомпетентних клітин шкіри при загоєнні ран шурів після впливу хронічного соціального стресу.
- 11. Установа-розробник:** Запорізький національний університет МОН України, кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини (69011, м. Запоріжжя, вул. Університетська, 66), Макеєва Людмила Валеріївна.
- 12. Джерело інформації:**
- 3.1 Makyeyeva L., Belenichev I., Aliyeva O., Frolov O., Petakh P., Kamyshnyi O. Impact of chronic social stress on molecular markers of skin regeneration during experimental excisional wounding // *Frontiers in Immunology*. – 2025. – Vol. 16. – Article 1656214. – DOI: 10.3389/fimmu.2025.1656214.
- 3.2 Makyeyeva L., Frolov O., Aliyeva O. Functional changes in skin mast cells during surgical wound healing in rats after the influence of chronic social stress // *Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal*. – 2024. – Vol. 2. – P. 36-46. DOI: 10.32782/2522-9680-2024-2-36
- 3.3 Makyeyeva L. V., Frolov O. K., Aliyeva O. G. Morphometric changes in rat periwound skin during healing of excisional wounds after exposure to chronic social stress // *Innov Biosyst Bioeng*. – 2025. – Vol. 9, № 1. – P. 13–25. DOI:10.20535/ibb.2025.9.1.310092.
- 3.4 Makyeyeva L. V., Aliyeva O. G., Frolov O. K. Quantitative characteristics of mast cells in the course of wound healing in rats with chronic social stress // *Acta Biologica Ukrainica*. – 2021. – № 1. – P. 34–41.
- 4. Де і коли впроваджено:** у освітньо-науковий процес кафедри гістології, цитології та ембріології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри гістології, цитології та ембріології, протокол № 6 від «06» січня 2026 року.
- 5. Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:  
к. б. н, доцент, завідувач кафедри  
гістології, цитології та  
ембріології

Олена АЛІЄВА

## ДОДАТОК Б6

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**  
 Проректор з наукової роботи  
 Івано-Франківський національний медичний університет  
 д. мед. наук, професор  
 Наталія КОЗАНЬ  
 \_\_\_\_\_ 2026 р.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Морфологічні особливості імунотропних клітин шкіри при загоєнні ран щурів після впливу хронічного соціального стресу.
2. **Установа-розробник:** Запорізький національний університет МОН України, кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини (69011, м. Запоріжжя, вул. Університетська, 66), Макеєва Людмила Валеріївна.
3. **Джерело інформації:**
  - 3.1 Makyeyeva L., Belenichev I., Aliyeva O., Frolov O., Petakh P., Kamyshnyi O. Impact of chronic social stress on molecular markers of skin regeneration during experimental excisional wounding // *Frontiers in Immunology*. – 2025. – Vol. 16. – Article 1656214. – DOI: 10.3389/fimmu.2025.1656214.
  - 3.2 Makyeyeva L., Frolov O., Aliyeva O. Functional changes in skin mast cells during surgical wound healing in rats after the influence of chronic social stress // *Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal*. – 2024. – Vol. 2. – P. 36-46. DOI: 10.32782/2522-9680-2024-2-36
  - 3.3 Makyeyeva L. V., Frolov O. K., Aliyeva O. G. Morphometric changes in rat periwound skin during healing of excisional wounds after exposure to chronic social stress // *Innov Biosyst Bioeng*. – 2025. – Vol. 9, № 1. – P. 13–25. DOI:10.20535/ibb.2025.9.1.310092.
  - 3.4 Makyeyeva L. V., Aliyeva O. G., Frolov O. K. Quantitative characteristics of mast cells in the course of wound healing in rats with chronic social stress // *Acta Biologica Ukrainica*. – 2021. – № 1. – P. 34–41.
4. **Де і коли впроваджено:** у освітньо-науковий процес кафедри фармакології Івано-Франківського національного медичного університету. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології, протокол № 10 від «20» січня 2026 року.
5. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:  
 д. мед. н, професор, завідувач кафедри  
 фармакології

*Юрій Попович*

Юрій ПОПОВИЧ



ПІДПИС ЗАСВІДЧУЮ  
 ПРоректор (наказ) Івано-Франківського національного медичного університету  
 02 26  
*Мариамовська*

## ДОДАТОК Б7

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи  
Запорізький державний  
медико-фармацевтичний університет  
д. мед. наук, професор  
Валерій Туманський



