



UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET NOVI SAD



**PRIMENA INHIBITORA TROMBOKSANA I
MANUKA MEDA U LEČENJU
OPEKOTINSKE RANE –
SVINJSKI MODEL**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
Prof. dr Mladen Jovanović

Kandidat:
Dr Boris Privrodski

Novi Sad, 2023.

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Борис Привродски
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Проф. др Младен Јовановић, ванредни професор, Медицински факултет Нови Сад, Универзитетски Клинички Центар Војводине
Наслов рада:	Примена инхибитора тромбосана и манука меда у лечењу опекотинске ране-свињски модел
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	119 Страница, 7 Поглавља, 182 Референце, 20 Табела, 40 Слика, 27 Графикона, 1 Прилог
Научна област:	Медицина
Ужа научна област (научна дисциплина):	Експериментална хирургија
Кључне речи / предметна одредница:	орекотине; svinja; životinjski model; med; ibuprofen; masti; maslinovo ulje; topikalna primena leka
Резиме на језику рада:	<p>Лечење опекотинских рана представља велики клинички изазов. Избор идеалног топикалног средства које би требало да поседује све позитивне карактеристике представља и даље проблем пред којим се суочава научна јавност. Ова студија је спроведена као проспективна, експериментална студија на Научном Институту за Сточарство-Земун. Обухватила је укупно 72 опечене површине на 9 животиња, које су подељене у три експерименталне групе (Бруфен маст, Манука мед, екстрадевичанско маслиново уље) и једну контролну групу (комбинација антибиотских масти). У студији се на вишеструким нивоима утицало на: дубину опекотинске ране, антимикробну, антиоксидативну и антиинфламаторну активност и потом су анализирани постигнути резултати зарастања и модулације ожиљка. За анимални модел је изабрана свиња племените расе Ландрас због својих хистолошких и физиолишких сличности са људском кожом. Резултати су потврђени патохистолошким, хистохемијским (<i>Picrosirius red</i>) и имунохистохемијским (<i>Iba1</i>, <i>Ki67</i> i <i>pancitokeratin</i>) анализама. Најбрже зарастање је забележено код групе у којој је коришћен манука мед као топикално средство, што се може тумачити вишеструким позитивним деловањем меда на окружење ране. Код групе у којој је коришћена Ибупрофен маст је забележено статистички значајно иницијално смањење дубине и убрзавање реепителизације опекотинске ране захваљујући позитивном деловању инхибитора циклоксигеназе на зону стазе и хиперперфузију. Група код које је коришћено екстрадевичанско маслиново уље показала је статистички значајно</p>

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

	<p>убрзану пролиферативну фазу зарастања и бржу реепителизацију од контролне групе. Најбољи естетски резултат и позитиван утицај на модулацију ожиљка је имала група код које је коришћен манука мед где је утврђен најтањи слој организованог гранулационог ткива и епидермиса у односу на остале испитиване групе. У овој студији је потврђено да се инфрацрвена камера (Flir one) може користити у свакодневном клиничком раду, те да се са великом сигурношћу може одредити дубина опекотинске ране. Правци даљег истраживања који би омогућили проналажење комбинованог топикалног средства са идеалним особинама би могли значајно допринети лечењу опекотина граничне дубине, убрзали зарастање и смањили број постопекотинских секвела.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	27.06.2022. године
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	Председник: Члан: Члан: Члан:
Напомена:	

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Boris Privrodski
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Prof. dr. Mladen Jovanović, Associate professor, Medical Faculty Novi Sad, University Clinical Center of Vojvodina
Thesis title:	Topical application of Tromboxane inhibitor and Manuka honey in burn wound- Swine model
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: 119 Pages, 7 Chapters, 182 References, 20 Tables, 40 Illustrations, 27 Graphs, 1 Appendices
Scientific field:	Medicine
Scientific subfield (scientific discipline):	Experimental surgery
Subject, Key words:	Burns; Swine; Models, Animal; Honey; Ibuprofen; Ointments; Olive Oil; Administration, Topical
Abstract in English language:	Burn wound treatment is a significant clinical challenge. The scientific community is currently struggling with how to choose an optimal topical drug that should have every beneficial quality. This investigation was carried out at the Scientific Institute for Animal Husbandry-Zemun as a prospective, experimental study. On nine animals, 72 burned regions were coated in total. Three experimental groups—using Brufen ointment, Manuka honey, and extra virgin olive oil—and one control group—using an antibiotic ointment combination—were used. The depth of the burn wound, antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory activity was affected in the study on various levels, and the outcomes of healing and regulation of the scar were then examined. Because of the noble Landras pig's histological and physiological resemblance to human skin, it was chosen as the animal model. Patho-histological, histo-emic (Picrosirius red), and immuno-histo-emic (Iba1, Ki67, and pancytokeratin) studies all supported the findings. The group who applied manuka honey topically experienced the quickest healing, which can be attributed to the honey's several advantageous effects on the environment around the lesion. The cyclooxygenase inhibitor's beneficial effects on the stasis zone and hyperperfusion led to an initial decrease in depth and an acceleration of re-epithelialization of the burn wound that were statistically significant when measured with ibuprofen ointment. Extra virgin olive oil was used in the group, and this group outperformed the control group in terms of rapid proliferative

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

5б – Statement on the authority,

5в – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

	<p>healing and quicker reepithelialization. In comparison to the other groups under study, the group that utilized manuka honey had the best cosmetic outcome and a favorable effect on scar modification. This group also had the smallest layer of organized granulation tissue and epidermis. The infrared camera (Flir one) can be used in routine clinical work, and it was proven in this study that it can accurately measure the depth of burn wounds.</p> <p>The results of additional study that would enable the discovery of a combination topical drug with perfect qualities could greatly aid in treating borderline depth burns, hasten healing, and lessen the incidence of burn sequelae.</p>
Accepted on Scientific Board on:	27.06.2022.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President: Member: Member: Member:
Note:	

Ova disertacija je plod vizije mentora, velike upornosti i pomoći nesebičnih ljudi.

Veliko hvala mom mentoru, prof. dr Mladenu Jovanoviću, koji mi je dao ideju za pisanje disertacije. Nadam se da sam opravdao njegovo poverenje. Znam da sam ga nekada nervirao i maltretirao, ali me je na kraju trpeo i istrpeo, što je u današnjem svetu velika retkost.

Upornost u realizaciji ovakvog projekta bila mi je i više nego potrebna: od samog pronalaženja mesta gde se ovakvi oglеди mogu realizovati, preko realizacije, problema u sprovođenju oglеda, dobijanja dozvole Etičke komisije, pa i do obrade preparata.

Hvala svim dobrim ljudima koji su pomogli u realizaciji ovog doktorata. Ljudi koji su mi pomogli da stupim u kontakt sa Institutom za Stočarstvo učinili su mnogo, a nisu ni svesni toga – hvala Jelena i Milane. Hvala Institutu za stočarstvo Zemun. Hvala dr Nikoli Deliću i dr Čedomiru Radoviću koji su omogućili realizaciju eksperimentalnog dela ove disertacije.

Ne mogu zaboraviti ni ljude koji su pomogli u tehničkom delu same organizacije oglеda. Prof. dr Ivan Čapo mnogo mi je pomogao u obradi tkiva i idejama kakva bojenja možemo načiniti – hvala ti ovom prilikom.

Hvala mojoj porodici bez koje ne bih bio ovde gde sam sada.

Sve u svemu: ako si dosledan, uporan, veruješ u ideje i u sebe – i nemoguće stvari postaju moguće.

1.0 Uvod:	1
1.1 Zona opekotinske rane	2
1.2 Procena dubine opekotinske rane	4
1.3 Termografija (Flir One)	6
1.4 Faze zarastanja rane	7
1.4.1 Hemostaza.....	8
1.4.2 Inflamacija	8
1.4.3 Proliferativna ili granulaciona faza	9
1.4.4 Maturacija ili remodeling faza.....	9
1.5 Lečenje opekotinske povrede	10
1.5.1 Konzervativno lečenje opekotinskih rana	10
1.5.2 Hiruško lečenje opekotinske rane	10
1.6 Primena topikalnih sredstava u lečenju opekotinskih povreda	11
1.6.1 Sapuni.....	11
1.6.2 Oksidativni halidi	12
1.6.3 Kiseline	12
1.6.4 Teški metali	13
1.6.5 Antibiotici	14
1.7 Inflamatorni medijatori u opekotinskoj rani	15
1.7.1 Eikosanoidi	15
1.7.1.1 Tromboksan A2 (TxA2)	16
1.7.1.2 Prostaglandin E (PGE)	17
1.7.1.3 Prostaciklin (PGI ₂)	17
1.7.1.4 Leukotrijeni (LB ₄ , LD ₄).....	17
1.8 Primena ekstradevičanskog maslinovog ulja u tretmanu rana	18
1.9 Primena meda u tretmanu rana	19
1.9.1 Manuka med	20
1.10 Primena bioloških materijala u tretmanu rana ili opekotinskih povreda	22
1.10.1 Alogenski amnion.....	22
1.10.2. Ksenograft	22
1.10.3. Alograft	22
1.11 Sintetski materijali	23
1.11.1 Poliuretanske pene	23
1.11.2 Polupropustljive pokrivke	24
1.11.2.1 Silikonske pokrivke	24
1.11.3 Hidrogelovi	24
1.11.3.1 Hidrovlakna	24
1.11.3.2 Alginati	24
1.11.4 Hidrokoloidne komprese.....	24
1.12 Upotreba imunohistohemijskih procedura u procesu zarastanja rana	25
1.12.1 Ki67	25
1.12.2 Iba 1.....	25

1.12.3 CD34	25
1.12.4 Citokeratin	26
2.0 Ciljevi i hipoteze	27
3.0 Materijal i metode	28
3.1 Izbor modela	28
3.2 Izbor topikalnog sredstva	30
3.3 Tok eksperimenta	30
3.4 Formiranje uzorka i grupa	35
3.5 Morfometrijska analiza opekotinske rane i ožiljka:	38
3.6 Merenje površine reepitelizacije (REP) (morfometrija ili planimetrija)	38
3.7 Histološka evaluacija opekotinske rane i ožiljka	40
3.7.1 Uzimanje patohistoloških uzoraka	40
3.8 Histološka, histohemijska i imunohistohemijska obrada	41
3.9 Infracrvena kamera (<i>Flir one Pro</i>)	42
3.10 Statistička obrada podataka	42
3.11 Protokol istraživanja	43
4.0 Rezultati	45
4.1 Analize dubine opekotinske rane	45
4.1.1 Makroskopska analiza opekotinske rane	45
4.1.2 Histološka evaluacija opekotinske rane	45
4.1.3 Termografska evaluacija opekotinske rane	47
4.2 Patohistološko praćenje proliferativne faze zarastanje opekotinske rane	49
4.2.1 Sedmi dan	49
4.2.2 Deseti dan	52
4.2.3 Četrnaesti dan	56
4.2.4 Sedamnaesti dan	60
4.2.5 Dvadeseti dan	65
4.3 Histohemijska i imunohistohemijska obrada opekotinske rane	69
4.3.1 Histohemijsko bojenje Picrosirius red	69
4.3.2 Imunohistohemijsko bojenje Iba1	71
4.3.3 Imunohistohemijsko bojenje Ki67	73
4.3.4 Imunohistohemijsko bojenje na Pancitokeratin	75
4.4 Planimetrija (merenje površine reepitelizacije kroz vreme sa različitim topikalnim sredstvima)	77
4.5 Evaluacija ožiljka	82
4.5.1 Makroskopska evaluacija ožiljka	82
4.5.2 Patohistološka evaluacija ožiljka	83
4.5.3 Imunohistohemijska i histohemijska obrada ožiljka	89
4.6 Komplikacije	92
5.0 Diskusija	93

5.1 Inhibitori COX u opekotinskoj rani	93
5.2 Manuka med u lečenju opekotinske rane	96
5.3 Ekstradevičansko maslinovo ulje u lečenju opekotinske rane.....	100
5.4 Postopekotinski ožiljak	102
5.5 FLIR u proceni dubine opekotinske rane	105
6.0 Zaključci	108
7.0 Literatura:	109
Прилог:.....	118

1.0 Uvod:

Opekotinske povrede su oblici traumatizma koji su u stalnom porastu kako u svetu tako i u našoj zemlji. Ovi pacijenti se suočavaju sa bolom, deformitetima i potencijalnom smrću. Opekotinska povreda, pored lokalnog oštećenja tkiva, dovodi i do sistemske intoksikacije organizma (opekotinska bolest). Ovakvo stanje pacijenta praćeno je intenzivnim bolom i mogućim epizodama sepse, koji mogu da završe letalnim ishodom. Oporavljeni pacijenti se nažalost mogu suočavati sa unakaženjem i trajnim invaliditetom. Kod velikih opekotina očekivane su sekvele koje mogu biti veoma teške i sa posledicama koje se samo donekle mogu umanjiti kasnijim hirurškim korekcijama. Njihovo lećenje je skupo. Razumevanjem odnosa između bioloških procesa normalnog i odloženog zarastanja će umnogome doprineti donošenju jasne strategije za tretman ovih patoloških stanja [1].

