

ЖИВОТИНСКИ МОДЕЛИ НА ЗАЗДРАВЯВАНЕ НА КОЖНИ РАНИ - ПРЕДИМСТВА И НЕДОСТАТЪЦИ

Минка Христова

Катедра „Физиология и патофизиология“, Факултет по медицина,
Медицински университет – Варна

ANIMAL MODELS OF SKIN WOUND HEALING – ADVANTAGES AND DISADVANTAGES

Minka Hristova

Department of Physiology and Pathophysiology, Faculty of Medicine,
Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Кожните рани представляват повърхностна или дълбока деструкция на кожата, които възникват в резултат на разнообразни външни въздействия или при хирургични интервенции. Непосредствено след увреждането стартират редица патофизиологични процеси, насочени към възстановяване целостта на тъканите. Зарастването им е процес, включващ взаимосвързани и припокриващи се етапи на хемостаза, възпаление, пролиферация и тъканно ремоделиране. Участват също множество клетъчни популации, екстрацелуларният матрикс и разтворими медиатори. Отклоненията в протичането на оздравителния процес са последица от системно заболяване и могат да доведат до сериозни усложнения при индивида. Независимо от напредъка на медицината зарастването на раните все още е сериозно клинично предизвикателство, което налага тяхното правилно и ефективно лечение. Освен усъвършенстване на традиционните грижи за кожните рани необходимо е разработването и на нови терапевтични подходи. Експерименталните модели са много полезен инструмент при проучването на различни заболявания. През последните десетилетия са разработени различни модели на кожно нараняване, които увеличават знанията ни за процесите на тъканно възстановяване и допринасят за разработване на нови клинично значими терапевтични стратегии. В този преглед обобщено са представени процесите на зарастване на кожните рани и са разгледани най-често използваните модели с животни. Подробно са анализирани различията в оздравителния процес и *in vivo* моделите на кожни рани.

ABSTRACT

Skin wounds represent superficial or deep destructions of the skin, which occur as a result of various external influences or surgical interventions. Immediately after the injury, a series of pathophysiological processes begin, aimed at restoring tissue integrity. Wound healing is a process involving interconnected and overlapping stages of hemostasis, inflammation, proliferation, and tissue remodeling. Numerous cellular populations, the extracellular matrix, and soluble mediators are also involved. Abnormalities in the healing process can result from systemic diseases and may lead to serious complications for the individual. Despite medical advancements, wound healing remains a significant clinical challenge, necessitating proper and effective treatment. In addition to improving traditional wound care, it is essential to develop new therapeutic approaches. Experimental models are a very useful tool for studying various diseases. Over the past decades, different skin injury models have been developed, which increase our knowledge of tissue recovery processes and contribute to the development of new clinically relevant therapeutic strategies. This review summarizes the processes of skin wound healing and discusses the most commonly used animal models. Differences in the healing process and in the *in vivo* skin wound models are analyzed in detail.

Keywords: skin wounds, wound healing, *in vivo* models, mouse, rat, rabbit, pig

Ключови думи: кожни рани, заздравяване на рани, *in vivo* модели, мишка, плъх, заек, прасе

ВЪВЕДЕНИЕ

Кожните рани представляват тъканна деструкция на нормалната анатомична структура с последваща загуба на функция (59). Факторите, предизвикващи наранявания, са разнообразни и по произход те са механични, термични, химични, както и други като електричество, светлина и радиоактивни субстанции (17). Кожните рани могат да се класифицират в зависимост от етиологичния фактор, анатомичното местоположение, продължителност на оздравителния процес (остър или хроничен), начина на зарастване на раната (първично или вторично) и според потенциалния риск от инфекция (17,76). Според дълбочината на увреда (17) нараняването може да варира от обикновено нарушаване на покривния епител на кожата до дълбока увреда, достигаща до дермата или разширяваща се още по-дълбоко в подкожната тъкан със засягане и на други структури като сухожилия, мускули, съдове, нерви, паренхимни органи и дори кости (78). Нараняванията са външни (открити) или вътрешни (закрити), при които има увреда или разкъсвания на вътрешни органи и тъкани, но целостта на кожата е запазена.

С увреждане целостта на кожата бариерната ѝ функция се нарушава и в резултат намалява защитата на целия организъм (76). Всяко нараняване индуцира закономерен клетъчен и тъканен отговор на организма, като се активират защитни процеси, целящи възстановяване на тъканните дефекти.

Зарастване на раните

Зарастването на рани е комплексен и динамичен процес, който включва (76) четири задължително присъстващи и последователно протичащи фази на хемостаза, възпаление, клетъчна пролиферация и ремоделиране. В него активно се включват редица специализирани клетки (60) и действат биологично активни вещества, които медиират клетъчния отговор, междуклетъчните взаимодействия и взаимодействието с екстрацелуларния матрикс (67). Протичащите процеси са строго регулирани, като съществува баланс между хемостатичната и фибринолитичната система (56), провъзпалителните и противовъзпалителните цитокини, протеазите и протеазните инхибитори, растежните фактори и техните рецеп-

тори (60,67), реактивните форми на кислорода и антиоксидантната защита (80).

Първата фаза от нормалното заздравяване включва вазоконстрикция, активиране на тромбоцитите и системата на коагулация. Образованият съсирек ограничава кръвозагубата, предпазва раната от инфекция и служи като временен екстрацелуларен матрикс (70,80).

През втората фаза се включва възпалението, в което активно участват местните и привлечените от кръвната циркулация възпалителни клетки на вродената и адаптивната имунна система (19). Активираните неутрофили, а впоследствие и макрофагите от M1 фенотип разпознават и унищожават попадналите патогени. Освободените в микросредата цитокини привличат към мястото на увреда Th1 лимфоцитите, които играят важна роля във възпалителната реакция. Th1 лимфоцитите синтезират провъзпалителни цитокини, като IL-2 и IFN- γ , стимулират диференциацията на макрофагите в M1 фенотип и поддържат възпалителния процес. M1 макрофагите освобождават цитокини, които стимулират инфилтрация на Th1 лимфоцити в мястото на увреда. Със стихване на възпалителния процес макрофагите от M1 фенотип се трансформират в макрофаги от M2 фенотип, чийто цитокинов профил медира следващите етапи на зарастването. В допълнение активността на Th1 намалява и започва репаративен отговор, медиран от Th2 лимфоцити (80).

Ендотелните клетки, кератиноцитите, фибробластите и миофибробластите се включват във фазата на пролиферация и ремоделиране на тъканите (70).

По време на пролиферативната фаза временната фибринова мрежа се заменя с нова матрица от колагенови влакна, протеогликани и фибронектин. Протичат процеси на неоангиогенеза, образуват се нови капиляри, настъпва епителизация на раната и се образува грануляционна тъкан, която има преходен характер в нормалната дерма (67).

Ремоделирането е последната фаза на оздравителния процес, при която грануляционната тъкан съзрява и се образува цикатрикс. Съзряването на грануляционната тъкан включва редуциране броя на капилярите, на количеството на гликозаминогликаните и протеогликани-те. Клетъчната плътност и метаболитната актив-

ност също намаляват. Променя се количеството и организацията на колагена, като първоначално синтезираният колаген тип III се заменя с колаген тип I. Ремоделирането на протеините на извънклетъчния матрикс става чрез действията на протеолитични ензими, продуцирани от клетки в дъното на раната по време на процеса на оздравяване (67).

