

KESEMBUHAN LUKA SETELAH PEMBERIAN TOPIKAL ZINK PADA TIKUS DENGAN PAKAN LEMAK TINGGI

Wound Healing Following Zinc Topical Application on Rat with High Fat Diet

Devita Anggraeni¹, Dhirgo Adji¹, dan Retno Murwanti²

¹Bagian Ilmu Bedah dan Radiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Jurusan Farmakologi dan Farmasi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: devita_anggraeni@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui peran zink pada kesembuhan luka dalam kondisi berat badan berlebih. Dalam penelitian digunakan 20 ekor tikus *Sprague Dawley* jantan berumur tiga bulan (150-200 g). Tikus dibagi secara acak menjadi empat kelompok (A, B, C, dan D), masing-masing kelompok terdiri atas lima ekor. Kelompok A dan B diberi pakan normal, sedangkan kelompok C dan D diberi pakan lemak tinggi. Setelah dua bulan perlakuan pakan, seluruh tikus dioperasi untuk membuat luka irisan pada kulit, kemudian luka ditutup dengan jahitan. Luka jahitan pada kelompok A dan C diberi aplikasi topikal unguenta vaseline album (tanpa zink), sedangkan luka jahitan pada kelompok B dan D diberi aplikasi topikal unguenta zink 10% dengan bahan dasar vaselin album. Lima hari setelah operasi, seluruh tikus diambil darahnya untuk dianalisis terhadap jumlah leukosit total kemudian diikuti pengambilan jaringan kulit untuk pemeriksaan histopatologis dan penghitungan jumlah leukosit di jaringan. Hasil penelitian menunjukkan adanya interaksi yang signifikan antara pakan dan aplikasi topikal terhadap jumlah leukosit total dalam darah ($P < 0,05$). Jumlah leukosit di jaringan mengalami penurunan setelah aplikasi topikal zink, meskipun hasilnya tidak signifikan ($P > 0,05$). Analisis histopatologis menunjukkan epidermis sudah tertutup pada seluruh tikus perlakuan, namun demikian sebagian tikus masih menunjukkan dermis yang terbuka, yaitu kelompok A sebanyak 60%, kelompok B sebanyak 60%, kelompok C sebanyak 60%, dan kelompok D sebanyak 40%. Dapat disimpulkan bahwa proses kesembuhan luka setelah pemberian topikal zink pada tikus yang diberi pakan lemak tinggi menunjukkan hasil yang baik, yaitu ditandai dengan penutupan lapisan epidermis dan dermis, serta menurunnya jumlah leukosit di jaringan.

Kata kunci: pakan lemak tinggi, histopatologi, leukosit, luka, zink

ABSTRACT

The objective of this experiment was to study the role of zinc on wound healing under overweight condition. Twenty male *Sprague Dawley* rats 3 months of age were used in this experiment. Rats were randomly divided into 4 groups (A, B, C and D). Rats in group A and B were fed a normal diet, while rats in group C and D were fed a high fat diet. After 2 months of treatment, skin incision was done at the back side of the rats. Incisions wound were closed with single interrupted sutures. The wound of the rats in group A and C was treated with vaseline unguent, while group B and D was treated with 10% zinc unguent. Five days after skin incision, blood was collected for a total leukocyte analysis and wounded skin was taken for histopathologic analysis. Leukocyte numbers in wounded skin was also counted. Results of this experiment show that there were significant interaction between diet and topical application on blood total leukocyte ($P < 0.05$). Meanwhile, there was no significant difference on leukocyte numbers in wounded skin, however, the leukocyte numbers were tend to decreased. Histopathological analysis showed that epidermis was closed in all of the rats. However, some of dermis remained open. The percentages of opened dermis in group A, B, C, and D were 60%, 60%, 60%, and 40%, respectively. In conclusion, wound healing following zinc topical application on rat with high fat diet showed a better result characterized by closed epidermis and dermis, as well as decreased of leukocyte numbers in wounded skin.

Key words: high fat diet, histopathology, leukocyte, wound, zinc

PENDAHULUAN

Luka merupakan kerusakan atau gangguan pada struktur dan anatomi normal suatu jaringan. Kerusakan tersebut dapat terjadi pada integritas epitel kulit, bahkan dapat meluas sampai dengan jaringan subkutan yang diikuti dengan kerusakan struktur lainnya seperti tendon, otot, pembuluh darah, saraf, organ parenkim, dan tulang (Velnar *et al.*, 2009). Proses kesembuhan luka melibatkan beberapa fase, yaitu hemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodeling. Luka dapat sembuh dengan baik jika fase-fase tersebut berlangsung secara berurutan dan dalam durasi waktu yang normal. Banyak faktor yang dapat mengganggu fase kesembuhan luka, salah satunya adalah nutrisi (Guo dan DiPietro, 2010).