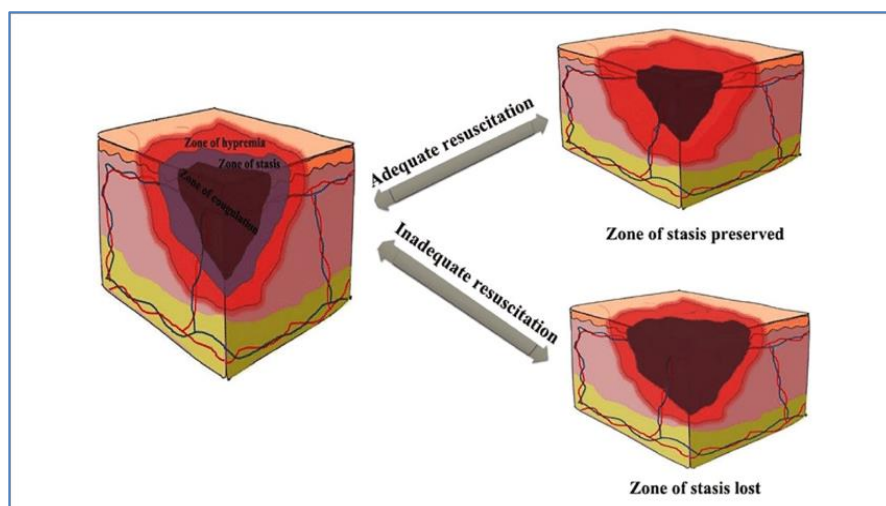
Opekotine nastaju delovanjem: otvorenog plamena, vrele tečnosti, vrelog predmeta (kontaktne), hemikalija, električne energije, eksplozijom, trenjem. Najčešće su opekotine nastale delovanjem otvorenog plamena (oko 44%), potom nastale delovanjem vrele tečnosti (33%), zatim kontaktne opekotine (oko 10%), a ostale su prisutne u oko 10% slučajeva. Godišnje u Republici Srbiji ima oko 15.000 povređenih, 1.500 bude hospitalizovano, a oko 150 se leći na odeljenju intezivne nege. Kod dece predominiraju opekotine nastale delovanjem vrele tečnosti, da bi u kasnijem dobu dominirale opekotine nastale delovanjem otvorenog plamena, i to najčešće paljenjem zapaljivih materija.

Težina opekotinske rane zavisi od veličine opekotinske rane izražene u procentu zahvaćenosti i od dubine opekotinske rane. Izračunavanje procenta opekotinske rane vrši se Volasovim (*Wallace*) pravilom “devetke” ili pravilom dlana, gde dlan pacijentove šake sa primaknutim prstima predstavlja 1%, što je naročito važno kod dece budući da je veličina glave znatno veća u odnosu na veličinu donjih ekstremiteta. Postoji i Lund–Brauderov (*Lund–Browder*) dijagram koji se koristi za određivanje površine tela. Po pravilu, svaka opekotina koja je veća od 10% površine tela zahteva hospitalizaciju, a ukoliko je veća od 20% zahteva lećenje na odeljenju intezivne nege. Kod dece su kriterijumi dvostruko niži u odnosu na odraslu populaciju. Opekotine pune debljine kože zahtevaju pregled i lećenje u bolničkim uslovima ukoliko su veće od 2%, a ukoliko su veće od 5% u opekotinskom centru. Opekotine regija kao što su opekotina lica, šaka, stopala, perinealne regije i genitalija trebalo bi da budu hospitalizovane, kao i ukoliko su prisutni

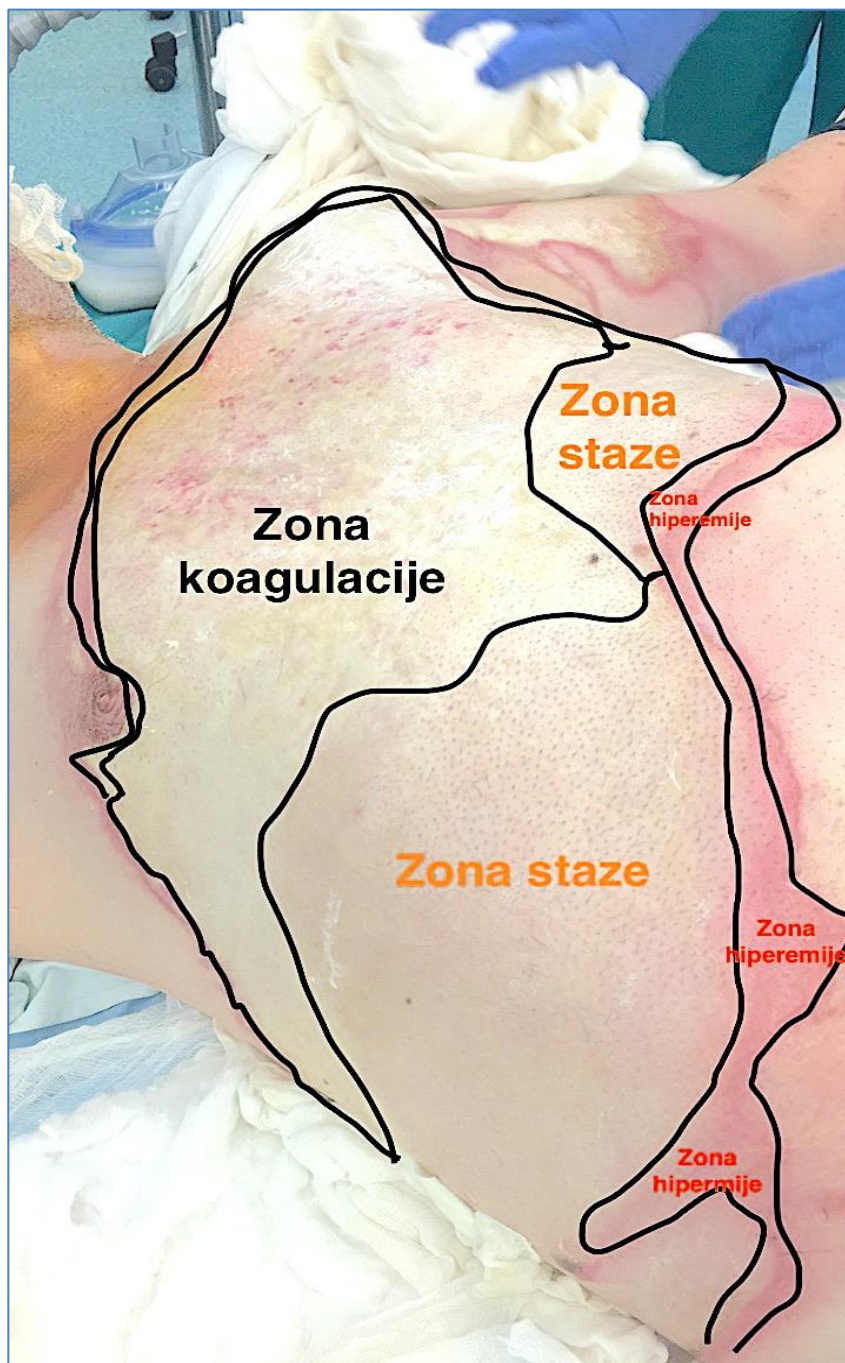
drugi korbidity i druge udružene povrede. Kod opekotinskih povreda izazvanim visokonaponskom električnom strujom ili delovanjem hemikalija je najčešće potrebno doneti odluku za ranim i adekvatnim hirurškim lečenjem.

1.1 Zona opekotinske rane

Po povređivanju opekotinska rana ima tri zone, kako je to još 1953. godine opisao Džekson (*Jackson*) [2]. Prva je centralna zona koagulacije (zona nekroze) gde nema živih ćelija i ovo je ireverzibilna zona. Naredna zona predstavlja zonu staze; ovo je zona rizika koja može preći i u zonu koagulacije i u zonu hiperemije i na nju se može uticati. Prisustvo hipoperfuzije, isušivanja, otoka i infekcije jesu razlozi prelaska ove zone u zonu koagulacije. Oko pola ćelija odlazi u apoptozu i nekrozu delovanjem oksidativnog stresa inflamacije, smanjene cirkulacije zbog mikrotromboze krvnih sudova [3]. Sistemske faktori kao što su starija životna dob, dijabetes, hronične bolesti takođe su faktori rizika. Očuvanje vitalnosti ove senzitivne regije postiže se adekvatnom nadoknadom tečnosti, smanjivanjem vazokonstrikcije, otoka i prevencijom infekcije. Rubna zona predstavlja zonu hiperemije koja je reverzibilna, sa povišenim krvotokom unutar tkiva, koja zarasta sem ukoliko se ne javi infekcija rane ili problem sa perfuzijom. [4]



Slika 1. Džeksonov (*Jackson*) model opekotine pokazuje tri zone opekotinske rane nakon adekvatnog i neadekvatnog tretiranja opekotinske rane (preuzeto sa: https://www.researchgate.net/figure/Jacksons-burn-wound-model_fig4_342114619)



Slika 2. Džeksonovov model opekotine (originalna slika)

U zarastanju opekotinske rane i formiranju posledičnog ožiljka značajna je dubina opekotinske rane i kolonizacija mikroorganizama koje dovode do sporijeg zarastanja. Po povređivanju vrlo je bitno odrediti dubinu te započeti tretman opekotinske rane.

1.2 Procena dubine opekotinske rane

Procena dubine opekotinske rane je vrlo bitan faktor kod evaluacije opekotinske rane, budući da igra veoma važnu ulogu u daljem lečenju. Opekotinske rane po dubini se mogu podeliti na epidermalne, dermalne i subdermalne.

Epidermalne opekotine zahvataju samo epiderm, one su eritomatozne, suve, izrazito bolne i ne stvaraju plikove. Najčešće u ovu kategoriju spadaju opekotine od sunca. Zarastaju za 3–4 dana kada se nekrotični epidermis oljušti i bude zamenjen regenerativnim keratinocitima. One se ne uračunavaju u kalkulaciju površine opekotinske rane i u procenat za nadoknadu.

Dermalne opekotine mogu se podeliti na površne dermalne i duboke dermalne i upravo ova razlika govori o dužini i modalitetu lečenja.

Površne dermalne opekotine zahvataju papilarni dermis i karakteristične su po stvaranju plikova. Stvaranje plikova ne mora da bude prisutno odmah po povređivanju. Ovakve opekotine su ružičaste, vlažne, bolne i stvaraju plikove koji su najčešće ispunjeni bistrom tečnošću. Kod njih se javlja refiling na pritisak zbog vazodilatacije krvnih sudova i povećanog protoka krvi u dermisu u poređenju sa normalnom kožom. Sa pravom negom zarastaju unutar dve nedelje bez rizika od stvaranja ožiljka i ne zahtevaju operativno lečenje. Dokazano je da površne dermalne opekotine mogu preći u duboke dermalne zbog tromboze malih krvni sudova [5,6].