Образуваният цикатрикс е по-груб и по-здрав, функционално различен от нормалната кожа (82), но изолира организма от вредните въздействия на външната среда (60). Зарастването на рани, иницирано от тъканното увреждане, е биологично целесъобразен процес, който поддържа нормалната структурна и функционална цялост на кожата (65). При нормалното възстановяване на тъканите съществува функционален баланс между образуването и ремоделирането на цикатрикса, което е физиологичният отговор след нараняване при повечето хора. Патологичните отклонения на нормалната възстановителна реакция се изразяват в прекомерното разрастване на съединителна тъкан с променена структура и загуба на функция или забавено зарастване. При свръх образуване на съединителна тъкан се развиват процеси на фиброза, стриктури, сраствания, келоиди, хипертрофични цикатрикси и контрактури. Намаленото формиране на съединителна тъкан води до хронични незаздравяващи рани (язви) и дехисценция на оперативни рани (67).

Характеристика на острите и хроничните рани

В зависимост от продължителността на зарастване раните клинично се категоризират като остри и хронични (78). Различават се по протичащите патогенетични механизми, начина им лечение, по структурните и функционалните последици (12).

Острите рани заздравяват по точно определен и много ефикасен начин. При острите рани фазите на заздравяване настъпват последователно, протичат нормално и показват признаци на заздравяване в рамките от 2 до 4 седмици (52).

Хронифициране на острите язви настъпва при съпътстващи заболявания и при нарушаване на нормалните етапи на оздравителния процес (78). Всички рани могат да станат хронични. В зависимост от етиологичният фактор хроничните кожни рани се класифицират в четири категории: артериални, диабетни, язви от натиск и венозни язви. Тези категории имат характерен външен вид, локализация и дълбочина на дефекта (12). Независимо от различната етиология

при хроничните рани липсва последователност в процеса на заздравяване (те често се „задържат“ на една фаза) и не настъпва анатомично и функционално възстановяване в рамките на 4 седмици (52). При някои хронични рани оздравителният процес отнема десетилетия (12).

Предпоставка за забавено зарастване на раневия дефект са недостатъчната ангиогенеза, което води до допълнително увреждане на тъканите поради хронична хипоксия и нарушено доставяне на микроелементи (52). При хроничните рани са установени прекомерни високи нива на провъзпалителни цитокини, персистиращи инфекции, образуване на устойчиви на лекарства микробни биофилми и стареещи клетки, които не реагират на репаративни стимули (12).

Лечението на рани - предизвикателство за съвременната медицина

Заздравяването на рани при гръбначните животни е физиологичен процес за поддържане на нормалната хомеостаза на организма и в този процес участват фино регулирани взаимодействия между различни видове клетки и молекули. Дисбалансът между тези взаимодействия може да доведе до поява на отклонения в механизмите на оздравителния процес и до влошаване на зарастването на рани (38).

Грижата за кожните рани играе все по-важна роля в медицинската практика поради увеличаване на случаите на хронични рани, което се дължи на нарастване на честотата на заболявания като диабет, съдови заболявания, хипертония и хронично бъбречно заболяване (2). Други фактори, имащи отношение към хроничните рани, са застаряващото население, затлъстяването и проблемът с инфекциите в световен мащаб (68).

Неблагоприятното въздействие на хроничните рани е проблем на целия свят (68). Според Световната здравна организация милиони хора страдат от незарастващи рани и имат нужда от медицинска грижа (38). Предвижда се до 2027 г. необходимите средства за подобряване на грижите за тези болни да достигнат до 18,7 милиарда долара (68).

Съвременните методи на лечение на кожните наранявания включват хирургични интервенции, нехирургични терапии и фармакологични средства, но въпреки голямото разнообразие от терапевтични процедури те невинаги са достатъчно ефективни. По-доброто познаване на механизмите на оздравителния процес, факторите, които влияят на този процес, както и отчитайки ефективността на досегашните терапии, всички те могат да осигурят добра основа за разработ-

ването на нови лекарства и технологии за лечение на кожни рани (38). В дългосрочен план това може да подобри лечението, както и да намали разходите за него (17).

***In vivo* модели в биомедицинските изследвания**

Използването на животински модели в научните експерименти съществува отдавна. Първите сведения за употребата на животни като модели на изследване датира от 500 г. преди новата ера в древна Гърция. Много дълго време опитите с животни са били стандартна практика за изучаване на различни процеси в областта на медицината и биологията. Решителна стъпка за създаване на международно законодателство, ориентирано към експерименталната работа, е направена през 1992 г. след публикуването на специално издание на „Принципи на хуманните експериментални техники“. В него е посочен основният принцип за експериментите с животни, известен като принципа на 3-те R - замяна, намаляване и усъвършенстване (replacement, reduction, refinement). Този документ се превърна в основа за изграждане на съвременните регулаторни политики за използване на животни в експерименти (66).

Животинските модели значително подобриха нашето разбиране за причините и развитието на много заболявания сред хората и се оказаха полезен инструмент за откриване на нови лекарствени средства и развитие на терапевтични стратегии. Те позволиха да се идентифицират регулаторни процеси, сигнални пътища и сложни взаимодействия както на системно, така и на клетъчно и субклетъчно ниво, и разкриха закономерности в хода на различни заболявания при хората (1).

Независимо от многобройните експериментални изследвания и придобития опит, в днешно време все още е необходим внимателен подбор на животинския вид, който е най-подходящ за изследване при конкретното заболяване и който може да даде най-добра информация за протичащите промени (28).

***Избор на in vivo* модел на рана**

Изследванията върху процесите на заздравяване на рани са сложни главно поради многообразието на средата на раната и сложността на оздравителния процес. При избора на подходящ модел на рана най-важно е да се прецени доколко той точно отразява биологичните процеси, протичащи при нормалното заздравяване при хора (24).

Съществуват различни животински модели, които могат да се използват за проучване на остри или хронични увреждания като например рани, свързани с храненето, захарния диабет и състояния на хипоксия. Те могат да бъдат предизвикани чрез много различни техники, като хирургичните рани са най-често прилаганите. След определяне на проучвателният модел изследователите трябва да изберат подходящи и възпроизводими методи, които ще позволят проследяване на прогресията на раната във времето (50).

Освен проследяване на процеса на заздравяване тези модели могат да се комбинират и с други състояния, позволяващи да се разберат механизмите на отклонения при зарастването на клетъчно, цитокиново и тъканно ниво. Двата модела могат да се използват съвместно за оценка на ефектите при конкретно коморбидно състояние, срещано в клиничната практика (21). Разработени са проучвания на раневи процеси с допълнителни вредни въздействия като тютюнопушене (5,26), белодробни инфекции (22), сепсис (72) или имунен дефицит (34,42), които променят хода на зарастването.

Захарният диабет (ЗД) и суперпонирането на бактериална инфекция са сред най-често проучваните коморбидни състояния при зарастването на рани. Съществуват различни модели, проследяващи промените в наранените тъкани, свързани усложненията на ЗД. ЗД тип 1 се индуцира от стрептозотозин и/или алоксан и при модел на диабетна мишка без затлъстяване. ЗД тип 2 се предизвиква посредством включване на диетата с високо съдържание на мазнини, използване на животни с мутации на лептина и лептиновите рецептори или полигенни модели на New Zealand обезни мишки (9,20). Съобщените модели на външни травматични инфекции на рани варират в зависимост от използваните животински видове, щамовете на микроорганизмите, броя на приложените микроорганизми и размера на раните (23). Те са ефективен инструмент за изследване на последиците от бактериалното контаминиране на раните (42), ефекта на нови антибактериални средства и антибиотичната резистентност (79).

При всяка разработка експериментаторът трябва да обърне внимание на няколко факта като цена, достъпност, лекота на работа и сходство с хората (36). В допълнение наличието на предишни проучвания с конкретен животински вид има важно информативно значение при избора на модел (28).