Diet lemak tinggi dapat mengakibatkan kelebihan berat badan dan obesitas (Nascimento dan Costa, 2006). Jaringan lemak mensekresikan sejumlah besar substansi bioaktif yang disebut adipokin. Sel-sel lemak dan makrofag dalam jaringan lemak juga memproduksi molekul bioaktif lain yaitu sitokin, kemokin, leptin,

adiponektin, dan resistin. Adipokin memiliki efek yang kuat pada respons imun dan inflamasi. Pengaruh negatif adipokin terhadap sistem imun memengaruhi proses kesembuhan luka. Gangguan fungsi sel mononuklear, penurunan proliferasi limfosit, dan gangguan level sitokin perifer dapat terjadi pada penderita obesitas (Guo dan DiPietro, 2010). Menurut Nascimento dan Costa (2006), kesembuhan luka pada individu dengan berat badan berlebih akibat pemberian pakan lemak tinggi dapat terhambat akibat gangguan re-epitelialisasi.

Zink mempunyai peran penting dalam berbagai proses biologis dalam tubuh, seperti kontrol terhadap asupan pakan, pertumbuhan (Kwun *et al.*, 2007), sintesis DNA, pembelahan sel, sintesis protein, dan seluruh proses dalam regenerasi jaringan (Mac Kay dan Miller, 2003). Pemberian zink secara topikal juga berperan dalam berbagai kondisi dermatologik seperti infeksi (*leishmaniasis*), *inflammatory dermatoses* (*acne vulgaris*), gangguan pigmentasi (*melasma*), dan neoplasia (*basal cell carcinoma*) (Gupta *et al.*, 2014).

Lansdown *et al.* (2007) menjelaskan bahwa pemberian zink secara topikal pada luka memiliki arti penting untuk membersihkan jaringan yang mati pada luka (*debridement*), anti infeksi, dan epitelisasi. Penelitian terkait dengan kesembuhan luka ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui peran zink pada proses kesembuhan luka dalam kondisi berat badan berlebih akibat pemberian pakan lemak tinggi, sehingga diperoleh metode penanganan luka yang efektif untuk terjadinya kesembuhan yang optimal.

MATERI DAN METODE

Perlakuan Hewan Coba, Analisis Darah, dan Histopatologi

Penelitian ini menggunakan metode Anggraeni *et al.* (2012). Dua puluh ekor tikus *Sprague Dawley* jantan berumur tiga bulan dengan berat badan 150-200 g digunakan pada penelitian ini. Tikus dibagi menjadi empat kelompok (A, B, C, dan D) secara acak, masing-masing terdiri dari lima ekor. Tikus ditempatkan dalam kandang individu. Kelompok A dan B diberi pakan normal, sedangkan kelompok C dan D diberi pakan lemak tinggi (Tabel 1).

Tabel 1. Komposisi pakan tikus

| Komponen pakan | Normal (g/100 g) | Lemak tinggi (g/100 g) |
|----------------|---------------------|---------------------------|
| Vitamin | 5 | 5 |
| Selulosa | 5 | 5 |
| Lemak | 5 | 20 |
| Sukrosa | 10 | 10 |
| Tepung jagung | 55 | 42 |
| Kasein | 20 | 18 |
| Total | 100 | 100 |

Setelah dua bulan perlakuan pakan, seluruh tikus dioperasi untuk membuat luka irisan pada kulit. Tikus dianestesi umum terlebih dahulu dengan ketamin (50 mg/kg) dan *xylazin* (5 mg/kg) secara intramuskular pada kaki belakang (*muskulus quadriceps*). Setelah terbius, bulu di daerah dorsolateral punggung dicukur kemudian kulit diolesi dengan iodine. Luka irisan dibuat pada kulit sampai dengan lapisan subkutan, kemudian luka ditutup dengan jahitan pola sederhana tunggal. Luka jahitan pada kelompok A dan C diberi aplikasi topikal unguenta vaseline album (tanpa zink), sedangkan pada kelompok B dan D diberi aplikasi topikal unguenta zink 10% berbasis dasar vaselin album. Pemberian aplikasi topikal dilakukan dua kali sehari selama lima hari berturut-turut.