Duboke dermalne opekotine zahvataju pored epiderma i papilarnog derma i retikularni dermis i potrebno im je tri nedelje i više da zarastu. Stvaraju plikove koji su najčešće zamućeni ili ispunjeni krvlju. Išarane su ružičasto ili belo prebojene, kapilarni refiling je oslabljen ili uopšte ne postoji. Oslabljena je osetljivost na dodir, iako bolnost može biti prisutna sa rubova rane. Posle dva dana obično budu suve i beličasto prebojene. Pravilo je da većina opekotina koja ne zaraste unutar tri nedelje treba da bude hiruški lečena [7].



Slika 3. Klinička evaluacija površne i duboke dermalne opekotine (originalna slika)

Poseban entitet predstavljaju intermedijarne opekotine parcijalne debljine kože. Ove opekotine su neodređene po svojoj klasifikaciji. Na kontrolnim previjanjima imaju tendenciju epitelizacije, ali ne zarastaju unutar tri nedelje. Histološka istraživanja pokazala su dinamičan proces oko trećeg dana po povređivanju [8,9].

Subdermalne opekotine ili opekotine pune debljine kože zahvataju celokopni kožni sloj i mogu se pružati u površno masno tkivo. One su crno, belo ili mrko prebojene, tvrde na palpaciju, bezbolne na dodir, bez refilinga i nemaju mogućnost epitelizacije. U nekim slučajevima kod opekotina nastalih kao posledica prolivanja vrele tečnosti ili kontaktnih opekotina mogu biti tamnocrveno ("malinasto") prebojene, što neiskusne kliničare može navesti na zaključak da se radi o površnoj opekotini (Slika 4) – u ovom slučaju tamno crvena boja predstavlja trombozu krvnih sudova. Ukoliko su manjih dimenzija, mogu zarastati po tipu kontrakcije i rubne epitelizacije, a

ukoliko su veće, zahtevaju hirušku eksciziju i pokrivanje sa slobodnim kožnim transplantatima da bi se smanjila pojava hipertrofičnih ožiljaka, ubrzao oporavak i smanjila učestalost ranih komplikacija.



**Slika 4. Opekotina pune debljine kože, crvena boja predstavlja trombozu krvnih sudova
(originalna slika)**

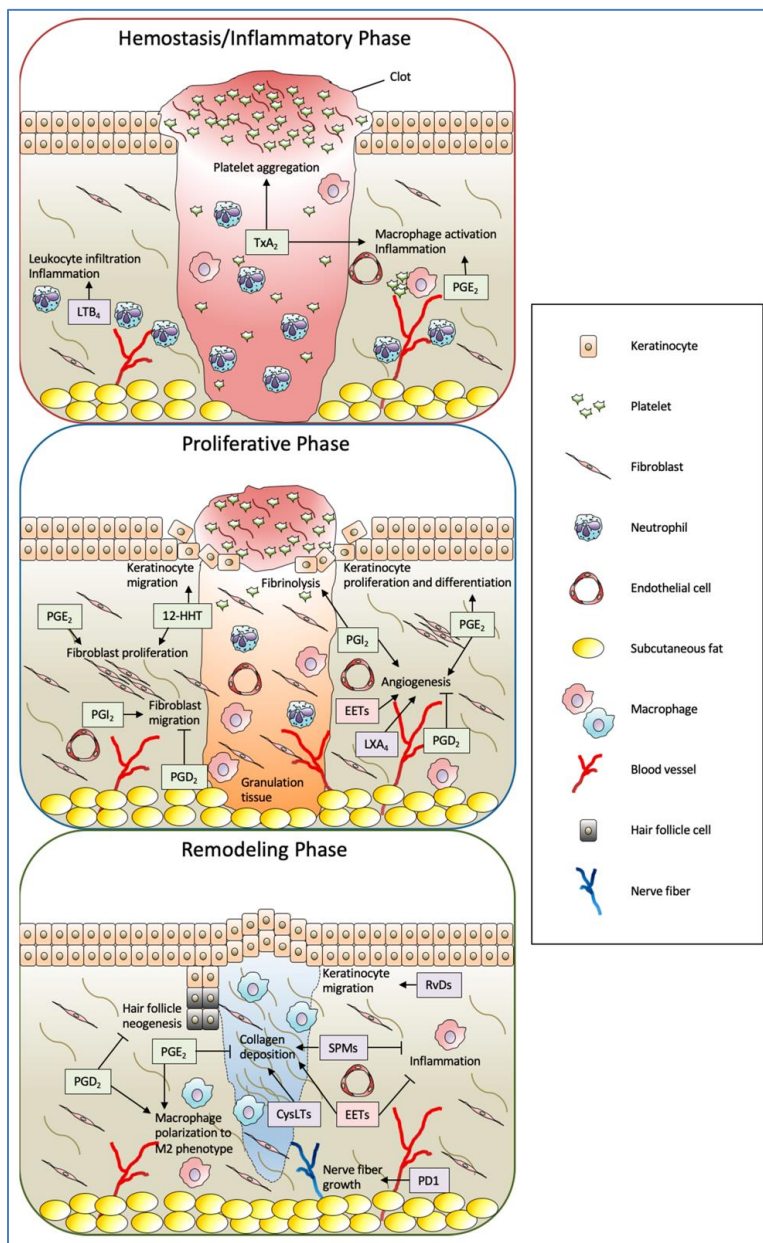
1.3 Termografija (*Flir One*)

Nove tehnologije mogu da pomognu u proceni dubine opekotinske rane te da odrede da li će opekotinska rana biti operisana ili ne. Mnogi modaliteti, uključujući termografiju, fotometriju, nuklearna snimanja kao i druge invazivne metode uključujući i biopsiju tkiva, postoje kao modaliteti procene dubine. Ove tehnike imaju mogućnost da detektuju mrtve ćelije i denaturisan kolagen (biopsija, ultrazvuk). Magnetna rezonanca može da verifikuje otok tkiva. Fluroscencija, dopler-laserska snimanja kao i termografija mogu da prikažu smanjen protok krvi. Nažalost, nijedna od ovih tehnika nije superiorna u odnosu na kliničku procenu iskusnog opekotinskog hirurga. Termalna snimanja su široko dokumentovana u analizi dubine opekotinske rane [10].

Flir One (Forward looking Infrared) predstavlja kameru zakačenu na smart telefon koja pravi zapis u vidu termalnog snimanja koja koristi infracrvene talase emitovane od strane izvora i određuje temperaturu. *Flir one* je portabilan i može da stane u svaki džep. Njegova cena nije visoka, što ga čini izrazito pristupačnim, može da pruži trenutne slike i da izmeri temperaturu, koja kasnije može i softverski da se obradi i prikaže [11,12].

1.4 Faze zarastanja rane

Po delovanju termične energije rana prolazi kroz faze koje vode do definitivnog zarastanja.



Slika 5. Faze zarastanja rana (Preuzeto sa: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8435>)

1.4.1 Hemostaza predstavlja prvu fazu zarastanja rane i prvi je odgovor organizma na delovanje nokse. Neposredno po zadobijanju opekotinske rane krvni sudovi se kontrahuju i zaustavljaju izlivanje krvi, što predstavlja vazokonstrikciju. Krvne pločice se talože, produkuju faktore koagulacije koji stimulišu koagulaciju i aktivaciju komplementa kroz intrizični i ekstrizični put. Protrombin je aktiviran sa trombinom koji se sa fibrinogenom transformiše u fibrin i zaustavlja krvarenje i gubitak krvi. Ovaj proces traje do deset minuta. Potom dolazi do lučenja histamina od strane mastocita u opečenim tkivima, a potom i u endotelnih ćelija te se javlja posledična vazodilatacija. Ova faza se dešava odmah po povređivanju i traje do sat vremena. Trombociti luče citokine i faktore rasta kao što su *Platelet-Derived Growth factor* (PDGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β), *Insulin-like growth factor-1*, i *platelet factor-IV*, koji stimulišu process reparacije u kasnijim fazama zarastanja [13].

1.4.2 Inflamacija je druga faza u zarastanju rana i karakteriše se dilatacijom krvnih sudova odmah nakon što je hemostaza postignuta. Primarna funkcija vazodilatacije je zaštita od infekcije, karakteriše se migracijom i taloženjem neutrofila koji su stimulisani citokinima od strane trombocita i endotelnih ćelija. Inflamaciju karakteristišu dve faze: inicijalna, gde se otok odmah dešava delovanjem histamina i leukotrijena produkovanim od strane mastocita i produkovanjem kinina i trombina od krvnih pločica. Kasnija faza je aktivirana citokinima izlučenim od strane endotelnih ćelija i trombocita koja aktivira migraciju, aktivaciju i taloženje makrofaga, neutrofila i monocita koji migriraju u međućelijski prostor. Brojni enzimi se produkuju od strane leukocita koji migriraju u ranu i aktiviraju inflamaciju, delovanjem proteaznih enzima koji vrše destrukciju mrtvih ćelija i bakterija. Monociti se transformišu u makrofage. Makrofazi produkuju nekoliko tipova faktora rasta koji stimulišu angiogenezu i endotelne ćelije, oslobađanjem PDGF, EGF i TGF- β , uspostavljaju sintezu fibroblasta i proliferaciju [13,14]. Za ovu fazu karakteristično je i oslobađanje eikosanoida, koji igraju veliku ulogu u nastanku otoka i vazodilatacije. Ova faza karakteristična je crvenom prebojenošću, bolom otokom i povišenom temperaturom. Ova faza traje četiri do pet dana.

1.4.3 Proliferativna ili granulaciona faza je treća faza zarastanja rana i ovaj proces je karakterističan po angiogenezi. Dešava se od 3. dana do 3 nedelje, a može trajati i duže – ova faza se može preklapati sa fazom inflamacije. Granulaciono tkivo je ekstracelularni matriks načinjen od novog vezivnog tkiva, krvnih sudova koji zamenjuju tkivo nakon traume [13]. Funkcija fibroblasta koji migriraju u ranu je produkcija kolagena. Vitamin C, kiseonik i gvožđe su esencijalni u produkciji kolagena kroz sintezu tripeptida.

Neovaskularizacija: Nakon inflamacije lokalni faktori u mikrokruženju kao što su smanjen kiseonik, smanjen pH i povećan nivo laktata stimulišu faktore rasta koji omogućuju stvaranje novih kapilara [15]. Ovaj proces se zove neovaskularizacija ili angiogeneza. Hipoksija aktivira makrofage koji izlučuju angiogene faktore *Vascular Endothelium Growth Factor* (VEGF), *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) i TGF- β [16,17] i dr.

Reepitelizacija: Proces epitelizacije je stimulisan pojavom *EGF* i *TGF- β* koji se proizvode od strane makrofaga, krvnih pločica i keratinocita sa rubova rane [18]. Keratinociti migriraju na površinu kože proliferišu i migriraju preko rane. Kada keratinociti prekriju celu ranjavu površinu sa novonastalim epidermalnim ćelijama, rana je potpuno zatvorena. Ova faza traje od dve do nekoliko nedelja.

1.4.4 Maturacija ili remodeling faza je poslednja faza koja nastaje po zarastanju rane. Ova faza se odvija kada je rana zarašala, počinje crvenilom, otokom i svrabom. Degradacija neiskorišćenih proteina i reorganizacija kolagena odvija se u ovoj fazi. Proces reparacije koji su komplikovani smenjuju se još pre nego što rana zaraste, tako da formiranje ožiljka nastaje još u granulacionoj fazi. Rana koja duže ostane u granulacionoj fazi imaće estetski ožiljak najgorih karakteristika, a samim tim će najsporije i zarasti. Produkcija kolagena pokušava da zadrži snagu, a koža elastičnost. Ova faza traje prvih šest meseci, ali može trajati i do dve godine.

1.5 Lečenje opekotinske povrede

1.5.1 Konzervativno lečenje opekotinskih rana

Previjanje opekotinskih povreda omogućuje zaštitu od spoljašnje sredine, smanjuje bol, apsorbira eksudat i omogućava vlažnu sredinu koja promovira zarastanje rane. Koja god kompresa da se koristi, ako uspeva da ispuni ove kriterijume, omogućice zarastanje rane. Jednom je *Ambroise Paré* rekao: “*Je le pansai, Dieu le guérit*” („Ja sam ga lečio, a Bog ga je izlečio”)[19].