2026 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

7. **Пропозиція для впровадження:** Морфофункціональні особливості імунокомпетентних клітин шкіри при загоєнні ран шурів після впливу хронічного соціального стресу.
8. **Установа-розробник:** Запорізький національний університет МОН України, кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини (69011, м. Запоріжжя, вул. Університетська, 66), Макеева Людмила Валеріївна.
9. **Джерело інформації:**
  - 3.1 Makyeyeva L., Belenichev I., Aliyeva O., Frolov O., Petakh P., Kamyshnyi O. Impact of chronic social stress on molecular markers of skin regeneration during experimental excisional wounding // *Frontiers in Immunology*. – 2025. – Vol. 16. – Article 1656214. – DOI: 10.3389/fimmu.2025.1656214.
  - 3.2 Makyeyeva L., Frolov O., Aliyeva O. Functional changes in skin mast cells during surgical wound healing in rats after the influence of chronic social stress // *Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal*. – 2024. – Vol. 2. – P. 36-46. DOI: 10.32782/2522-9680-2024-2-36
  - 3.3 Makyeyeva L. V., Frolov O. K., Aliyeva O. G. Morphometric changes in rat periwound skin during healing of excisional wounds after exposure to chronic social stress // *Innov Biosyst Bioeng*. – 2025. – Vol. 9, № 1. – P. 13–25. DOI:10.20535/ibb.2025.9.1.310092.
  - 3.4 Makyeyeva L. V., Aliyeva O. G., Frolov O. K. Quantitative characteristics of mast cells in the course of wound healing in rats with chronic social stress // *Acta Biologica Ukrainica*. – 2021. – № 1. – P. 34–41.
4. **Де і коли впроваджено:** у освітньо-науковий процес кафедри патологічної анатомії і судової медицини Запорізького державного медико-фармацевтичного університету. Обговорено та затверджено на засіданні кафедри патологічної анатомії і судової медицини, протокол № від «07» січня 2026 року.
5. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:  
д. м. н, професор, завідувач кафедри  
патологічної анатомії і  
судової медицини

Сергій ТЕРТИШНИЙ

## ДОДАТОК В

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Maquyeva L, Belenichev I, Aliyeva O, Frolov O, Petakh P, Kamyshnyi O. Impact of chronic social stress on molecular markers of skin regeneration during experimental excisional wounding. *Front Immunol.* 2025;16:1656214. doi:10.3389/fimmu.2025.1656214 Scopus Q1. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження).*

2. Maquyeva LV, Frolov OK, Aliyeva OG. Morphometric changes in rat periwound skin during healing of excisional wounds after exposure to chronic social stress. *Innov Biosyst Bioeng.* 2025;9(1):13–25. doi:10.20535/ibb.2025.9.1.310092 Scopus Q3. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження, обговорення результатів та підготовку тексту статті до друку).*

3. Maquyeva L, Frolov O, Aliyeva O. Functional changes in skin mast cells during surgical wound healing in rats after the influence of chronic social stress. *Fitoterapiia Chasopys.* 2024;(2):36–46. doi:10.32782/2522-9680-2024-2-36. Scopus Q4. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження, та підготовку тексту статті до друку).*

4. Maquyeva LV, Aliyeva OG, Frolov OK. Quantitative characteristics of mast cells in the course of wound healing in rats with chronic social stress. *Acta Biol Ukrainica.* 2021;(1):34–41. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження, обговорення результатів та підготовку тексту статті до друку).*

5. Maquyeva LV, Frolov OK, Aliyeva OG. Morphological changes in rat dermis after exposure to chronic social stress. *Теорія та практика сучасної*

морфології: матеріали VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю; 6–8 листоп. 2024; Дніпро: ДДМУ; 2024. 181 с.

6. Maquyeva L. Neuroimmune skin remodeling in response to chronic social stress in rats. In: Збірник тез Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми розвитку сучасної науки: виклики та перспективи»; 2025; Запоріжжя: ЗНУ; 2025. 604 с.

7. Maquyeva L, Frolov O. The impact of chronic social stress on the morphogenetic function of mast cells during skin wound healing in rats. Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century: Abstracts book of the V International Scientific Conference; 29–30 квіт. 2025; Kyiv; 2025. 97 p.

8. Maquyeva L. Chronic social stress drives neuroimmune alterations in rat skin via CGRP and mast cell dynamics. Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2025: збірник тез доповідей 85 Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю; 15–16 трав. 2025; Запоріжжя: ЗДМФУ; 2025. 358 с.