Lima hari setelah operasi, seluruh tikus diambil sampel darahnya (1 ml) dan dimasukkan *vacutainer* dengan antikoagulan *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA). Sampel darah dianalisis terhadap jumlah leukosit total. Jaringan kulit yang luka diambil dan difiksasi dalam *neutral buffered formalin* (NBF) 10% untuk pemeriksaan histopatologis menggunakan pewarnaan hematoxilin eosin. Jumlah leukosit jaringan dihitung dengan mikroskop pada empat lapang pandang secara random dengan pembesaran 400x.

Seluruh prosedur dalam kegiatan penelitian ini telah disetujui oleh Komisi *Ethical Clearance* Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada, dengan Surat Keterangan Kelaikan Etik No 073/KEC-LPPT/VIII/2012.

Analisis Data

Data jumlah leukosit total dalam darah dan jumlah leukosit jaringan dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA). Hasil yang signifikan dilanjutkan dengan menggunakan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). Analisis histopatologis dilakukan secara deskriptif, yaitu membandingkan perubahan gambaran histopatologis antar kelompok perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa berat badan tikus yang diberi pakan normal (234,44±20,01 g) secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan tikus yang diberi pakan lemak tinggi (256,4±13,57 g) (P<0,05). Diet lemak tinggi diketahui dapat mengakibatkan kelebihan berat badan dan berkembangnya obesitas (Nascimento dan Costa, 2006). Penelitian yang dilakukan oleh Dobrian *et al.* (2000) menunjukkan bahwa tikus yang diberi pakan lemak tinggi mengalami peningkatan berat badan yang mencerminkan peningkatan massa lemak dalam tubuh.

Jumlah leukosit total dalam darah tidak dipengaruhi oleh faktor pakan maupun aplikasi topikal. Meskipun demikian, terdapat interaksi yang signifikan antara pakan dan aplikasi topikal terhadap jumlah leukosit total (P<0,05). Jumlah leukosit total kelompok tikus yang diberi pakan normal dan tanpa aplikasi topikal zink (9,67±2,15x10³/µl) secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok tikus yang diberi pakan normal dan aplikasi topikal zink (6,37±2,50x10³/µl) (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian aplikasi topikal zink dapat menurunkan jumlah leukosit total pada tikus yang diberi pakan normal. Penurunan jumlah total leukosit dalam penelitian ini sesuai dengan yang disebutkan oleh Agren *et al.* (1991) bahwa zink mempunyai efek anti-inflamasi. Zink berperan dalam berbagai macam reaksi enzimatik yang berkaitan dengan kesembuhan luka, antara lain produksi DNA polimerase (berperan dalam proliferasi seluler) dan *superoxide dismutase*. Di samping itu, zink juga terlibat dalam berbagai proses respons imunologis seperti fagositosis, imunitas humoral dan seluler, serta aktivitas bakterisidal (Burns *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2004).

Tabel 2. Rerata jumlah leukosit total (10³/µl) dalam darah pada kelompok tikus yang diberi perlakuan pakan normal dan lemak tinggi yang dikombinasi dengan atau tanpa aplikasi topikal zink pada hari ke-5 setelah operasi

| Perlakuan | | Pakan | |
|-----------|------------|-------------------------|-------------------------|
| | | Normal | Lemak tinggi |
| Topikal | Tanpa zink | 9,67±2,15 ^{ax} | 7,88±0,78 ^{ax} |
| | Zink | 6,37±2,50 ^{by} | 9,28±3,50 ^{ax} |

^{a,b}Superskrip huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan signifikan pada level 5%, ^{x, y}Superskrip huruf yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan signifikan pada level 5%

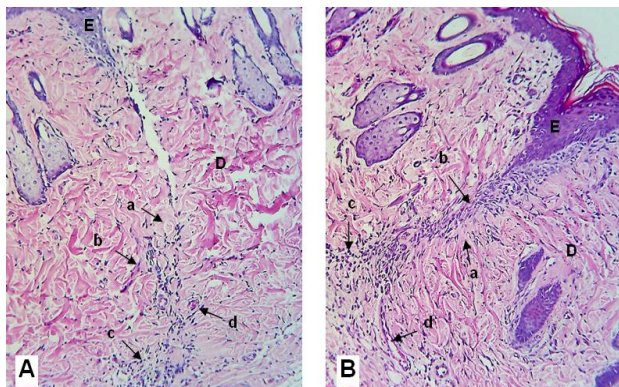
Jumlah leukosit total tikus yang diberi pakan normal dan aplikasi topikal zink ($6,37 \pm 2,50 \times 10^3/\mu\text{l}$) secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok tikus yang diberi pakan lemak tinggi dan aplikasi topikal zink ($9,28 \pm 3,50 \times 10^3/\mu\text{l}$) (Tabel 2). Jaringan lemak diketahui dapat memproduksi dan menyekresikan sitokin pro-inflamatori (Nascimento dan Costa, 2006). Coppack (2001) juga menyebutkan bahwa peningkatan jaringan lemak berhubungan dengan meningkatnya mediator pro-inflamatori seperti TNF α dan berbagai macam IL (IL-1 β , IL-6 dan IL-8). Apabila jumlah sitokin pro-inflamatori berlebihan, maka dapat memperpanjang masa inflamasi dan menunda proses kesembuhan luka.