Tretman epidermalnih opekotina uključuje emolijense ili lake dresinge, ukoliko su potrebni i praćenje zarastanja.

Dermalne opekotine se mogu kontrolisati i previjati na dnevnom nivou uz korišćenje emolijensa i dresinga. Alternativno se mogu koristiti poliuretanske pene, biološki zavoji, zavoji sa srebrom, alginatni zavoji, 3% bizmut tribromfenat ili petoslojni zavoji sa vazelinskom gazom. Oni omogućavaju duže vreme između previjanja i korisni su kod pacijenata koji moraju da prelaze veće distance do ambulatne i lekara. Kod dermalnih opekotina potreban je monitoring progresije zarastanja. Opekotine pune debljine kože, ukoliko su male, zarašće epitelnim urastanjem sa ivice rane i kontrakcijom. Većina ovih opekotina zahteva hiruršku intervenciju.

Pacijenti moraju da se prate na nekoliko dana u cilju praćenja progresije zarastanja. Kontrole služe i da se proveriti da li se pacijent pridržava uputstava koja je dobio od lekara, da bi se omogućili uslovi za adekvatno zarastanje. Ukoliko se pobudi bilo kakva sumnja, treba promeniti plan lečenja, uključujući promenu dresinga i učestalost vizita, što će omogućiti optimalizaciju lokalnog tretmana opekotinske povrede.

1.5.2 Hirurško lečenje opekotinske rane

Hirurško lečenje opekotinskih rana je glavna komponentna multidisciplinarnog pristupa lečenja pacijenata sa ekstenzivnim i dubokim opekotinskim ranama. Obično obuhvataju rane procedure kao što su esharotomija i fasciotomija (ukoliko su potrebne) sa sledstvenom hirurškom ekscizijom. Rano operativno lečenje je dramatično promenilo ishod i preživaljavanje ovih pacijenata.

Povećan inflamatorni odgovor između eshare i intaktnog tkiva se javlja kod opekotinskih rana. Prisustvo mikroorganizama u esharama i polimorfnih nukleara oslobađa veliki broj protelitičkih enzima i inflamatornih medijatora. Delovanje proteolitičkih enzima rezultuje separaciji eshare, ostavljajući granulaciono tkivo. Kod opekotina velikih površina mesto povrede indukuje sistemski odgovor. Medijatori kao što su prostaglandini, tromboksani, histamin, citokini, tumor nekrotizirajući factor (TNF) produkovani su od strane opekotine. Nivo medijatora u serumu se povećava proporcijalno sa površinom opečene površine. Hipermetabolički odgovor sa povećanim katabolizmom proteina, potrošnjom energije, gubljenjem na težini, sporim zarastanjem i depresijom imunog sistema je prisutno, dok god su ovi medijatori prisutni u krvi.

Rana ekscizija i pokrivanje slobodnim kožnim transplantatima smanjuje sistemsku intoksikaciju organizma, pojavu SIRS-a (*Systemic inflammatory response syndrome*) i smanjuje hipermetabolizam organizma. Samim tim hiruško lečenje smanjuje pojavu infekcije, skraćuju dane bolničkog lečenja i povećavaju šansu za preživljavanje kod teško opečenih bolesnika.

Zato je hiruško lečenje u vidu rane tangencionalne ekscizije, fascijalne nekrektomije i pokrivanja defekta sa slobodnim kožnim transplantatima od izrazitog značaja za ishod ovih pacijenata.

1.6 Primena topikalnih sredstava u lečenju opekotinskih povreda

Topikalna antimikrobna sredstva koja se koriste u lečenju opekotinskih rana mogu se podeliti grubo u pet kategorija (sapuni, oksidativni helati, kiseline, teški metali i antibiotici). Svako sredstvo poseduje drugačiji antimikrobni spektar, trajanje, penetraciju i toksičnost [20].

Idealno topikalno sredstvo u lečenju opekotine ima sledeće karakteristike: 1) poseduje široki spektar baktericidnog i fungicidnog delovanja čak i u situacijama gde je prisutan izražen eksudat i infekcija rane; 2) poboljšava i ubrzava fiziološke procese zarastanja rana (granulacija, epitelizacija i kontrakcija); 3) ne izaziva lokalno i sistemsko neželjeno dejstvo (alergijske reakcije, toksičnost i dr.) i kod dužeg aplikovanja; 4) ima pristupačnu cenu i 5) komfornu primenu (laka i bezbolna aplikacija) [21].

1.6.1 Sapuni

Predstavljaju prvu kategoriju topikalnog antimikrobnog sredstva koja se koriste tokom pranja. Oni su efikasni u uklanjanju biofilma i ispiranju patogena sa pacijenata. Biofilm je koherentni flaster bakterijskih ćelija povezan u biopolimerni matriks koji pokazuje povećanu toleranciju na topikalne antiseptike i antibiotike, a prave idealnu sredinu za bakterijski rast. Bakterijski biofilm je veoma teško ukloniti tako da je nekad potrebno primeniti hirurški debridman da bi se sprečio rast ćelija [22,23]. Herdon i saradnici su pokazali da pranje rane sapunom i vodom korišćenjem tehnike mlaznog ispiranja može smanjiti naseljenje mikroorganizama za 2 log redukciju u 48 sati i samim tim poboljšati zarastanje rane [24].

1.6.2 Oksidativni halidi

Koriste se kao topikalna antimikrobna sredstva- Klasičan predstavnik je Dakinov rastvor koji ima široko baktericidno dejstvo i efektivnost protiv biofilma, komercijalno *Clorox* (varikina) je 5,25% NaOCl. Korišćen je za vreme prvog svetskog rata razblažen sa vodom u vidu 0,5%, nazvan kao originalni Karel–Dakinov (*Carrel–Dakin*) rastvor. Kasnije je koncentracija smanjena na jednu dvadesetinu zbog toksičnosti prema tkivima u vidu 0,025% NaOCl [25,26]. Ovakva koncentracija ima odlično svojstvo u vidu spektra protiv *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus*, a nije toksičan prema fibroblastima i ne inhibiše zarastanje rane. Potom su Karel i Dakin napravili oksihlorosen (*Clorpactin*), na sličnom nivou ali sa znatno dužim vremenom poluživota.

Povidon jod (*Betadine*) je drugi halid koji se koristi kao topikalni antimikrobni lek. Postoji u tečnoj formi i u vidu masti u različitim koncentracijama, sa varijabilnom aktivnošću pokrivajući Gram-pozitivne i Gram-negativne mikroorganizme. Efektivan je u prvih šest sati. Nanošenje ovog sredstva je bolno, a u retkim slučajevima može dovesti i do toksičnosti jodom, kao i do bubrežne insuficijencije, acidoze i dermatitisa. Toksičan je prema fibroblastima i keratinocitima, ali je i efektivan kada se nanosi na intaktnu kožu [27].

1.6.3 Kiseline

Jedan od predstavnika kiselina je sirćetna kiselina koja se koristi kao dezinfekciono sredstvo za kožu i meka tkiva kod infekcije. Poseduju izraženu antimikrobnu aktivnost na

Pseudomonas aeruginosa, zahteva minimalnu koncentraciju do 0,5% [28]. Međutim, većina sojeva pseudomonasa rezistentnih na antibiotik zahteva koncentraciju od 3% [29]. Borna kiselina je takođe kiselina koja se koristi kao 3%-rastvor i efikasna je u lečenju infekcija izazvanih *Pseudomonas aeruginosa*, ali pokazuje nešto protektivniji efekat na tkivo i ne ometa epitelizaciju [30].

1.6.4 Teški metali

Joni srebra su možda i najčešće korišćeni antimikrotici. Srebro se može naći u sastavu rastvora, krema i tvrdih materijala obloženih srebrom. Srebro se vezuje za proteine i enzime i oštećuje DNK, delujući na inaktivaciju mikroorganizama. 0,5%-tni srebro nitrat je rastvor koji ima dezinfekciono svojstvo. Ne oštećuje epitelizaciju, ali ima ograničenu penetraciju pošto se vrlo brzo vezuje za površne proteine [31]. Zbog hipotone prirode može izazvati osmolarnu diluciju i posledičnu hiponatrijemiju i hipohloremiju. Srebro sulfadiazin (*Sanaderm, Silvadene, Thermazine, Flamazine*) je 1%-tna hidrosolubilna krema koja je kombinacija sulfadiazina i srebra sa antimikrobnom ekifasnošću do 24 časova. Koristi se od 1970. godine do danas kao sredstvo za lečenje opekotina zbog odličnog antimikrobnog delovanja pretežno na *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterococcus*, čak i za neke tipove *Candida albicans* i *Klebsiella pneumoniae*, ali je utvrđeno da dovodi i do usporenog zarastanja. Srebro koje je u sastavu ovog jedinjenja jeste težak metal i negativno utiče na stimulaciju fibroblasta i keratinocita [32,33]. Ograničeno je na površinski sloj zbog vezivanja za proteine. Neželjeni efekat je reverzibilna redukcija granulocita zbog toksičnosti srebra [34]. Preparati sa nanočesticama srebra u jonskom i kristalnom obliku pokazuju bolje rezultate u odnosu na srebrosulfadiazin i ne utiču negativno na spontanu reepitelizaciju.

Bizmut je takođe teški metal koji se koristi za tretiranje opekotina u vidu komercijalnog preparata *Xeroforma*. Koristi se kod malih deepitelizovanih površina ne većih od 1% TBSA zbog svoje toksičnosti [35,36]. Omogućava formiranje granulacionog tkiva te samim tim dovodi do formiranja površine koja može da se pokrije slobodnim kožnim transplantatima. [20]

1.6.5 Antibiotici

Topikalni antimikrobni lekovi bazirani na antibioticima su grupa koja se po svojim biohemijskim partikulama razlikuje od drugih.

Mafenid acetat (*Sulfamylon*) je dostupan u 8,5%-tnoj vodenoj kremi ili u hidrofilnom obliku kao 5%-tni rastvor. Efektivan je kod svih oblika *Pseudomonas aeruginosa* i *Clostridium spp.* [37]. Krema se aplikuje dva puta dnevno i ne zahteva dresing. Ima odličnu penetraciju u eshare i predstavlja sredstvo izbora kod dubokih opekotina ušne školjke budući da prevenira hondritis. Primena mafenid acetata može dovesti do alergijskih reakcija, inaktivacije karbon anhidraze te sledstvene posledične metaboličke acidoze. Može dovesti do povećane koncentracije *Candida albicans* i usporavati proces reepitelizacije. [34]

Gentamicin sulfat (*Gentamycin*) je aminoglikozid, 0,1%-tna hidrosolubilna krema ili rastvor koja ima baktericidno delovanje na Gram-negativne koke i *Pseudomonas aeruginosa*. Praćenje antibiograma je obavezno zbog pojave rezistencije. [38]. Fusidinska kiselina je antibiotik dobijen od gljivice *Fusidium coccineum*. Koristi se kao 2%-tna krema ili rastvor i ima dejstvo na Gram-pozitivne organizme čak i na MRSA sojeve. Zainteresovanost stručne javnosti za kombinaciju antibiotskih masti porasla je u poslednje vreme korišćenjem trostruke antibiotske kreme (Polisporin – neomiksin, bacitracin cink i polimiksin B-sulfat), koja pokriva Gram-pozitivne koke i neke Gram-negativne bacile. Pokazano je da aplikacija antibiotskih krema ne utiče značajno na reepitelizaciju [39-40]. Zato se u nekim državama kod lečenja opekotina drugog stepena, naročito kod dece, predlaže lokalni tretman opekotina mešavinom antibiotskih krema, što je usvojeno kao standardna terapija [41]. U Republici Srbiji nisu registrovane trostruke antibiotske masti već se koristi mešavina gentamicina i fusidinske kiseline u kombinaciji (1:1) koje imaju sličan mehanizam delovanja. Nitrofuracone (Furacin) je mast, rastvor ili krema koja je efektivna protiv MRSA sojeva, takođe pokazuje nešto bolju aktivnost na *P. aeruginosu* u odnosu na Polisporin.