9. Maquyeva LV, Frolov OK, Aliyeva OG. Changes in the connective tissue component of the rat periwound skin area during healing. Сучасні проблеми біології, екології та хімії: матеріали VII Міжнародної науково-практичної конференції; 2024; Запоріжжя: СоруArt; 2024. 318 с.

10. Maquyeva L. Changes in the connective tissue component of the rat periwound skin area during healing after the influence of social chronic stress. Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2024: збірник тез доповідей 84 Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю; 23–24 трав. 2024; Запоріжжя: ЗДМФУ; 2024. 216 с.

11. Maquyeva LV. Amount of mast cells as a prognostic marker of wound healing outcome. Молода наука-2023: збірник наукових праць студентів, аспірантів, докторантів і молодих вчених; 2023; Запоріжжя: ЗНУ; 2023. Т. 3. 399 с.

12. Makyeyeva L, Frolov O, Aliyeva O. The role of mast cells in the healing of skin wounds in rats after the influence of chronic social stress. *Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century: Abstracts book of the IV International Scientific Conference*; 22–23 верес. 2022; Київ; 2022. p. 14.

13. Makyeyeva LV. Shifts in morphofunctional characteristics of mast cells in the skin of rats during wound healing after the influence of chronic social stress. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2022: збірник тез доповідей науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів*; 17 трав. 2022; Запоріжжя: ЗДМУ; 2022. С. 77.

14. Makyeyeva LV, Frolov OK, Aliyeva OG, Gromokovska TS. Morphological changes in the skin epithelium of rats during inflammatory stage of wound healing under the influence of chronic social stress. *Теорія та практика сучасної морфології: матеріали V Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю*; 20–22 жовт. 2021; Дніпро: ДДМУ; 2021. 181 с.

## ДОДАТОК Г

### ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Maquyeva LV, Frolov OK, Aliyeva OG. Morphological changes in rat dermis after exposure to chronic social stress. Теорія та практика сучасної морфології: матеріали VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю; 6–8 листоп. 2024; Дніпро: ДДМУ; 2024. 181 с.

2. Maquyeva L. Neuroimmune skin remodeling in response to chronic social stress in rats. In: Збірник тез Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми розвитку сучасної науки: виклики та перспективи»; 2025; Запоріжжя: ЗНУ; 2025. 604 с.

3. Maquyeva L, Frolov O. The impact of chronic social stress on the morphogenetic function of mast cells during skin wound healing in rats. Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century: Abstracts book of the V International Scientific Conference; 29–30 квіт. 2025; Kyiv; 2025. 97 p.

4. Maquyeva L. Chronic social stress drives neuroimmune alterations in rat skin via CGRP and mast cell dynamics. Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2025: збірник тез доповідей 85 Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю; 15–16 трав. 2025; Запоріжжя: ЗДМФУ; 2025. 358 с.

5. Maquyeva LV, Frolov OK, Aliyeva OG. Changes in the connective tissue component of the rat periwound skin area during healing. Сучасні проблеми біології, екології та хімії: матеріали VII Міжнародної науково-практичної конференції; 2024; Запоріжжя: СоруArt; 2024. 318 с.

6. Maquyeva L. Changes in the connective tissue component of the rat periwound skin area during healing after the influence of social chronic stress.

Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2024: збірник тез доповідей 84 Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю; 23–24 трав. 2024; Запоріжжя: ЗДМФУ; 2024. 216 с.

7. Maquyeva LV. Amount of mast cells as a prognostic marker of wound healing outcome. Молода наука-2023: збірник наукових праць студентів, аспірантів, докторантів і молодих вчених; 2023; Запоріжжя: ЗНУ; 2023. Т. 3. 399 с.

8. Maquyeva L, Frolov O, Aliyeva O. The role of mast cells in the healing of skin wounds in rats after the influence of chronic social stress. Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century: Abstracts book of the IV International Scientific Conference; 22–23 верес. 2022; Київ; 2022. p. 14.

9. Maquyeva LV. Shifts in morphofunctional characteristics of mast cells in the skin of rats during wound healing after the influence of chronic social stress. Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2022: збірник тез доповідей науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів; 17 трав. 2022; Запоріжжя: ЗДМУ; 2022. С. 77.

10. Maquyeva LV, Frolov OK, Aliyeva OG, Gromokovska TS. Morphological changes in the skin epithelium of rats during inflammatory stage of wound healing under the influence of chronic social stress. Теорія та практика сучасної морфології: матеріали V Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю; 20–22 жовт. 2021; Дніпро: ДДМУ; 2021. 181 с.