Физиологични различия между човека и животните

Изборът на *in vivo* модел зависи от междувидовите различия между човека и животните. Те са определящи за размера на генерираната рана, като степента на увреждане зависи от тънкостта на кожата, фоликулния модел и цикъла на растеж на окосмяването при животното спрямо тази при човека (36).

Модели на кожни рани при мишки

Мишките са едни от най-използваните животни при различните проучвания, включително и при зарастване на рани. Предимствата на тези експериментални модели спрямо другите са свързани най-вече с размера на животните, те са малки и се отглеждат лесно (1). Използват се различни видове експериментални мишки: трансгенни, нокаутирани или генно-индуцируеми линии. Разнообразните и задълбочени изследвания са довели до разработването на специфични за вида реактиви, приложени са различни морфологични методи за оценка на хистологичните промени в това число на имунохистохимия и поточна цитометрия. Дългогодишните проучвания са довели до натрупване на значителни познания относно процеса на заздравяването на кожни рани (36).

Независимо че моделът при мишки има редица предимства, основният му недостатък е неспособността му да наподобява напълно процеса на заздравяване на рани при хора (1). Кожата при мишките структурно се различава от човешката кожа. Тя е тънка и трудно се предизвикват повърхностни рани (36). Притежава обширен подкожен напречнонабразден мускулен слой, наречен *panniculus carnosus*, който липсва при хората (36). Зарастването на рани при мишки настъпва бързо поради мускулната контракция. За разлика от мишките при хората се наблюдава повторна епителизация и формиране на грануляционна тъкан. Друга съществена разлика е, че при мишките не се образуват хипертрофични цикатрикси и келоиди (1). Друга причина за бързата регенерация на кожата на мишките е гъстата козина, в космените фоликули на която има голям брой прогениторни клетки (1,65).

Установени са и междувидови различия както при вродения, така и в адаптивния имунитет, които са свързани с Toll-like рецептори, индуцируемата синтаза на азотен оксид, цитокини и цитокинови рецептори, диференциация на Т-хелперите и др. При мишките липсват хемокини, които са важни за интеграция на възпалителните промени и репаративните процеси при епи-

телизация, ангиогенеза и ремоделиране на тъканите (65). Известно е, че неутрофилите при мишките не експресират дефензини (1).

Описаните модели на кожни рани при мишки са достатъчно информативни за разбиране на нормалните оздравителни процеси. Независимо от различията в процеса на възстановяване на кожата мишият модел има предимства при проучване на механични травми. Моделите и наблюденията при мишки могат да се транслират към други по-сложни животински модели, които по-точно имитират заздравяването на човешката кожа, като например експериментални модели при свине (21).

Модели на кожни рани при плъхове

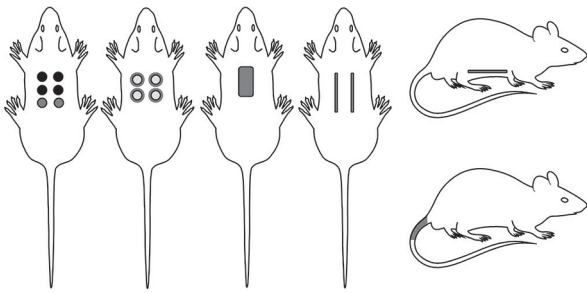
Плъховете са другите представители сред малките животни, чест обект на експерименталната медицина. Sprague Dawley и Wistar са най-често използваните породи (24).

Подобно на хората кожата на плъхове се състои от основните слоеве като епидермис и дерма, но морфологично няма пълно съответствие със структурата на човешката кожа. Плъховете се отнасят към „животните с отпусната кожа“, главно поради нейната еластичност и липсата на силно прикрепване към подлежащите структури в сравнение с хората. Това свойство на кожата играе значителна роля в зарастването на рани (1). Подобно на мишките те притежават *panniculus carnosus* (65), затова зарастването при тях става предимно чрез контракция, като повторната епителизация и грануляционната тъкан имат минимално значение (36).

За разлика от хората в кожата на плъха присъства ензимът L-глюконолактон, който превръща L-глюконогамалактона във витамин С, който играе важна роля в синтеза на колаген и от значение при заздравяването на рани (1). Плъховете са генетично по-устойчиви и съществуват много по-малко реактиви, специфични за вида, в сравнение с мишките (36).

Предимствата на моделите с плъхове са подобни на тези с мишките: сравнително лесни и евтини за отглеждане, лесни за третиране и съществува огромна база от натрупани знания. По-голямата телесна площ при плъховете в сравнение с мишките позволява получаване на сравнително големи по площ и повече на брой рани при едно и също животно (36). Предимство на този модел е, че нивото на стрес при контакт с човек е сравнително ниско. Недостатъците при използването на плъхове за модели на рани не се различават от тези при мишки (65). Обобще-

на схема на експериментални модели за генериране на рани при гризачи е представена на фиг. 1.



Фиг. 1. Схематично представяне на експериментални модели за генериране на рани при гризачи. Експерименталните модели са по данни на Yang Y et al. (2023), Grada A et al. (2018), Falanga V et al. (2004), Opalenik SR et al. (2005), Stamm J et al. (2000), Sotirova Y et al. (2024), Lou D et al. (2020), Carlson MA and Chakkalakal D (2011)

Модели на кожни рани при заек

Заекът е често използвано лабораторно животно. Въпреки че има 76 различни породи зайци, признати от британския съвет за зайци, само белият новозеландски заек (NZW) е обект на изследователско внимание (65).

Заешката и човешката кожа реагират по подобен начин на стареене, забавено заздравяване и на различни локални лекарства, което прави заека подходящ за тестване на потенциални терапевтични средства (36). Предимство на заешките модели е, че са сравнително евтини, с по-ниски разходи при отглеждане спрямо другите големи животни (69). Също така животните се размножават бързо и дават голямо потомство (36).

От друга страна, кожата на заека е отпусната и зарастването се осъществява чрез контракция. Заекът е слабо податлив на генетични промени и съществуват малко видово специфични възрастови изследвания (36). Сред недостатъците в работата с тях е по-големият риск от инфекции и заболяемост в сравнение с гризачите (65).

При заека могат да се моделират повече на брой рани и с различна локализация: ухо, гръб, задна лапа (13,15,36).

Генерирането на рани върху заешкото ухо има това предимство, че вътрешната и външната кожа (дермата) е плътно прилепнала към ушния хрущял без никакви мускули или мастна тъкан (69). В дъното на раната липсват космени фоликули и процесите на регенерация протичат изцяло от ръбовете ѝ (18). Процесът на зарастване включва епителизация и образуване на грануляционна тъкан (69). Важно предимство е създаването на множество рани в рамките на едно и също

ухо, като другото ухо може да служи за контрола. Присъствието на лесно достъпни съдове с по-голям калибър улеснява лигирането им и индуциране на исхемични рани на заешко ухо (36). Описани са модели с генериране на различни рани на едно животно (исхемични и неисхемични), което позволява сравняването им по двойки и намалява индивидуалните вариации (18). Моделът на рани върху заешко ухо може да бъде адаптиран за изследване на хипертрофични цикатрикси (36). В допълнение шинирането на отворените рани при заека позволява лесно количествено определяне на епителизацията (65).

Съществуват модели на кожни рани и върху гърба на животните. Лезиите могат да са единични или няколко, да са различни по форма и големина (15,58), като обикновено една от тях служи за контрола (58). Изследването на тъкани от раните през различни периоди от време позволява да се оцени динамиката на зарастването (15,35).

Обобщена схема на експериментални модели за генериране на рани при заек е представена на фиг. 2.