Jumlah leukosit jaringan antar kelompok A, B, C, dan D tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$) (Tabel 3). Meskipun demikian, aplikasi topikal zink cenderung menurunkan jumlah leukosit di jaringan. Menurut Lim *et al.* (2004), zink sebagai agen topikal telah sering digunakan untuk luka ulser maupun luka insisi. Reaksi inflamasi berkurang pada luka yang diberi zink. Namun demikian, jika zink diberikan dengan konsentrasi tinggi dapat berefek sebaliknya. Topikal zink dapat menstimuli proses kesembuhan luka dengan mempercepat re-epitelisasi, menurunkan inflamasi dan pertumbuhan bakteri (Agren, 1991).

Tabel 3. Rerata jumlah leukosit jaringan pada kelompok tikus yang diberi perlakuan pakan normal dan pakan lemak tinggi yang dikombinasi dengan atau tanpa aplikasi topikal zink pada hari ke-5 setelah operasi

| Perlakuan | Pakan | |
|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Normal | Lemak tinggi |
| Topikal Tanpa zink | 210,50 \pm 24,28 | 215,25 \pm 78,82 |
| Zink | 205,5 \pm 89,85 | 106,50 \pm 62,11 |

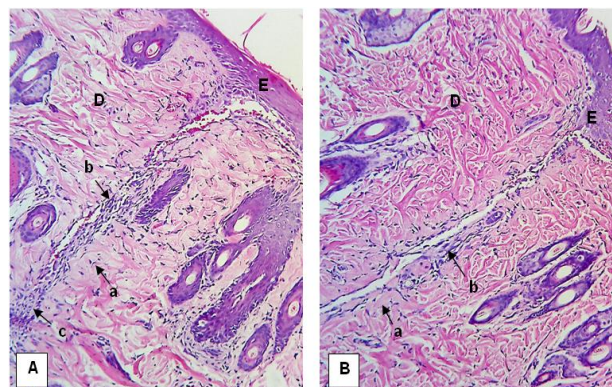
Gambaran histopatologis kulit pada semua kelompok perlakuan secara umum menunjukkan



Gambar 1. Histopatologi kulit pada hari kelima setelah operasi pada tikus yang diberi pakan normal dan aplikasi topikal vaselin. A= Epidermis (E) sudah menutup, tetapi sebagian dermis (D) masih terbuka, jaringan granulasi mulai mengisi celah luka yang terdiri atas kolagen (a), fibroblas (b), sel-sel radang (c), dan pembuluh darah (d); Histopatologi kulit pada hari kelima setelah operasi pada tikus yang diberi pakan normal dan aplikasi topikal zink. B= Epidermis (E) dan dermis (D) sudah menutup, sepanjang celah luka terisi kolagen (a), fibroblast (b), sel-sel radang (c) dan pembuluh darah (d). HE, 100x

lapisan epidermis yang sudah tertutup pada hari kelima. Namun demikian, celah luka pada lapisan dermis sebagian tikus pada semua kelompok perlakuan masih ada yang terbuka. Sel-sel radang masih dapat dijumpai di daerah sekitar luka. Jaringan granulasi yang terdiri dari fibroblas, sel-sel radang, kolagen dan pembuluh darah juga sudah mulai mengisi celah luka. Kelompok A, seluruh epidermis sudah tertutup. Namun demikian, pada tiga dari lima ekor tikus (60%) masih ada celah luka yang terbuka di bagian dermis. Jaringan granulasi mulai terbentuk pada dermis bagian bawah yang terdiri dari sel-sel radang, fibroblas, kolagen dan pembuluh darah (Gambar 1A). Kelompok B, seluruh epidermis sudah tertutup, tetapi tiga dari lima ekor tikus (60%) masih menunjukkan adanya celah luka yang terbuka pada lapisan dermis. Jaringan granulasi yang terdiri dari sel-sel radang, fibroblas, kolagen dan pembuluh darah dapat dijumpai di sepanjang tepi luka (Gambar 1B). Kelompok C, epidermis sudah tertutup dan tiga dari lima ekor tikus (60%) menunjukkan adanya celah luka yang masih terbuka pada lapisan dermis. Celah luka tampak terisi fibroblas, sel-sel radang, dan kolagen (Gambar 2A). Pada kelompok D, seluruh epidermis sudah tertutup, dan dua dari lima ekor tikus (40%) memperlihatkan celah luka yang masih terbuka pada lapisan dermis. Jaringan granulasi juga sudah mengisi celah luka (Gambar 2B).