Mupirocin (*Bactroban, pseudomonic acid A*) je antibiotik dobijen od *Pseudomonas fluorescens* i inhibiše izoleucil transportnu RNK sintetazu i protein bakterijske sinteze. Antibiotik je izbora kod MRSA infekcije, Gram-pozitivnih mikroorganizama. Ne treba ga koristiti više od 10 dana budući da stvara rezistenciju.

Nistatin (*Mycostatin, Nilstat*) je antifungicidni antibiotik dobijen od *Streptomyces noursei*. Visoko je potentan i vezuje se za ergosterol i lizira membranu gljivica. Manje doze, do 1.000.000

U/gram u vidu kreme, rastvora, masti se koriste u profilaktične svrhe. Nistatinski prašak i masti u visokim dozama 6.000.000 U/gram koriste se u invazivnim infekcijama gljivicama[42].

1.7 Inflamatorni medijatori u opekotinskoj rani

Mnogi lokalni medijatori se oslobađaju od strane opekotinske rane koji slobodno cirkulišu krvlju. Ovi medijatori imaju važnu, ali isto tako i kompleksnu ulogu u patogenezi nastanka otoka i kardiovaskularnih poremećaja. Većina ovih medijatora povećava permeabilnost i migraciju tečnosti bilo direktno ili indirektno, povećavaju mikrovaskularni hidrostatski pritisak i arteriolarnu vazodilataciju na već povređenu endovaskularnu barijeru. Tačan mehanizam delovanja ovih medijatora je od kliničkog interesa, budući da razumevanje ovih procesa nakon zadobijanja opekotinske rane može doprineti da se farmakološkom modulacijom dovede do suprimiranja odnosno ublažavanja posledica njihovog delovanja. Inhibicijom medijatora bi mogle da se preveniraju negativne posledice, pa i prevencija šoka kao najteže komplikacije opekotinske rane. Nažalost većina strategija direktne blokade medijatora je efektivna samo kod manjih lokalizovanih opekotina uglavnom na malom broju studija, kako na humanom modelu, tako i na životinjskom modelu. Do sada ova istraživanja nisu imala klinički uticaj kod pacijenata sa velikim opekotinama. Ovi medijatori su: histamin, metaboliti arahidonske kiseline, kinin, serotonin, kateholamini, angiotenzin, vazopresin, kiseonični radikali, azotmonoksid, brojni hemokini, citokini i dr.

1.7.1 Eikosanoidi

Eikosanoidi - derivati arahidonske kiseline jedni su od najvažnijih lipidnih medijatora koji se oslobađaju enzimskom konverzijom polinezasićenih masnih kiselina. Oni su metaboliti fosfolipida i nastaju hidrolitičkim delovanjem fosfolipaze A2 [43,44]. Među eikosanoidima, metabolita omega 6 arahidonske kiseline dobro su opisani u fazi hemostaze i inflamacije zarastanja rana [45,46]. Metaboliti kao što su: prostaglandini (PG), tromboksani A2 (TxA2) nastaju delovanjem ciklooksigenaze (COX); leukotrijeni nastaju delovanjem lipooksigenaze (LOX) [47]. Ovi metaboliti, produkovani u različitom vremenskom periodu nakon povređivanja, mogu imati pozitivan i negativan efekat na zarastanje opekotinske rane. Agonističkim i antagonističkim uticajem na ove faktore u ranoj fazi može se doprineti boljem ishodu kod ovakvih povreda.

1.7.1.1 Tromboksan A2 (TxA2)

Tromboksan A2 je dobro opisan u zarastanju rana. On se oslobađa odmah po povređivanju od strane trombocina uz delovanje TxA2 sintetaze (TxAS) i aktivira ireverzibilnu agregaciju trombocita u toku hemostaze [48]. Nedostatak G-proteina vezanog za tromboksan-prostanoid (TP) receptor kod miševa rezultuje produženom krvarenju [49]. Upotreba TP antagonista kod ljudi je pokazala signifikantnu inhibiciju agregacije trombocita i produženu hemostazu [50]. Agregacija trombocita je bitan sistem u zaustavljanju krvarenja, zaštiti organizma od spoljašnjih noxi i u efikasnom zarastanju rana [51,52]. Tromboksan A2 se ne izlučuje samo tokom faze hemostaze već i u fazi inflamacije od strane nekrotičnih ćelija, neutrofila, monocita i endotelnih ćelija [53]. Tromboksan A2 prelazi u njegov metabolit tromboksan B2 (TxB2). Tromboksani i njihovi metaboliti nastaju lokalno u opekotinskoj rani i učestvuju u ishemiji lokalnog tkiva vazokonstrikcijom. Preliminarna *in vitro* istraživanja pokazala su da mogu uticati na zonu staze opekotinske rane [54,55]. Kod pacijenata sa opekotinama inicijalno je uočena povećana zastupljenost tromboksana u odnosu na prostacikline. Pojačano lučenje tromboksana B2 (TxB2) može da dovede do ishemije derma kod termičke povrede i utiče na produbljivanje opekotinske rane [56,57]. Imunobrufen može da utiče na smanjenje hipermetabolizma smanjenjem lučenja lipid peroksidaze i posledičnim intrizičnim oslobađanjem kiseoničnih radikala koji doprinose destruktiji tkiva [58]. Delovanje inhibitora COX u inicijalnom tretmanu, kada je produkcija ovih metabolita najveća, može dovesti do poboljšanja lokalnog nalaza i samim tim olakšati i ubrzati lečenje opekotinske rane.

TxA2 produkovani su od strane krvnih pločica indukuju sintezu inflamatornog citokina IL 6 i PGE2 i supresuju ekspresiju antiinflamatornog makrofagnog markera CD206 uz aktivaciju TP receptora. TxA2 može da sintetiše mikrovaskularno endotelne ćelije i pod COX-2 uslovima promoviše migraciju i angiogenezu [59,60]. U određenim fazama TxA2 može da ima negativan i pozitivan efekat na celokupnu fazu zarastanja.

1.7.1.2 Prostaglandin E (PGE)

Cox 2 enzim nakon povrede stimuliše povećano oslobađanje prostaglandina (PG) uključujući i PGE2. Utiče primarno na vazodilataciju krvnih sudova. Pokazano je da može biti sinergična sa aktivnošću COX-1 i imati ulogu u hemotazi i PGE2 sintezi [61]. U ranoj fazi zarastanja migriraju makrofazi i stromalne ćelije koje proizvode PGE2 i indukuju angiogenezu i proliferaciju fibroblasta koji vrše sekreciju bEGF i samim tim stimulišu zarastanje rana [62,63]. Povećava ekspresiju onkostatina M (OSM) u makrofazima koji aktiviraju EP4 [64]. OSM je sličan citokin sa IL-6 koji deluje kao antiinflamatorni citokin smanjujući ekspresiju TNF α i IL-1 β poboljšavajući zarastanje rane. PGE2 utiče na proliferaciju keratinocita kroz EP2 i EP4 [65].

1.7.1.3 Prostaciklin (PGI₂)

PGI₂ je primarno produkovan od strane endotelnih ćelija i aktivira prostaciklin sintetazu. Prostaciklin ima ulogu u vazodilataciji u perifernom tkivu [66]. Nakon hemostaze bitno je da se ukloni tromb, stimuliše fibrinoliza i poveća produkcija urokinaze koja aktivira plazminogen u fibroblastima te povećava migraciju fibroblasta [67]. Takođe njegov analog (Iloprost i Carbaprostaciklin) može da indukuje vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) [68].

1.7.1.4 Leukotrijeni (LB4, LD4)

Leukotrijeni LB4 i LD4 igraju veliku ulogu u primarnom nastanku otoka kod termičke povrede. U inflamatornoj fazi zarastanja inflamatorne ćelije, pretežno neutrofili, migriraju i čiste nekrotična tkiva sa mesta povrede i započinju inflamatornu reakciju. Povećana količina lučenja LB4 pokazala je nekontrolisanu hemotaksu neutrofila i povećanu količinu inflamatornog odgovora. Inhibicija stvaranja leukotrijena u vidu inhibicije leukooksigenaze dovodi do smanjenja lučenja reaktivnih kiseoničnih radikala (ROS) i samim tim ubrzavanje zarastanja rane [69]. Deplecija leukooksigenaza kod miševa je pokazala povećanu populaciju M2 makrofaga i brže zarastanje [70].

1.8 Primena ekstradevičanskog maslinovog ulja u tretmanu rana

Ekstradevičansko maslinovo ulje je plod drveta *Olea europaea* i poseduje karakteristike topikalnog sredstva. Maslinovo ulje se dobija mehaničkom komresijom plodova masline. Ulje masline sadrži 200 hemijskih komponentni. Sadržaj maslinovog ulja većinski čine masne kiseline kao što su oleinska, linoleinska kiselina i palmitinska kiselina i zastupljene su u oko 95% dela maslinovog ulja. Pulpa i seme masline sadrže i druge komponentne, kao što su polifenoli koje mogu da utiču na biološke procese [71]. Polifenolske komponentne poseduju antimikrobnu aktivnost i antioksidativnu aktivnost i promovišu rekonstrukciju derma [71-73]. Maslinovo ulje se koristi kao produkt za negu kože i kose u kozmetici već dugo vremena u različitim kulturama sveta. Polifenolski ekstrakti u pulpi su oleuropein, oleocanthal i 3-hidroksitirozol. Studije na miševima pokazuju da je kontrakcija rane kod opekotine pune debljine znatno brže nastupa u poređenju sa preparatima kod srebrosulfadiazina i fiziološkog rastvora [74].



Hidroksitirozol utiče na agregaciju trombocita i lučenje derivata u vidu inhibicije arahidonske kiseline [73,75-79]. Polifenolske komponentne, naročito hidroksitirozol, imaju bakteriostatski efekat na Gram-pozitivne i Gram-negativne organizme, a naročito je izraženo njegovo delovanje na *Staphylococcus aureus* [72,73,75]. Ekstradevičansko maslinovo ulje može da utiče na kiseoničke radikale svojim antioksidativnim dejstvom i difuzijom kiseonika [73,80]. Maslinovo ulje može da ubrza debridman rane [74]. Uspostavljanje kožne barijere je ključno u zarastanju rana. Maslinovo ulje promoviše zarastanje rana putem modulacije rane faze inflamacije i stimuluše regeneraciju derma, s tim da ne ometa reepitelizaciju.

Oleocanthal je druga fenolska komponentna maslinovog ulja koja ima anitinflamatorni efekat sličan nesteroidnim antiinflamatornim lekovima. Aktivnošću kao što je inhibicija COX-1 i COX-2 enzima u istim koncentracijama pokazuje 4–5 puta jaču aktivnost od ibuprofena [79,81].

Oleuropein je takođe bitna fenolska komponenta u maslinovom ulju koja inhibira ekspresiju endotelnih adhezivnih molekula VCAM-1 i može inhibirati proliferaciju glatkih mišićnih ćelija te smanjiti mogućnost ishemije zone staze i ishemije derma u inicijalnom tretmanu opekotina [82].

1.9 Primena meda u tretmanu rana

Med je viskozno koncentrovan rastvor šećera produkovana od strane pčela (*Apis mellifera*). Pčele sakupljaju i obrađuju cvetni nektar (cveće ili cvetni med) ili sakupljaju slatke sokove biljaka (medena rosa ili šumski med). Med je jedan od najkompleksnijih prirodnih bioloških produkata koji se koristi od drevnih vremena, kako u ishrani tako i u medicini. Antibakterijsko dejstvo meda prvi je prepoznao holandski naučnik Van Ketel (*Van Kettel*) 1892. godine. Mnogi smatraju da je njegovo antimikrobno dejstvo isključivo osmolarnog tipa zbog velike koncentracije šećera [83-85].



Med poseduje osmolarnost i pH vrednost koje omogućava bakteriostatsko i baktericidno delovanje. Enzim glukoza oksidaza koji se nalazi u hipofaringealnim žlezdama pčela oslobađa glukonolakton i hidrogenperoksid. Hidrogenperoksid stimuliše proliferaciju fibroblasta i epitelizaciju migracijom keratinocita sa ivica rane u manjim koncentracijama, dok u većoj koncentraciji oslobađa veliku količinu kiseoničnih radikala koji štete zarastanju [86-89]. Pored antimikrobnog delovanja hidrogenperoksida postoje različiti tipovi meda koje sadrže i druge supstance koje imaju antimikrobno delovanje.