Фиг. 2. Схематично представяне на експериментални модели за генериране на рани при заек. Експерименталните модели са по Su C et al. (2022), Sami DG et al. (2018), Chien S and Wilhelmi BJ (2012), Grada A et al. (2018), Pelizzo G et al. (2015), Carvalho-Júnior JDC et al. (2021), Al-Tawarah NM (2022), Gökkaya A et al. (2021)

Модели на кожни рани при прасе

Прасето е широко използвано като обект за изучаване на човешката кожа. Дължи се на анатомичната и физиологична структура на кожата, много наподобяваща тази на хората. Епидермисът и дермата на прасето са дебели както при хората, има и прилики в окосмяването. Кожата на прасето е по-здраво прикрепена към подлежащите структури и липсва обширен *panniculus carnosus*, който се среща при малките животни

със „свободна“ кожа. Друго предимство е, че размерът, ориентацията и разпределението на кръвоносните съдове в дермата на прасето са много подобни на кръвоносните съдове в човешката кожа. Ензимите в епидермиса, времето за обновяване на епидермалната тъкан, кератиновите протеини и съставът на липидите на кожата повърхност (1), както и присъстващите имунни клетки и биологичният отговор към растежни фактори (36) са сред другите важни прилики между свинската и човешката кожа.

Видовата близост е свързана с перкутанната пропускливост и трансдермалната абсорбция на кожата. Известно е, че раните с частично засягане на дебелината на кожата както при прасетата, така и при хората заздравяват главно чрез повторна епителизация, вместо чрез свиване, докато кръглите рани с пълно засягане на кожата при прасета заздравяват чрез контракция (36). Тези характеристики правят прасето идеален обект за валидиран животински модел на рани и за получаване на ценна изследователска информация (1).

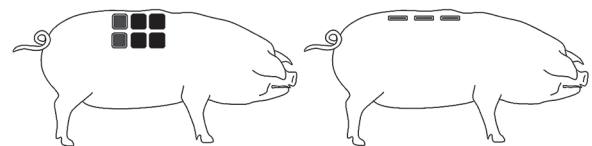
Основните недостатъци при използване на прасета са значително по-скъпите разходи за закупуването им (65), необходимост от по-големи пространства и ресурси за отглеждане (45), както и продължителната им възпроизводимост. Малко са и трансгенните линии (36). В допълнение съществуват висок процент на заболяемост и риск от инфекции (65). Прилагането на анестезия (65) и всички хирургични процедури при прасетата изискват по-големи умения и опитен ветеринарен лекар (36).

Съществуват и междувидови различия с хората: кожата на прасето има по-високо рН, притежава предимно апокринни потни жлези, като екринните потни жлези са ограничени само до специализирани региони. Васкуларизацията на кожата, особено в дермата, е по-изразена в сравнение с човешката кожа. Дермата на отбитите прасета е подобна на човешката по дебелина, но по-големите животни имат много по-дебела и твърда кожа от тази при хората и най-вероятно тези различия оказват влияние върху патофизиологичните процеси на раневия процес (36).

В проучвания върху заздравяването на кожни рани са били използвани както комерсиално отглеждани породи домашни свине (Duroc, Yorkshire и Landrace), така и породи мини прасета (Yucatan, Gottinger, Lanyu) (45).

Моделът на прасе се използва за изследване на различни кожни рани, включително ексцизионни рани с частична и пълна дълбочина, инцизи-

онни рани, лазерно индуцирани рани, исхемични рани и изгаряния от втора степен (36). Големият размер на тялото на прасетата осигурява кожна повърхност за създаване на множество рани на едно и също животно, като по този начин се подобрява надеждността на резултатите чрез елиминиране на външни фактори, свързани с различни животни (45). От друга страна, големият брой генерирани рани позволява сравняването между контролните рани и тези с проведено лечение да се осъществява по двойки и на подобни места, от противоположната страна на животното (11). Почти всички рани се генерират на дорзалната повърхност на животните и могат да варират по брой, размер и дълбочина. Има възможност за провеждане на наблюдения в зависимост от локализацията на раните в различни области на дорзалната кожа (45). Друго предимство при моделите при свине е възможността да се оцени ефектът от растежа на животните и настъпващите физиологични промени (3). Обобщена схема на експериментални модели за генериране на рани при прасета е представена на фиг. 3.



Фиг. 3. Схематично представяне на експериментални модели за генериране на рани при прасета. Експерименталните модели са по Кио ТУ et al. (2022), Acevedo CA et al. (2019), Aulia I et al. (2018)

Моделите на порезна рана

Порезните рани са дефекти на кожата с равни ръбове, които зарастват първично или вторично в зависимост дали са хирургично обработени, т.е. дали са защити непосредствено след насяването им, или по-късно. Първично зарастване на тези рани е отличен модел за биомеханичен анализ на силата на раната, но не е достатъчно подходящ за хистологична оценка на процеса на зарастване, за биохимичен анализ или за оценка на процеса на епителизация поради сравнително малкия обем на раната и възможността за медикаментозно третиране. Вторичното зарастване на порезни рани е много подходящ модел за изследване на динамиката на зарастване през определени интервали в продължение на повече от 65 дни (50).

Моделът на порезна рана е често разпространен модел при експериментални изследвания

(65) и за генериране на рани могат да се използват мишки, плъхове, зайци и свине (50).

Моделът на порезни рани наподобява хирургичните рани. Експерименталните рани се нанасят чрез надлъжни паравертебрални разрези на кожата заедно с мускулатурата на разстояние от 1 до 1,5 cm от срединната линия от двете страни на гръбначния стълб. След почистване на раната ръбовете се зашиват с прекъснат шев (32,57). В зависимост от вида на животното дължината на линейния разрез варира от 25 mm при мишки (10), до 4–6 cm при плъхове (25,33,57), 4 cm при зайци (4) и 10 cm при прасета (7).

Порезните рани са модел, използван за оценка качеството на зарасналата тъкан и на формирания цикатрикс. Здравината на тъканта на зарасналата рана се анализира след отстраняване на конците, посредством тензиометър, като непрекъснато се увеличава силата на натиск до разкъсване на тъканта. Използват се конфигурации, разработени в научните лаборатории (73) или фабрични устройства (77).

Моделът на порезна рана е полезен при сравнителни проучвания на различни хирургични разрези (14), хирургически конци (43) и адхезивни кожни материали (7).

Модел на ексцизионна рана

Ексцизионните рани са най-често използваните модели за проследяване на заздравяването на рани, защото клинично наподобяват на остри рани, зараснали вторично. Експериментално подобни рани се предизвикват чрез хирургично отстраняване на всички слоеве на кожата: епидермис, дерма и хиподерма на животното като кожните ръбове не се зашиват (50).

Хирургичната процедура се извършва чрез инструмент с остър режещ ръб, пънч, чрез който се получава проба от всички слоеве на кожата (41,46,62), или чрез дълбоко изрязване на тъканите по шаблон (53,61,63). Броят на раните на едно животно зависи от вида на извършената ексцизия и от диаметъра на пънч-биопсията (50).

Ексцизионните рани могат да се генерират при гризачи и по-големи животни (3,58), като размерът и локализацията също варират в зависимост от обекта и поставените изследователски цели (50).

Съществува голямо разнообразие в описаните модели. Възможно е да се нанесат до две ексцизионни рани при мишки (62), от две-четири до осем рани при плъхове (29,51,71) или да се генерират рани с различни размери на едно животно (41). При зайците могат да се генерират до 3–4 рани на ухо (18,75) и 2–3 на гърба (4,15). Броят на

ексцизионните рани варира и при прасетата - от две до групи от рани (3,45).