Diferensiasi epidermis pada luka irisan mendahului proses penutupan celah luka pada lapisan dermis. Tahap paling awal proses kesembuhan luka yaitu migrasi keratinosit pada tepi luka melalui celah luka. Setelah re-epitelisasi dan sintesis matriks terjadi, kecepatan proliferasi dari sel-sel pada celah epidermis dan dermis akan mencapai puncaknya (Wiksman *et al.*, 2007). Laplante *et al.* (2001) menjelaskan bahwa regenerasi fungsional epidermis tergantung dari rekonstitusi *dermoepidermal junction* yang melekatkan epidermis ke dermis dan juga diferensiasi akhir dari keratinosit menjadi lapisan kornifikasi.



Gambar 2. Histopatologi kulit pada hari kelima setelah operasi pada tikus yang diberi pakan lemak tinggi dan aplikasi topikal vaselin. A= Epidermis (E) tampak sudah menutup, tetapi sebagian dermis (D) masih terbuka, jaringan granulasi mulai mengisi celah luka yang terdiri dari kolagen (a), fibroblas (b) dan sel-sel radang (c); Histopatologi kulit pada hari ke lima setelah operasi pada tikus yang diberi pakan lemak tinggi dan aplikasi topikal zink. B= Epidermis (E) sudah menutup tetapi dermis (D) masih terbuka, dan di sekitar tepi luka terdapat kolagen (a) dan fibroblas (b). HE, 100x

Fase proliferasi didominasi oleh pembentukan jaringan granulasi dan re-epitelisasi. Hari ketiga setelah luka, fibroblas mulai mensintesis dan mensekresikan sejumlah kolagen. Kolagen akan terus meningkat sampai kurang lebih tiga minggu (Mac Kay dan Miller, 2003). Menurut Singer dan Clark (1999), jaringan granulasi mulai masuk ke celah luka, kurang lebih empat hari setelah terjadinya luka. Sejumlah kapiler baru juga terdapat pada jaringan granulasi. Makrofag, fibroblas, dan pembuluh darah masuk ke celah luka pada waktu yang bersamaan. Makrofag menghasilkan faktor-faktor pertumbuhan secara terus-menerus untuk menstimulasi fibroplasia dan angiogenesis, fibroblas menghasilkan matrik ekstraseluler yang baru untuk pertumbuhan sel ke dalam, dan pembuluh darah membawa oksigen dan nutrisi yang diperlukan untuk metabolisme sel.

Fase proliferasi secara umum mengikuti dan tumpang tindih dengan fase inflamasi yang ditandai dengan re-epitelisasi. Dermis, fibroblast, dan sel endotelial merupakan sel yang paling menonjol untuk mendukung pertumbuhan kapiler, pembentukan kolagen dan pembentukan jaringan granulasi pada sisi luka. Pada sisi luka, fibroblas memproduksi kolagen, glikosaminoglikan dan proteoglikan yang merupakan komponen utama matrik ekstraseluler. Setelah terjadi peningkatan proliferasi dan sintesis matrik ekstraseluler, proses kesembuhan luka memasuki fase remodeling yang dapat berlangsung selama bertahun-tahun (Gio dan DiPietro, 2010).