1.9.1 Manuka med

Manuka med sadrži: metilglioksal, *bee-defensin* 1 i melanoidi [90-92]. Oni se nalaze u različitim nektarima koje skupljaju pčele. Utvrđeno je da med smanjuje inflamaciju i kontrakciju ožiljka svojim antioksidativnim svojstvom, neutralizuje slobodne radikale, deluje baktericidno snižavanjem pH vrednosti sredine. Sve ove karakteristike deluju pozitivno na zarastanje opekotinske rane. Med aktivise fagocitozu i stimulishe proliferaciju B i T limfocita. Pored ovih mehanizama doprinosi aktivaciji monocita oslobađanjem TNF, IL 1 i IL 6 [93]. Sve ovo pokazuje da med doprinosi jačanju lokalnog imunog odgovora. Med pokazuje antiinflamatorno, antiedematozno i antioksidativno svojstvo [90]. Inhibicijom malondialdehida i lipid peroksidaze smanjuje proinflamatorne aktivnosti smanjenjem prisustva polinuklearnih leukocita u okruženju rane [91]. Inhibicija komplementa i inaktivacija nitrogen radikala i supresija kiseoničnih radikala posredovana je fagocitozom monocita [93,94]. Pored toga, smatra se da stimulishe fibroblaste, redukuje fibrozu i posledično nastajanje hipertrofičnih ožiljaka. U poređenju sa nesteroidnim antiinflamatornim lekovima i kortikosteroidima, med ne suprimira epitelizaciju. Antioksidansi smanjuju lučenje slobodnih kiseoničnih radikala i samim tim skraćuju inflamatornu fazu koja je ključna za zarastanje tkiva. Pored toga, med pravi fizičku barijeru i pravi vlažnu sredinu sa visokom viskoznošću, povlačeći vodu osmozom, što ima pozitivan efekat, budući da rane brže zarastaju u vlažnoj sredini [92,95]. Antiinflamatorno dejstvo meda potvrđeno je brojnim istraživanjima. Pokazalo se da med poseduje široko antimikrobno svojstvo na preko 80 vrsta mikroorganizama uključujući Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, aerobe i anaerobe, čak i na rezistentne sojeve kao što su *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) [96,97]. Uočeno je i antifungicidno delovanje na *Aspergillus* i *Penicillium* [98,99]. Istraživanjima je potvrđeno da nije bilo pojave rezistencije kod bakterija na med i niti stvaranje biofilma [100-103].

Med vrši debridman potvrđen u kliničkim studijama [104-106]. Aktivira plazminogen i povećava dejstvo enzima plazmina koji lizira fibrin putem supresije makrofaga. Plazmin razgrađuje fibrin koji se zadržava na površini, ali ne i kolagen ekstracelularnog matriksa koji je potreban za reparaciju tkiva.

Med daje nutritivnu potporu rani putem indirektno osmotske regulacije limfe koja dovodi hranljive materije, a direktno zahvaljujući svom sastavu bogatom karbohidratima, aminokiselinama i mineralima pogoduje zarastanju rane. Studije su pokazale da rane brže zarastaju prilikom korišćenja nutritivnih topikalnih sredstava [95,104-106]. Keratinociti zahtevaju rezervu karbohidrata za migraciju i obnavljanje epitelnog omotača. Glikoliza je glavni mehanizam produkcije energije kod makrofaga, oštećenih tkiva i eksudata, gde je prisustvo kiseonika limitirano. Visoka osmolarnost uzorkuje migraciju tečnosti iz intersticijalnog prostora i daje nutritivnu potporu tkivima pri regeneraciji. Ovakav način ishrane može da bude prisutan samo tokom angiogeneze. Visoka osmolarnost uklanjanja nekrotične materije iz rane i smanjuje potrebnu za hirurškim debridmanom. Niža pH vrednost smanjuje lučenje amonijaka (NH_3), nižim delovanjem ureaze, a samim tim dolazi do transformacije u manje toksični amonijum (NH_4^+ jon), te posledično manjeg oštećenja tkiva. Med stimuliše zarastanje putem aktivacije leukocitinih faktora reparacije i stimulacijom keratinocita transkripcijom gena za TNF, IL-1b i TGF-b [95].

1.10 Primena bioloških materijala u tretmanu rana ili opekotinskih povreda

Biološke pokrivke su sačinjene od tkiva živih organizama. Biološke pokrivke preveniraju gubitak tečnosti, omogućavaju smanjenje gubitka toplote, proteina, elektrolita i smanjuju kontaminaciju rane. Omogućavaju autolitički debridman rane odvajanjem nekrotičnog tkiva i stvaranje granulacione podloge. Ovi procesi su veoma bitni u procesima zarastanja i konačnom izlečenju. Postoji nekoliko privremenih pokrivki u vidu bioloških materijala i to su: alogenski amnion, ksenograft i allograft.

1.10.1 Alogenski amnion

Predstavlja biološku pokrivku koja se koristi od fetalnog amnioma i membrane koja je opisana još 1910. godine [107,108] i služi kao privremena pokrivka za opekotine još od 1952. godine [109]. Amnion se može koristiti kod opekotina parcijalne debljine i omogućuje brže zarastanje, umanjuje bol, pozitivno utiče na modulaciju ožiljka i ublažava infekciju opekotinske rane [108,109]. Može da se koristi kao privremena zamena za kožu.

1.10.2. Ksenograft

To su pokrivke koje dobijamo od strane druge biološke vrste, najčešće svinje. Koristile su se kod opekotina parcijalne debljine kože. Pokazano je da mogu da utiču na ublažavanje bola i nastanak hipertrofičnih ožiljaka [110,111]. Mogu da budu jednako efikasne kao alografti, s tim da su mnogo jeftinije i dostupnije.

1.10.3. Alograft

Predstavlja pokrivku sa genetski iste biološke vrste (čoveka). Ne savetuje se korišćenje alografta kod malih opekotina i kod opekotina koje bi se tretirali ambulantno zbog izrazito visoke cene i ograničene dostupnosti. Upotrebljavaju se kod opekotina parcijalne debljine i kod velikih opekotina za privremeno pokrivanje oštećene kože. Krvni sudovi u prvom naletu urastaju u derm da bi na kraju transplantat bio odbačen od strane organizma.

1.11 Sintetski materijali

U današnje vreme korišćenje sintetskih kompresa za lečenje opekotina je u ekspanziji. One su zamenile biološke pokrivke. Osim što štite od bakterija i gubitka tečnosti, smanjuju bol i služe kao mehanička protekcija, oni održavaju vlažnu sredinu gde rane zarastaju bez ometanja. Brojne polupropustljive višeslojne komprese omogućuju: propustljivost prema vodi, barijeru za bakterije i kontrolu bola. Obično se sastoje od jednog polupropusnog omotača koji omogućava mehaničku barijeru za bakterije i fiziološku transmisiju gasova [112].

Glavna prednost sintetskih materijala u odnosu na biološke su što su oni konstantne strukture, sterilni i dostupni. Nedostatak je visoka cena ovog proizvoda. Između ostalog, brojne studije su pokazale prednost sintetskih membrana u odnosu na topikalne kreme i masti pošto su omogućile brže zarastanje, skraćivanje hospitalizacije i bolju kontrolu bola [113]. Sve sintetske membrane su okluzivne i mogu podstaći infekciju ukoliko se postave preko kontaminiranih rana, a pogotovo preko nekrotičnog tkiva. Potreban je monitoring prilikom njihovog korišćenja.

Tipični primerci sintetskih kompresa:

1.11.1 Poliuretanske pene – su bile prve modern3 pokrivke nastale 1980-ih godina. Njihova prednost je bila u apsorpciji eksudata kod rana sa visokom sekrecijom.[114] Prednost imaju u odnosu na tradicionalne gaze, zato što mogu da se ostave na rani do nekoliko dana, a da ne uzrokuju maceraciju. [115]. Posедуje unutrašnjih sloj koji je porozan sa sunđerom, a spoljašnji mikroporozan radi sprečavanja migracije mikroorganizama iz spoljašnje sredine.

1.11.2 Polupropustljive pokrivke

1.11.2.1 Silikonske pokrivke su dresinzi koji se koristi za prekrivanje rana. Imaju polupropusnu podlogu te štite od spoljašnje sredine. Sastavljen je od silikonskog omotača i ima prednosti u vremenu zarastanja, smanjenju bola i učestalosti previjanja. [116,117]. Koristi se kod rana sa sniženom sekrecijom.

1.11.3 Hidrogelovi

1.11.3.1 Hidrovlakna. Kompresa sa hidrovlaknima poseduje odlične apsorbtivne karakteristike usled formiranja gela pri kontaktu sa eksudatom. Oni su dobijeni od veštački konstruisanih materijala. Mogu da sadrže jone srebra u svom sastavu [118]. Prisustvo jona srebra omogućuje produženo antimikrobno delovanje.

1.11.3.2 Alginati. Alginati su biopolimeri dobijeni iz prirode od smeđih algi. Nemaju toksični i imunološki uticaj na ljudski organizam. Koriste se u vidu kompresa u koji su vezani joni natrijuma i kalcijuma, te pospešuju mogućnost formiranja gela. U alginatnoj smesi mogu da budu impregnirani teški metali, med i druge čestice koje mogu da imaju dodatno antimikrobno delovanje. Imaju visoku moć apsorpcije zbog snažnog hidrofilnog svojstva u formi gela [118,119]. Obezbeđuju apsorpciju tečnosti u suvim sredinama u formaciji gela koja omogućava suvim ranama fiziološku vlažnu sredinu koja pogoduje zarastanju. Vezivanjem mikroorganizama smanjuju kontaminaciju mikroorganizama i posledično uzročnu infekciju rane. Omogućavaju bržu reepitelizaciju i formiranje granulacionog tkiva. Najčešće se koriste kod tretmana davajuće regije, ali se mogu koristiti i kod opekotina parcijalne debljine.

1.11.4 Hidrokoloidne komprese su pokrivke koje se sastoje od više omotača, najčešće tri koji su porozni. Unutrašnji sloj je lako adherentan. Središnji apsorber sastavljen je od metil-celuloze (Hidrogel). Spoljašnji je polupropustan za gasove, ali pravi mehanički barijeru za bakterije. Održava vlažnu sredinu, apsorbuje eksudat. Vlažna sredina je najpogodnija za zarastanje rana [120]. Mnoge paste i puderi u vidu hidrokoloidnih materijala su dostupni na tržištu. Mogu da se koriste kod površnih rana i kod dubokih hroničnih rana.

1.12 Upotreba imunohistohemijskih procedura u procesu zarastanja rana

U zarastanju rana, pa tako i opekotinske rane, rutinski se već dugo koriste imunohistohemijske metode koje se mogu primenjivati za evaluaciju procesa zarastanja.

1.12.1 Ki67

Ki67 antigen je prisutan u ćelijama koje se nalaze u G1, G2, S i M fazi ćelijskog ciklusa. Ćelije koje se nalaze u fazi reparacije imaju pozitivan nalaz na antigen Ki67 [121]. Tkivo kože koje nije povređeno nalazi se u G0 fazi te će Ki67 marker biti negativan. Prema tome, ovaj marker je koristan u određivanju procesa proliferativne faze zarastanja rane [122,123].