Ексцизионните рани са модел, позволяващ в динамика да се проследят получените кръвоизливи, процесите на възпаление, образуването на грануляционна тъкан, процесите на реепителизация, ангиогенеза и ремоделиране (50). Този модел е много подходящ за проследяване на промените в площта на зарастване с течение на времето и изчисляване на степента на оздравителния процес. Тъканни проби за хистологично изследване могат да бъдат получени след евтаназия на животните (гризачи) или след локална анестезия (заешко ухо). Полученият хистологичен материал дава подробна информация за динамиката на възпалителния инфилтрат (71), липсата или присъствието на епителизация, характеристиките на грануляционната тъкан, ангиогенезата и екстрацелуларния матрикс, както и за организацията на колагена (50).

Получаването на ексцизионни рани и вземането на хистологични материали е сравнително лесно и удобно. Кожният дефект е достъпен за прилагане на различни локални агенти като фармацевтични продукти, клетки, биоматериали или превръзки и за изследване на ефекта им върху процеса на възстановяване (50).

Ексцизионният модел позволява раната да се шинира, с което се инхибира контракция ѝ и това го доближава до модел на зарастване на рани при хора. Техниката включва създаване на дълбоки рани, които преминават през *panniculus carnosus* върху гърба на експерименталното животно, след това се поставят силиконови шини, центрирани и фиксирани към кожата и впоследствие се прилага залепващо лепило или найлонови конци. Шинирацията пръстен плътно прилепва към кожата около раната и предотвратява свиването ѝ. По този начин раната заздравява чрез образуване на грануляционна тъкан и реепителизация, подобно на процеса, протичащ при хората (50).

Предизвикателства и перспективи

Експерименталните модели за зарастване на рани са разработвани в продължение на много десетилетия в опит да се разбере процесът на възстановяване на тъканите и да се тестват нови протоколи за лечение. Обикновено те се разделят на две групи: *in vitro* и *in vivo* модели (54).

Предварителните резултати от *in vitro* проучванията върху клетъчни култури, стреч-моделите и тъканни култури от кожни експлантите са важни за проектиране на следващите изследвания (54). Разработени са *in vitro* модели на човеш-

ка кожа като моно култури (двумерни; 2D) на доминиращите типове клетки в кожата, като кератиноцити и дермални фибробласти, системи за съвместно култивиране и по-сложни триизмерни (3D) тъканни модели, само на епидермиса (реконструиран човешки епидермис, RHE) или на дермата и епидермиса (еквиваленти на човешка кожа, HSE). По-сложните HSE могат да включват допълнителни типове клетки като меланоцити, ендотелни клетки, имунни клетки и други структури като съдове или трети слой хиподерма (39).

Човешките модели могат да подобрят транслирането на резултатите от основните изследвания към клиничната практика, но независимо от разнообразието им все още съществуват ограничения относно проучванията на раневото заздравяване. Необходими са още подобрения за постигне на по-пълнен *in vitro* модел на кожата и имитиране на патологичен фенотип като хронични рани, келоиди, хипертрофични цикатрикси. Друго предизвикателство е изолирането и включването на имунни клетки, ендотелни клетки и адипоцитни прекурсори в напълно специфичен за пациента кожен модел (39).

In silico моделите (модели на компютърна симулация) допълват много от проведените проучвания. Математическите модели позволяват превеждане на сложните биологични процеси чрез числени представяния, улеснявайки количественото разбиране на клетъчната динамика. В допълнение молекулярният докинг показва възможните взаимодействия между молекули и протеини в тъканите и клетките (2). Проучванията *in silico* могат да идентифицират биоактивни компоненти, присъстващи в различни билкови екстракти, и да оценят тяхната антиоксидантна, противовъзпалителна и ранозаздравяваща активност (8,31).

Поради наличието на анатомични и функционални междувидови различия и с цел редуциране работата с експериментални животни изследванията *in vitro* и *in silico* имат сериозен принос като алтернативни методи за изследване на заздравяването на рани (2). Получените резултати са обещаващи, но те не могат да пресъздадат в пълнота сложните процеси, протичащи в организма (16). Това налага прилагането на *in vivo* модели за потвърждаване на получените резултати от неинвазивните изследвания.

In vivo моделите са изследователският инструмент и за прилагане на съвременни високи технологии. Експериментално се разработват иновативни подходи и алтернативни методи на ле-

чение като смарт превръзки (40), биоинженерни заместители на кожата (44), наноматериали (6,74) и въвеждане на различни сензори за наблюдение на раните в реално време (47,49).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изследователският интерес към раневия процес се е увеличил неимоверно през последните години, като *in vivo* моделите допринасят много за нашето разбиране на физиологичните и патофизиологичните механизми, свързани със заздравяването на рани. Съществуват различни животински модели, като всеки има своите предимства и недостатъци. За да се изследва всяка терапевтична интервенция, необходимо е използване на възпроизводим модел, който е съпоставим с промените при човек и е подходящ за транслиране на резултатите в клиничната практика. Поради етични и финансови ограничения мишките и плъховете са най-често използваните лабораторни животни в моделите на рани. Раните се генерират чрез ексцизия или инцизия, чрез уреда на цялата дебелина на кожата или само на част от нея. Известни са основните процеси, протичащи на всеки етап от раневото заздравяване, но животинските модели позволиха да се разберат сложните взаимовръзки между различните типове клетки и взаимодействията на клетките с екстрацелуларния матрикс. Поради това *in vivo* моделите ще останат един от основните методи както за изучаване на молекулярните механизми, така и за търсене, ефективно повлияване и противодействие на вредните ефекти от външните въздействия и патологичните процеси върху раневия ход.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG. Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Sep;71(17):3241-55. doi: 10.1007/s00018-014-1612-5. Epub 2014 Apr 9. PMID: 24714880; PMCID: PMC4134422.
2. Abu Bakar N, Mydin RBSMN, Yusop N, Matmin J, Ghazalli NF. Understanding the ideal wound healing mechanistic behavior using *in silico* modelling perspectives: A review. *J Tissue Viability.* 2024 Feb;33(1):104-115. doi: 10.1016/j.jtv.2023.11.001. Epub 2023 Nov 10. PMID: 38092620.
3. Acevedo CA, Sánchez E, Orellana N, Morales P, Olgún Y, Brown DI, et al. Re-Epithelialization Appraisal of Skin Wound in a Porcine Model Using a Salmon-Gelatin Based Biomaterial as Wound Dressing. *Pharmaceutics.* 2019 Apr