Peran zink dalam proses kesembuhan luka adalah sebagai kofaktor dalam sistem enzimatis, yaitu *zinc-dependent matrix metalloproteinases*, yang dapat meningkatkan pembersihan jaringan mati dan migrasi keratinosit. Zink mencegah apoptosis epitel dengan cara melindungi terhadap *reactive oxygen species* dan toksin bakteri melalui aktivitas antioksidan dari *cysteine-rich metallothioneins*. Efek pemberian zink secara topikal pada luka lebih baik dibandingkan pemberian secara oral karena aktivitasnya dalam menurunkan infeksi dengan cara meningkatkan sistem pertahanan lokal dan pelepasan ion zink yang menstimulasi epitelisasi luka (Lansdown *et al.*, 2007). Aplikasi topikal zink yang menyebabkan menutupnya seluruh lapisan epidermis dan sebagian dermis pada hari kelima setelah luka insisi berkaitan dengan fungsi zink dalam mempercepat re-epitelisasi (Agren *et al.*, 1991), proliferasi fibroblast dan sintesis kolagen (Johnston, 2007). Menurut Agren *et al.* (1991), efek anti-inflamasi dari zink dan meningkatnya level zink dalam darah menunjukkan bahwa zink dapat melakukan penetrasi ke jaringan yang lebih dalam dan diabsorpsi ke dalam sirkulasi darah. Pada tikus yang mengalami defisiensi zink dapat terjadi penurunan sintesis DNA, penurunan deposisi jaringan granulasi, penurunan kekuatan regangan luka dan tertundanya penutupan luka yang terbuka. Secara langsung zink

memengaruhi epitelisasi dan proliferasi fibroblas melalui efeknya pada *metalloenzymes*, seperti *RNA polymerase*, *DNA polymerase*, dan *DNA transcriptase*.

KESIMPULAN

Proses kesembuhan luka setelah pemberian topikal zink pada tikus yang diberi pakan lemak tinggi menunjukkan hasil yang baik, yaitu ditandai dengan penutupan lapisan epidermis dan dermis, serta penurunan jumlah leukosit di jaringan pada hari kelima setelah luka insisi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada DP2M, DIKTI, Kemendikbud, RI yang telah mendanai Penelitian Hibah Fundamental 2012.

DAFTAR PUSTAKA

- Agren, M.S., M. Chvapil, and L. Franzén. 1991. Enhancement of re-epithelialization with topical zinc oxide in porcine partial thickness wounds. **J. Surgical Res.** 50:101-105.
- Anggraeni, D., D. Adji, dan B. Sutrisno. 2012. Identifikasi leptin pada kesembuhan luka tikus yang diberi pakan lemak tinggi dan aplikasi topikal zinc. **J. Vet.** 13(4):395-401.
- Burns, J.L., J.S. Mancoll, and L.G. Phillips. 2003. Impairments to wound healing. **Clin. Plastic Surg.** 30:47-56.
- Coppack, S.W. 2001. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. **Proc. Nutr. Soc.** 60:349-356.
- Dobrian, A.D., M.J. Davies, R.L. Prewitt, and T.J. Lauterio. 2000. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension.** 35:1009-1015.
- Guo, S. and L.A. DiPietro. 2010. Factors affecting wound healing. **J. Dent. Res.** 89(3):219-229.
- Johnston, E. 2007. The role of nutrition in tissue viability. **Wound Essentials.** 2:10-21.
- Kwun, I.S., Y.E. Cho, R.A. Lomeda, S.T. Kwon, Y. Kim, and J.H. Beattie. 2007. Marginal zinc deficiency in rats decreases leptin expression independently of food intake and corticotrophin-releasing hormone in relation to food intake. **British J. Nutrit.** 98:485-489.
- Lansdown, A.B., U. Mirastschijski, N. Stubbs, E. Scanlon, and M.S. Agren. 2007. Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects. **Wound Repair Regen.** 15(1):2-16.
- Laplante, A.F., L. Germain, F.A. Auger, and V. Moulin. 2001. Mechanisms of wound reepithelialization: Hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. **FASEB J.** 15:2377-2389.
- Lim, Y., M. Levy, and T.M. Bray. 2004. Dietary zinc alters early inflammatory responses during cutaneous wound healing in weanling CD-1 mice. **J. Nutr.** 134:811-816.
- MacKay, D. and A.L. Miller. 2003. Nutritional support for wound healing. **Altern. Med. Rev.** 8(4):359-377.
- Nascimento, A.P. and A.M.A. Costa. 2006. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. **British J. Nutrit.** 96:1069-1077.
- Singer, A.J. and R.A.F. Clark. 1999. Cutaneous wound healing. **New England J. Med.** 341(10):738-746.
- Velnar, T., T. Bailey, V. Smrkolj. 2009. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **J. Int. Medical Res.** 37:1528-1542.
- Wiksmann, L.B., I. Solomonik, R. Spira, and B. Tennenbaum. 2007. Novel insights into wound healing sequence of events. **Toxicologic Pathol.** 35:767-779.