1.12.2 Iba 1

Inflamatorni odgovor i inflamatorna faza je druga faza zarastanja rana. Produžena inflamacija je razlog što rane duže zarastaju i prave vidljive ožiljke. Makrofazi su veoma bitni u imunomodulaciji i igraju veliku ulogu u inflamaciji i zarastanju rana. Oni igraju ulogu u fagocitozi, započinjanju inflamacije i završetku inflamacije [124]. Makrofazi izlučuju faktore kao što su epidermalni faktor rasta, keratinocitni faktor rasta, tumorski faktor rasta, stimulišu fibroblaste i keratinocite tako što proliferišu da bi proizveli kolagen i proteine ekstracelularnog matriksa koji dovode do granulacije rane i reepitelizacije [124]. Pojačana aktivnost makrofaga prisutna je pri samom kraju faze inflamacije, dok se aktivnost u proliferativnoj fazi smanjuje. Makrofazi proizvode i visoku koncentraciju MMP9 (matriks metalo proteinaza 9). Iba1 marker se koristi za verifikaciju aktivnosti makrofaga. [125,126]

1.12.3 CD34

Površinski marker CD34 prikazuje nerazvijeni hematopoetskim stem ćelijama (HSCs) i marker je stem ćelija. Multipotentne stem ćelijske populacije igraju veliku ulogu u obnavljanju epitela. Pojačana ekspresija markera CD34 u perifernoj krvi potpomaže regeneraciju folikula i sveobuhvatnom zarastanju rana [127-129].

1.12.4 Citokeratin

Keratin može da se podeli na meki i tvrdi, u zavisnosti od tipova ćelija koje ga ekspresuju. Epitelni keratin je mek keratin i prisutan je u epidermisu. Formira intracelularnu filamensku mrežu koja povezuje ćelije te štiti organizam od mehaničkog stresa i omogućava strukturalni integritet. Igra ulogu u fiziološkim procesima kao što su adhezija, migracija i diferencijacija. Imunohistohemijsko bojenje koje vezuje antitelo na citokeratin može da pokaže bržu epitelizaciju kod rana [130,131].

2.0 Ciljevi i hipoteze

Ciljevi istraživanja

1. Ispitati lokalno delovanje inhibitora ciklooksigenaze na proces zarastanja opekotinske rane u odnosu na standardni preparat antibiotske masti
2. Ispitati lokalno delovanje maslinovog ulja na proces zarastanja opekotinske rane u odnosu na standardni preparat antibiotske masti
3. Ispitati lokalno delovanje manuka meda na proces zarastanja opekotinske rane u odnosu na standardni preparat antibiotske masti
4. Ispitati karakteristike formiranog ožiljka kod navedenih modela topikalnog tretmana
5. Uporediti koji od preparata (inhibitori ciklooksigenaza, maslinovo ulje i manuka med) ima najbolji efekat u procesu zarastanja rane

Hipoteze istraživanja

1. Upotrebna inhibitora cikloksigenaza utiče na inicijalno smanjenje dubine opekotine i posledično brže zarastanje u odnosu na standardni preparat antibiotske masti.
2. Upotrebna ekstradevičanskog maslinovog ulja utiče na inicijalno smanjenje dubine opekotine i posledično brže zarastanje opekotinske rane u odnosu na standardni preparat antibiotske masti.
3. Upotrebna manuka meda utiče na brže zarastanje rane u odnosu na standardni preparat antibiotske masti.
4. Formirani ožiljak kod opekotina tretiranih preparatima meda će imati najbolje kozmetske i histološke karakteristike.
5. Najbrže zarastanje očekuje se kod opekotina tretiranih sa manuka medom.

3.0 Materijal i metode

3.1 Izbor modela

Da bi se proučavao proces zarastanja opekotinske rane, formiranje i evaluacija ožiljka, potrebno je izabrati animalni model koji će u odnosu na patofiziološke mehanizme i način formiranja ožiljka biti što približniji ljudima. Postoje mnogi modeli koji se koriste u procesu zarastanja opekotinskih rana, a nijedan od njih nije savršen. Istraživanja na ljudima su često i najbolja, budući da su najpribližnija procesu zarastanja, ali nekada je praktično nemoguće sakupiti dovoljan broj pacijenata sličnih povreda, niz činjenica i uticaja koje bi mogle da igraju ulogu u zarastanju. Nemogućnost uzimanja biopsija takođe je jedan od problema pri radu na ljudskom organizmu i ljudskom tkivu.

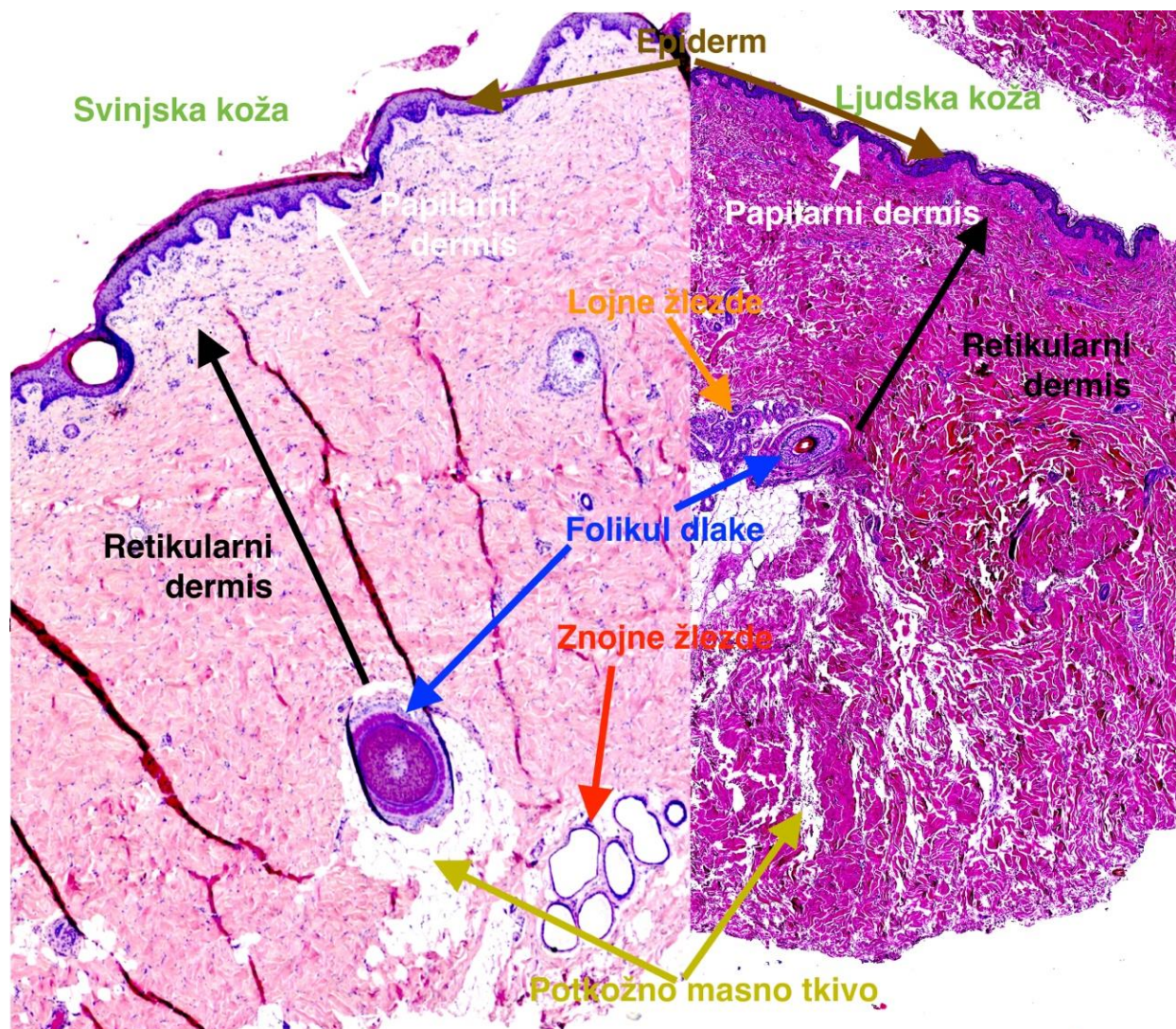
Istraživanja na životinjskom materijalu *in vivo* omogućavaju nam da imamo jednake uslove zarastanja i da eliminišemo spoljašnji faktor. Drugo pitanje je odabir životinjskog modela.

Mali sisari, zečevi, pacovi, miševi su male životinje koje imaju svoje prednosti budući da su laki za rukovanje, jeftini, ali veliki problem predstavlja to što se mehanizam zarastanja prilično razlikuje od ljudskog. Derm i epiderm kod ovih životinja jako su tanki, dlaka je mnogo gušća, postoji muskularni sloj (*panniculus carnosus*) ispod derma, dok ga kod ljudi nema, te je proces zarastanja pretežno baziran na procesu kontrakcije [132,133]

Model koji je najpribližniji ljudskom predstavljaju veliki sisari kao što su svinje [134,135].

Sličnost ljudske i svinjeske kože je velika i ogleda se u:

1. debljini epidermisa (od 50 do 120 μm kod čoveka, a 30–140 μm kod svinje);
2. debljini dermisa (od 500 do 1200 μm , a kod čoveka od 500 do 1800 μm kod svinje);
3. relativno sličnom odnosu epidermisa i dermisa (kod čoveka 1:10, a kod svinje 1:13);
4. razvijenom papilarnom dermisu;
5. distribuciji krvnih sudova i adneksa kože;
6. dobro razvijenom potkožnom masnom tkivu;
7. sličnim biohemijskim karakteristikama dermalnog kolagena.



Slika 6. – Sličnosti ljudske i svinjske kože (originalna slika)

Raspored dlake je kod svinja proređen, što je naročito izraženo kod vrsta kao što su Landras i Jorkšir. Ovaj podatak je značajan budući da adneksi igraju veliku ulogu u procesu epitelizacije. Za razliku od ljudske kože, svinjska koža ne sadrži lojne žlezde i ima izrazito bogato razvijene znojne žlezde. Sličnost ljudskog i svinjskog modela zarastanja po studijama je oko 80% slučajeva, dok je kod glodara oko 55% [132,134,136].

3.2 Izbor topikalnog sredstva

Antibiotske masti (*Stanicid* + *Gentamycin* 1:1) predstavljaju preparat koji je korišćen u ovoj studiji budući da se pokazao kao zlatni standard kako za pedijatrijsku [39,41] tako i za adultnu populaciju. *Stanicid* (fusidinska kiselina) je preparat koji utiče na Gram-pozitivne mikroorganizme, dok gentamicin utiče na Gram-negativne mikroorganizme. Upotreba antibiotskih masti nije dovela do ometanja epitelizacije, što je slučaj sa preparatima na bazi srebra [40].

Preparat brufen krema je korišćen budući da utiče na inhibiciju stvaranja derivata arahidonske kiseline. Neselektivni inhibitor je enzima COX 1 i COX 2. Utiče na stvaranje i produkciju TxA₂, koji mogu u prvim danima da dovedu do ishemije derma, što je pretežno vidljivo u zoni staze po Džeksonu. [57, 58]

Ekstradevičansko maslinovo ulje je korišćeno zbog svog antimikrobnog delovanja [75] i zbog podataka iz literature da može uticati na produkciju derivata arahidonske kiseline [76,77,79], pa samim tim i na zonu staze po Džeksonu.

Manuka med u alginatu je preparat koji je korišćen zbog antimikrobnog delovanja meda na mikroorganizme i zbog svog hranljivog sastava te bi trebalo da ubrza epitelizaciju kod opekotinskih rana i omogući potpuno zarastanje, dok je nosač bio alginat zbog sposobnosti formiranja hidrogela, vlažne sredine i ubrzavanje procesa epitelizacije [85, 88, 95].

3.3 Tok eksperimenta

Istraživanje je sprovedeno u potpunosti kao eksperimentalno prospektivno.

U ogledu je korišćeno devet zdravih oglednih životinja (svinja) plemenite rase Landras, ženskog pola, telesne mase 25–30 kilograma, uzrasta između dva i tri meseca, koje su prestale da sisaju, odabrane metodom slučajnog izbora. Inicijalni pregled je obavljen na Institutu za stočarstvo Beograd-Zemun u ambulanti predviđenoj za pregled i lečenje oglednih životinja. Nakon pregleda

i utvrđivanja da ne postoji kontraindikacija za sprovođenje oglada (sistemska bolest, drugi kormobiditet), sedam dana pred početak oglada životinje su raspoređene u individualne kaveze i bio im je obezbeđen slobodan prilaz hrani i vodi. Temperatura prostorije u kojoj su boravile životinje bila je između 20 i 25 °C, vlažnost vazduha $55\% \pm 1.5\%$, sa ciklusom svetlost-tama po 12 sati. Nije bilo životinja koje su nakon nanošenja opekotina razvile neki drugi kormobiditet ili opekotinsku bolest, te inicijalno nijedna životinja nije bila automatski isključena iz studije i nije trebala da bude lečena od strane veterinara zaduženog za dobrobit oglednih životinja.