- 26;11(5):196. doi: 10.3390/pharmaceutics11050196. PMID: 31027353; PMCID: PMC6571591.
4. Al-Tawarah NM. Singular and combined healing activity of aqueous extract of *Artemisia jordanica* and *Achillea fragrantissima* in rabbit's incision, excision and burn models. *Biomed Pharmacol J*. 2022;15(3).
 5. Alvarez M, Chávez MN, Miranda M, Aedo G, Allende ML, Egaña JT. A novel in vivo model to study impaired tissue regeneration mediated by cigarette smoke. *Sci Rep*. 2018;8. doi: 10.1038/s41598-018-28687-1.
 6. Ataide JA, Zanchetta B, Santos ÉM, Fava ALM, Alves TFR, Cefali LC, et al. Nanotechnology-Based Dressings for Wound Management. *Pharmaceutics (Basel)*. 2022 Oct 19;15(10):1286. doi: 10.3390/ph15101286. PMID: 36297398; PMCID: PMC9611303.
 7. Aulia I, Bangun K. Comparison tensile strength and histopathological evaluation of wound healing process using adhesive skin tapes on laceration wounds of porcine skin. *J Phys Conf Ser*. 2018 Dec;1073(3):032038. doi: 10.1088/1742-6596/1073/3/032038.
 8. Balachandran A, Choi SB, Beata MM, Małgorzata J, Froemming GRA, Lavilla CA Jr, et al. Antioxidant, Wound Healing Potential and In Silico Assessment of Naringin, Eicosane and Octacosane. *Molecules*. 2023 Jan 20;28(3):1043. doi: 10.3390/molecules28031043. PMID: 36770709; PMCID: PMC9919607.
 9. Barakat M, DiPietro LA, Chen L. Limited Treatment Options for Diabetic Wounds: Barriers to Clinical Translation Despite Therapeutic Success in Murine Models. *Advances in Wound Care*. 2021 Aug;10(8):436-460. DOI: 10.1089/wound.2020.1254. PMID: 33050829; PMCID: PMC8236303.
 10. Bellare A, Epperly MW, Greenberger JS, Fisher R, Glowacki J. Development of tensile strength methodology for murine skin wound healing. *MethodsX*. 2018 Apr 16;5:337-344. doi: 10.1016/j.mex.2018.04.002. PMID: 30050753; PMCID: PMC6058076.
 11. Bhatia A, O'Brien K, Chen M, Woodley DT, Li W. Keratinocyte-Secreted Heat Shock Protein-90alpha: Leading Wound Reepithelialization and Closure. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2016 Apr 1;5(4):176-184. doi: 10.1089/wound.2014.0620. PMID: 27076995; PMCID: PMC4817596.
 12. Bowers S, Franco E. Chronic Wounds: Evaluation and Management. *Am Fam Physician*. 2020 Feb 1;101(3):159-166. PMID: 32003952.
 13. Bradley DM, Swaim SF, Stuart S. An animal model for research on wound healing over exposed bone. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 1998;11:131-5. doi: 10.1055/s-0038-1632534.
 14. Carlson MA, Chakkalakal D. Tensile properties of the murine ventral vertical midline incision. *PLoS One*. 2011;6(9):e24212. doi: 10.1371/journal.pone.0024212. Epub 2011 Sep 7. PMID: 21915298; PMCID: PMC3168469.
 15. Carvalho-Júnior JDC, Zanata F, Aloise AC, Ferreira LM. Acellular dermal matrix in skin wound healing in rabbits - histological and histomorphometric analyses. *Clinics (Sao Paulo)*. 2021 Mar 8;76:e2066. doi: 10.6061/clinics/2021/e2066. PMID: 33681941; PMCID: PMC7920408.
 16. Casadiego O, Macias O, García L, Sanabria-Chanaga E, Baay-Guzmán GJ, Mantilla JC, et al. In-Silico Selection of Wound-Healing Plant Secondary Molecules and Their Pro-Healing Activities on Experimental Models. *Chem Biodivers*. 2023 Dec;20(12):e202300961. doi: 10.1002/cbdv.202300961. Epub 2023 Nov 22. PMID: 37966104.
 17. Chhabra S, Chhabra N, Kaur A, Gupta N. Wound Healing Concepts in Clinical Practice of OMFS. *J Maxillofac Oral Surg*. 2017 Dec;16(4):403-423. doi: 10.1007/s12663-016-0880-z. Epub 2016 Mar 5. PMID: 29038623; PMCID: PMC5628060.
 18. Chien S, Wilhelmi BJ. A simplified technique for producing an ischemic wound model. *J Vis Exp*. 2012 May 2;(63):e3341. doi: 10.3791/3341. PMID: 22588601; PMCID: PMC3468189.
 19. Cioce A, Cavani A, Cattani C, Scopelliti F. Role of the Skin Immune System in Wound Healing. *Cells*. 2024 Apr 4;13(7):624. doi: 10.3390/cells13070624. PMID: 38607063; PMCID: PMC11011555.
 20. Couturier A, Calissi C, Cracowski JL, Sigaudou-Roussel D, Khouri C, Roustit M. Mouse models of diabetes-related ulcers: a systematic review and network meta-analysis. *EBioMedicine*. 2023 Dec;98:104856. doi: 10.1016/j.ebiom.2023.104856. Epub 2023 Oct 31. PMID: 38251464; PMCID: PMC10755106.
 21. Crane MJ, Henry WL Jr, Tran HL, Albina JE, Jamieson AM. Assessment of Acute Wound Healing using the Dorsal Subcutaneous Polyvinyl Alcohol Sponge Implantation and Excisional Tail Skin Wound Models. *J Vis Exp*. 2020 Mar 25;(157):10.3791/60653. doi: 10.3791/60653. PMID: 32281981; PMCID: PMC7281859.
 22. Crane MJ, Xu Y, Monaghan SF, Hall BM, Albina JE, Henry WL, et al. Pulmonary infection interrupts acute cutaneous wound healing through disruption of chemokine signals. *J Immunol*. 2021 May 1;206(1_Supplement):110.06. doi: 10.4049/jimmunol.206.Supp.110.06.
 23. Dai T, Kharkwal GB, Tanaka M, Huang YY, Bil de Arce VJ, Hamblin MR. Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence*. 2011 Jul-Aug;2(4):296-315. doi: 10.4161/viru.2.4.16840. Epub 2011 Jul 1. PMID: 21701256; PMCID: PMC3173676.
 24. Dorsett-Martin WA. Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Repair Regen*. 2004

- Nov-Dec;12(6):591-9. doi: 10.1111/j.1067-1927.2004.12601.x. PMID: 15555049.
25. Dwivedi D, Dwivedi M, Malviya S, Singh V. Evaluation of wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Pongamia pinnata* in wistar rats. *J Tradit Complement Med*. 2016 Apr 4;7(1):79-85. doi: 10.1016/j.jtcme.2015.12.002. PMID: 28053891; PMCID: PMC5198820.
 26. Ejaz S, Lim CW. Impaired wound healing by exposure of different mainstream whole smoke solutions of commercial cigarettes. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2006 May;21(3):290-300. doi: 10.1016/j.etap.2005.09.007. Epub 2005 Nov 23. PMID: 21783671.
 27. Encarnação R, Manuel T, Palheira H, Neves-Amado J, Alves P. Artificial Intelligence in Wound Care Education: Protocol for a Scoping Review. *Nurs Rep*. 2024 Mar 14;14(1):627-640. doi: 10.3390/nursrep14010048. PMID: 38535720; PMCID: PMC10975757.
 28. Ericsson AC, Crim MJ, Franklin CL. A brief history of animal modeling. *Mo Med*. 2013 May-Jun;110(3):201-5. PMID: 23829102; PMCID: PMC3979591.
 29. Eyarefe DO, Kuforiji DI, Jarikre TA, Emikpe BO. Enhanced electroscalpel incisional wound healing potential of honey in wistar rats. *Int J Vet Sci Med*. 2017 Nov 13;5(2):128-134. doi: 10.1016/j.ijvsm.2017.10.002. PMID: 30255061; PMCID: PMC6137850.
 30. Falanga V, Schrayner D, Cha J, Butmarc J, Carson P, Roberts AB, et al. Full-thickness wounding of the mouse tail as a model for delayed wound healing: accelerated wound closure in Smad3 knock-out mice. *Wound Repair Regen*. 2004 May-Jun;12(3):320-6. doi: 10.1111/j.1067-1927.2004.012316.x. PMID: 15225210.
 31. Fathi F, Ghobeh M, Shirazi FH, Tabarzad M. Promising anti-inflammatory activity of a novel designed anti-microbial peptide for wound healing. *Burns*. 2024 Nov;50(8):2045-2055. doi: 10.1016/j.burns.2024.07.036. Epub 2024 Jul 31. PMID: 39181772.
 32. Gadgoli CH. Research in phyto-constituents for treatment of wounds [Internet]. *Worldwide Wound Healing - Innovation in Natural and Conventional Methods*. InTech; 2016 [cited 2025 Jan 8]. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/65485>
 33. Gál P, Toporcer T, Vidinský B, Mokřý M, Novotný M, Kilík R, et al. Early changes in the tensile strength and morphology of primary sutured skin wounds in rats. *Folia Biol (Praha)*. 2006;52(4):109-15. PMID: 17116282.
 34. Gawronska-Kozak B, Bogacki M, Rim JS, Monroe WT, Manuel JA. Scarless skin repair in immunodeficient mice. *Wound Repair Regen*. 2006 May-Jun;14(3):265-76. doi: 10.1111/j.1743-6109.2006.00121.x. PMID: 16808805.
 35. Gökkaya A, Görgü M, Kızıllıkan J, Karanfil E, Doğan A. The measurement of wound tensile strength and the effect of PRP on wound tensile force: an experimental investigation on rabbits. *J Plast Surg Hand Surg*. 2021;56(1):38-46. doi: 10.1080/2000656X.2021.1914637.
 36. Grada A, Mervis J, Falanga V. Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing. *J Invest Dermatol*. 2018 Oct;138(10):2095-2105.e1. doi: 10.1016/j.jid.2018.08.005. PMID: 30244718.
 37. Grice EA, Segre JA. Interaction of the microbiome with the innate immune response in chronic wounds. *Adv Exp Med Biol*. 2012;946:55-68. doi: 10.1007/978-1-4614-0106-3_4. PMID: 21948362; PMCID: PMC3516280.
 38. Gushiken LFS, Beserra FP, Bastos JK, Jackson CJ, Pellizzon CH. Cutaneous Wound Healing: An Update from Physiopathology to Current Therapies. *Life (Basel)*. 2021 Jul 7;11(7):665. doi: 10.3390/life11070665. PMID: 34357037; PMCID: PMC8307436.
 39. Hofmann E, Fink J, Pignet AL, Schwarz A, Schellnegger M, Nischwitz SP, et al. Human in vitro skin models for wound healing and wound healing disorders. *Biomedicines*. 2023 Mar 30;11(4):1056. doi: 10.3390/biomedicines11041056. PMID: 37189674; PMCID: PMC10135654.
 40. Jiang Y, Trotsyuk AA, Niu S, Henn D, Chen K, Shih CC, et al. Wireless, closed-loop, smart bandage with integrated sensors and stimulators for advanced wound care and accelerated healing. *Nat Biotechnol*. 2023 May;41(5):652-62. doi: 10.1038/s41587-022-01528-3. Epub 2022 Nov 24. PMID: 36424488.
 41. João De Masi EC, Campos AC, João De Masi FD, Ratti MA, Ike IS, João De Masi RD. The influence of growth factors on skin wound healing in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2016 Sep-Oct;82(5):512-21. doi: 10.1016/j.bjorl.2015.09.011. Epub 2016 Jan 7. PMID: 26832633; PMCID: PMC9444624.
 42. Karner L, Drechsler S, Metzger M, Slezak P, Zipperle J, Pinar G, et al. Contamination of wounds with fecal bacteria in immunosuppressed mice. *Sci Rep*. 2020;10(1):11494. doi: 10.1038/s41598-020-68323-5.
 43. Khiste SV, Ranganath V, Nichani AS. Evaluation of tensile strength of surgical synthetic absorbable suture materials: an in vitro study. *J Periodontal Implant Sci*. 2013 Jun;43(3):130-5. doi: 10.5051/jpis.2013.43.3.130. Epub 2013 Jun 30. PMID: 23837127; PMCID: PMC3701834.
 44. Kondej K, Zawrzykraj M, Czerwiec K, Deptuła M, Tyminska A, Pikuła M. Bioengineering skin substitutes for wound management—perspectives and challenges. *Int J Mol Sci*. 2024 Mar 26;25(7):3702. doi: 10.3390/ijms25073702. PMID: 38612513; PMCID: PMC11011330.

45. Kuo TY, Huang CC, Shieh SJ, Wang YB, Lin MJ, Wu MC, et al. Skin wound healing assessment via an optimized wound array model in miniature pigs. *Sci Rep.* 2022 Jan 10;12(1):445. doi: 10.1038/s41598-021-03855-y. PMID: 35013386; PMCID: PMC8748672.
46. Lan CC, Wu CS, Huang SM, Wu IH, Chen GS. High-glucose environment enhanced oxidative stress and increased interleukin-8 secretion from keratinocytes: new insights into impaired diabetic wound healing. *Diabetes.* 2013 Jul;62(7):2530–8. doi: 10.2337/db12-1683. PMID: 23610064.
47. Le Gall M, Serantoni V, Louche H, Jourdan F, Sigauo-Roussel D, Bonod C, et al. Monolayer graphene-on-polymer dressings promote healing and stabilize skin temperature on acute and chronic wound models. *bioRxiv.* 2021.05.16.444337 [Preprint]. doi: 10.1101/2021.05.16.444337. [cited 2025 Jan 8].
48. Lou D, Luo Y, Pang Q, Tan WQ, Ma L. Gene-activated dermal equivalents to accelerate healing of diabetic chronic wounds by regulating inflammation and promoting angiogenesis. *Bioact Mater.* 2020 May 8;5(3):667-679. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.04.018. PMID: 32420517; PMCID: PMC7217806.
49. Marti S, Schwartzkopf-Genswein KS, Janzen ED, Meléndez DM, Gellatly D, Pajor EA. Use of topical healing agents on scrotal wounds after surgical castration in weaned beef calves. *Can Vet J.* 2017 Oct;58(10):1081-1085. PMID: 28966358; PMCID: PMC5603928.
50. Masson-Meyers DS, Andrade TAM, Caetano GF, Guimaraes FR, Leite MN, Leite SN, et al. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *Int J Exp Pathol.* 2020 Feb;101(1-2):21-37. doi: 10.1111/iep.12346. Epub 2020 Mar 30. PMID: 32227524; PMCID: PMC7306904.
51. Mirnezami M, Rahimi H, Fakhar HE, Rezaei K. The role of topical estrogen, phenytoin, and silver sulfadiazine in time to wound healing in rats. *Ostomy Wound Manage.* 2018 Aug;64(8):30–4.
52. Monika P, Chandrababha MN, Rangarajan A, Waiker PV, Chidambara Murthy KN. Challenges in Healing Wound: Role of Complementary and Alternative Medicine. *Front Nutr.* 2022 Jan 20;8:791899. doi: 10.3389/fnut.2021.791899. PMID: 35127787; PMCID: PMC8811258.
53. Mulisa E, Asres K, Engidawork E. Evaluation of wound healing and anti-inflammatory activity of the rhizomes of *Rumex abyssinicus* J. (Polygonaceae) in mice. *BMC Complement Altern Med.* 2015 Sep 30;15:341. doi: 10.1186/s12906-015-0878-y. PMID: 26423525; PMCID: PMC4589968.
54. Nagle SM, Stevens KA, Wilbraham SC. Wound assessment. [Updated 2023 Jun 26]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. [cited 2025 Jan 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482198/>.
55. Opalenik SR, Davidson JM. Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair. *FASEB J.* 2005 Sep;19(11):1561–3. doi: 10.1096/fj.04-2978fje. Epub 2005 Jul 12. PMID: 16014399.
56. Opneja A, Kapoor S, Stavrou EX. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. *Thromb Res.* 2019 Jul;179:56–63. doi: 10.1016/j.thromres.2019.05.001. Epub 2019 May 2. PMID: 31078121; PMCID: PMC6556139.
57. Pandey M, Worlikar PS, Ghosh A, Bondekar AA, Chetan S. Comparison of wound healing activity of Jethimadh with Triphala in rats. *Int J Health Allied Sci.* 2012 Apr-Jun;1(2):59–63. doi: 10.4103/2278-344X.101665.
58. Pelizzo G, Avanzini MA, Icaro Cornaglia A, Osti M, Romano P, Avolio L, et al. Mesenchymal stromal cells for cutaneous wound healing in a rabbit model: pre-clinical study applicable in the pediatric surgical setting. *J Transl Med.* 2015 Jul 8;13:219. doi: 10.1186/s12967-015-0580-3. PMID: 26152232; PMCID: PMC4495634.
59. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35–43. doi: 10.1159/000339613. Epub 2012 Jul 11. PMID: 22797712.
60. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound healing: a cellular perspective. *Physiol Rev.* 2019 Jan 1;99(1):665–706. doi: 10.1152/physrev.00067.2017. PMID: 30475656; PMCID: PMC6442927.
61. Rouhollahi E, Moghadamtousi SZ, Hajiaghaalipour F, Zahedifard M, Tayeby F, Awang K, et al. Curcuma purpurascens BI. rhizome accelerates rat excisional wound healing: involvement of Hsp70/Bax proteins, antioxidant defense, and angiogenesis activity. *Drug Des Devel Ther.* 2015 Oct 27;9:5805-13. doi: 10.2147/DDDT.S88196. PMID: 26604683; PMCID: PMC4629958.
62. Rowland MB, Moore PE, Bui C, Correll RN. Assessing wound closure in mice using skin-punch biopsy. *STAR Protoc.* 2023 Mar 17;4(1):101989. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101989. Epub 2023 Jan 4. PMID: 36602903; PMCID: PMC9826969.
63. Roy P, Amdekar S, Kumar A, Singh R, Sharma P, Singh V. In vivo antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. *J Ethnopharmacol.* 2012 Mar 6;140(1):186–92. doi: 10.1016/j.jep.2012.01.008. Epub 2012 Jan 14. PMID: 22265749.
64. Sami DG, Heiba HH, Abdellatif A. Wound healing models: A systematic review of animal and non-animal models. *Wound Med.* 2018;24:8–17. doi: 10.1016/j.wndm.2018.12.001.

65. Sanapalli BKR, Yele V, Singh MK, Thaggikuppe Krishnamurthy P, Karri VVSR. Preclinical models of diabetic wound healing: A critical review. *Biomed Pharmacother*. 2021 Oct;142:111946. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111946. Epub 2021 Jul 30. PMID: 34339915.
66. Sánchez M, Serrano L. History of animal experimentation and animal rights [Internet]. 2021 Jun 8. Available from: <https://beonchip.com/animal-rights-history>.
67. Schultz GS, Chin GA, Moldawer L, et al. Principles of wound healing. In: Fitridge R, Thompson M, editors. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* [Internet]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011. p. 23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534261/>.
68. Sen CK. Human wound and its burden: Updated 2020 compendium of estimates. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2021 May;10(5):281–92. doi: 10.1089/wound.2021.0026. PMID: 33733885; PMCID: PMC8024242.
69. Sharun K, Banu SA, Mamachan M, Subash A, Karikalan M, Kumar R, et al. Development and characterization of contraction-suppressed full-thickness skin wound model in rabbits. *Tissue Cell*. 2024 Oct;90:102482. doi: 10.1016/j.tice.2024.102482. Epub 2024 Jul 22. PMID: 39059133.
70. Singer AJ. Healing Mechanisms in Cutaneous Wounds: Tipping the Balance. *Tissue Eng Part B Rev*. 2022 Oct;28(5):1151-1167. doi: 10.1089/ten.TEB.2021.0114. Epub 2022 Mar 11. PMID: 34915757; PMCID: PMC9587785.
71. Sotirova Y, Kiselova-Kaneva Y, Vankova D, Tasinov O, Ivanova D, Popov H, et al. Tissue Regeneration and Remodeling in Rat Models after Application of Hypericum perforatum L. Extract-Loaded Bigels. *Gels*. 2024 May 17;10(5):341. doi: 10.3390/gels10050341. PMID: 38786258; PMCID: PMC11121646.
72. Stamm J, Cooney RN, Maish GO, Shumate ML, Lang CH, Ehrlich HP, et al. Growth hormone does not attenuate the inhibitory effects of sepsis on wound healing. *Wound Repair Regen*. 2000 Mar-Apr;8(2):103-9. doi: 10.1046/j.1524-475x.2000.00103.x. PMID: 10810036.
73. Stefanov S, Stoeva S, Georgieva S, Hristova M, Nikolova K, Dobрева M, et al. In vivo comparative assessment of incised wound healing in rats after application of hydrogel/organogel formulation containing St. John's wort methanol extract. *Bulg. Chem. Commun*. 2022, 54, 46–51.
74. Stefanov SR, Andonova VY. Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: Recent Advances in the Treatment of Skin Disorders. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Oct 26;14(11):1083. doi: 10.3390/ph14111083. PMID: 34832865; PMCID: PMC8619682.
75. Su C, Chen J, Xie X, Gao Z, Guan Z, Mo X, et al. Functionalized Electrospun Double-Layer Nanofibrous Scaffold for Wound Healing and Scar Inhibition. *ACS Omega*. 2022 Aug 18;7(34):30137-30148. doi: 10.1021/acsomega.2c03222. PMID: 36061738; PMCID: PMC9435051.
76. Sulakhiya K, Soni P, Tembhre MK, Kungumaraj HJ, Paliwal R, Kumar S. 2 - Physiology and pharmacology of wounds. In: Solanki PR, Kumar A, Singh RP, Singh J, Singh KRB, editors. *Nanotechnological Aspects for Next-Generation Wound Management*. Academic Press; 2024. p. 21-54, ISBN 9780323991650, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99165-0.00011-3>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323991650000113>)
77. Süntar I, Akkol EK, Keleş H, Oktem A, Başer KH, Yeşilada E. A novel wound healing ointment: a formulation of Hypericum perforatum oil and sage and oregano essential oils based on traditional Turkish knowledge. *J Ethnopharmacol*. 2011 Mar 8;134(1):89-96. doi: 10.1016/j.jep.2010.11.061. Epub 2010 Dec 3. PMID: 21130859.
78. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*. 2009 Sep-Oct;37(5):1528-42. doi: 10.1177/147323000903700531. PMID: 19930861.
79. Wan Y, Wang X, Yang L, Li Q, Zheng X, Bai T, et al. Antibacterial Activity of Juglone Revealed in a Wound Model of *Staphylococcus aureus* Infection. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 15;24(4):3931. doi: 10.3390/ijms24043931. PMID: 36835350; PMCID: PMC9963570.
80. Wang G, Yang F, Zhou W, Xiao N, Luo M, Tang Z. The initiation of oxidative stress and therapeutic strategies in wound healing. *Biomed Pharmacother*. 2023 Jan;157:114004. doi: 10.1016/j.biopha.2022.114004. Epub 2022 Nov 11. PMID: 36375308.
81. Yang Y, Xie W, Li S, Sun X, Yu B, Fu H, et al. Splint-free line drawing model: An innovative method for excisional wound models. *Int Wound J*. 2023 Sep;20(7):2673-2678. doi: 10.1111/iwj.14141. Epub 2023 Mar 5. PMID: 36872305; PMCID: PMC10410311.
82. Zhou S, Xie M, Su J, Cai B, Li J, Zhang K. New insights into balancing wound healing and scarless skin repair. *J Tissue Eng*. 2023 Jul 27;14:20417314231185848. doi: 10.1177/20417314231185848. PMID: 37529248; PMCID: PMC10388637.

Адрес за кореспонденция:

Минка Христова

Катедра „Физиология и патофизиология“

Медицински университет – Варна

ул. „Проф. М. Дринов“ 55

Варна, 9000

e-mail: hristova.minka@abv.bg