Životinje su uvedene u opštu anesteziju sa diazepamom 1,1 mg/kg i ketaminom 15 mg/kg aplikovanim intramuskularno u vrat [137]. Potom se brijala koža leđa. Nakon toga, priprema operativnog polja načinjena je aerosolom, a ne trljanjem, da se ne bi izazvala hiperemija kože koja može uticati na dubinu nanete opekotine. Potom se pristupilo nanošenju kontaktnih opekotina mesinganim nastavkom zagrejanog grejača na 92 °C u kontaktu sa kožom od oko 15 sekundi. Mesinganim nastavkom nanošeno je osam polja kontaktnih opekotina na leđima životinje uz kičmeni stub na jednakoj udaljenosti. Ukupno je bilo 72 polja opečenih površina na 9 životinja. Prvih sedam dana po nanošenju opekotinskih rana sprovedena je postoperativna analgezija analginom (metamizol natrijum) 25mg/kg, aplikovano intramuskularno.

Nanošene su duboke dermalne opekotine gde se klinički može videti uniformna beličasta boja u centralnom delu, rubno polje staze i okolna hiperemija [138].



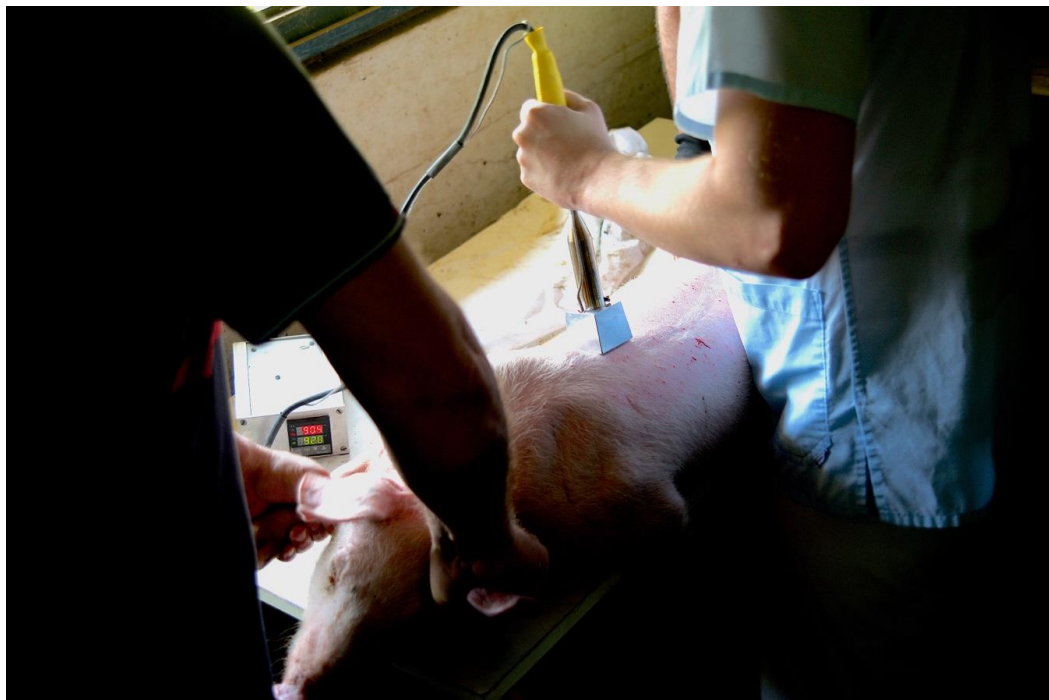
Slika 7. Opekotine nanošene na leđa životinje na pravilnom odstrojanju od kičmenog stuba (originalna fotografija)



Slika 8. Opekotinske rane na leđima eksperimentalne životinje uz korišćenje principa asepsa i antiseptičnosti (originalna slika)



Slika 9. Ujednačen pritisak žarača u kontaktu od 15 sekundi (originalna slika)



**Slika 10. Kutija sa termometrom pokazuje temperaturu mesinganog žarača
(originalna slika)**

Aparat za nanošenje opekotina

Opekotine su se nanosile posebno dizajniranim instrumentom. Aparat poseduje:

- termoregulator – proizvođač *Yuyao Gongyi Meter*; tip: xmtg 908; tačnost 0,5%.
- grejač – proizvođač: *LUX*; tip: 539390; snaga: 150 W-230 V.
- mesingani žarač koji je namenski napravljen sa glatkom kontaktnom površinom dimenzija 47 x 47 mm u koji je integrisana PT 100 sonda.



Slika 11. Aparat za nanošenje opekotina (originalna slika)

Medikamenti koji su korišćeni za uspavljivanje ogleadne životinje prilikom nanošenja opekotine i postoperativnu analgeziju:

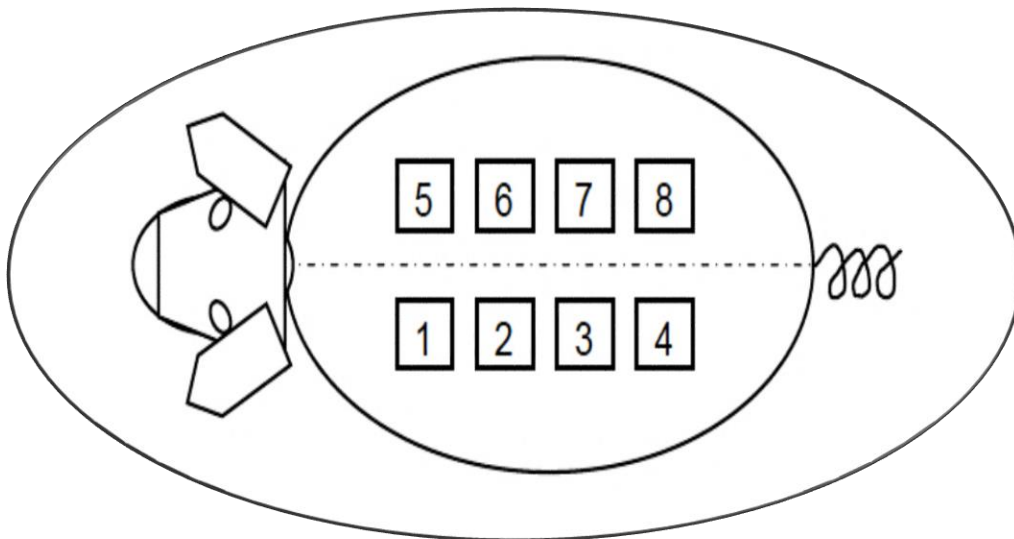
- Vetaketam 50 ml (ketamin) (100 mg/1ml) ampula; proizvođač: VET-AGRO Multi trade Company Sp. z.o.o : aplikovano 15 mg/kg (intramuskularno)

- Bensedin (Diazepam) (10 mg/2 ml) ampula; proizvođač: GALENIKA a.d.; aplikovano 1,1 mg/kg (intramuskularno)
- Prvih sedam dana postoperativna analgezija: Analgin (Metamizol natrijum)(50 g/100ml); proizvođač: ALKALOID AD SKOPJE; aplikovano 0,5 ml/10kg (intramuskularno).

Ogled je trajao 60 dana i sve životinje su vraćene u prirodni zapat.

3.4 Formiranje uzorka i grupa

Opekotine su bile grupisane u četiri kategorije: tri eksperimentalne i jedna kontrolna.



Slika 12. Šematski prikaz opekotina (zahvalnost prof. dr M Jovanoviću)

Opečene površine 1 i 8 bile su tretirane preparatom iz Grupe II; opečene površine 2 i 7 su bile tretirane preparatom iz Grupe I, opečene površine 3 i 6 su bile tretirane preparatom iz Grupe III, a opekotine 4 i 5 bile su tretirane preparatom iz Grupe IV.



Slika 13. Prikaz previjanja eksperimentalne životinje i vraćanje u specijalan kavez

(originalna slika)

Grupa I (18 opečenih površina) (kontrolna – antibiotska mast): obavljena je toaleta antiseptičnim sredstvom – oktaniseptom, potom previjanje preparatom antibiotske masti (kombinacija stanicid – gentamicin mast 1:1), gazom, zavojem i zaštitnim odelom. Opekotnska rana previjala se na treći dan kombinacijom antibiotskih masti do završetka spontane reepitelizacije. Tokom nošenja zaštitnog odela i zavojnog materijala životinje su bile kontrolisane dva puta dnevno od strane

čuvara, da ne bi došlo do neželjenih događaja. Na svakom previjanju pratili su se klinički znaci zarastanja uz fotodokumentaciju i pojavu znakova epitelizacije kao i slikanje sa IC kamerom.

Grupa II (18 opečenih površina) (5%-tni brufen gel i antibiotska mast): načinjena je toaleta antiseptičnim sredstvom – oktaniseptom; inicijalno prva tri dana opekotina je previjana svakodnevno ibuprofen gelom, gazom, zavojem i zaštitnim odelom. Trećeg dana po uklanjanju zavojnog materijala, nastavljeno je previjanje kombinacijom antibiotskih masti (stancid – gentamicin mast 1:1) na treći dan do završetka sponatne reepitelizacije. Tokom nošenja zaštitnog odela i zavojnog materijala, životinje su bile kontrolisane dva puta dnevno od strane čuvara, da ne bi došlo do neželjenog događaja. Na svakom previjanju pratili su se klinički znaci zarastanja uz fotodokumentaciju i pojavu znakova epitelizacije kao i slikanje sa IC kamerom.

Grupa III (18 opečenih površina) (manuka med (*Algivon plus*) u alginatu): obavljena je toaleta antiseptičnim sredstvom oktaniseptom, previjanje se vršilo na treći dan manuka medom u vidu komprese sa alginatnim nosačem, gazom, zavojem, zaštitnim odelom do završetka spontane reepitelizacije. Tokom nošenja zaštitnog odela i zavojnog materijala životinje su kontrolisane dva puta dnevno od strane čuvara, da ne bi došlo do neželjenog događaja. Na svakom previjanju pratili su se klinički znaci zarastanja uz fotodokumentaciju i pojavu znakova epitelizacije kao i slikanje sa IC kamerom.

Grupa IV (18 opečenih površina) (ekstradevičansko masliovo ulje): obavljena je toaleta antiseptičnim sredstvom oktaniseptom, previjanje se vršilo na treći dan gazom natopljenom ekstradevičanskim maslinovim uljem, suvom gazom, zavojem i zaštitnim odelom do završetka spontane reepitelizacije. Tokom nošenja zaštitnog odela i zavojnog materijala životinje su kontrolisane dva puta dnevno od strane čuvara, da ne bi došlo do neželjenog događaja. Na svakom previjanju pratili su se klinički znaci zarastanja uz fotodokumentaciju i pojavu znakova epitelizacije kao i slikanje sa IC kamerom.

Topikalna sredstva koja su korišćena u tretmanu opekotinskih rana:

- Brufen krema 50 g (*Ibutom Cream* – DOLORGIET GMBH & CO. KG) (aktivna supstanca: 5%-tni ibuprofen)

- Stanicid mast 10 g (Hemofarm A.D.) (aktivna supstanca: 2%-tna fusidinska kiselina)
- Gentamicin mast (GALENIKA A.D.) (aktivna supstanca: 1%-tni gentamicin)
- Algivon plus (*Advancis Medical-England*) (aktivna susptanca: 100%-tni manuka med u alginatu)
- Ekstradevičansko maslinovo ulje (*Physis of Crete by Asmarianakis Family – Eastern Crete – Greece, 0,2% low acidy*) (aktivna supstanca: 100%-tno ekstradevičansko maslinovo ulje)

3.5 Morfometrijska analiza opekotinske rane i ožiljka:

Svaka opekotina se beležila na papir shematski radi lakše orijentacije.

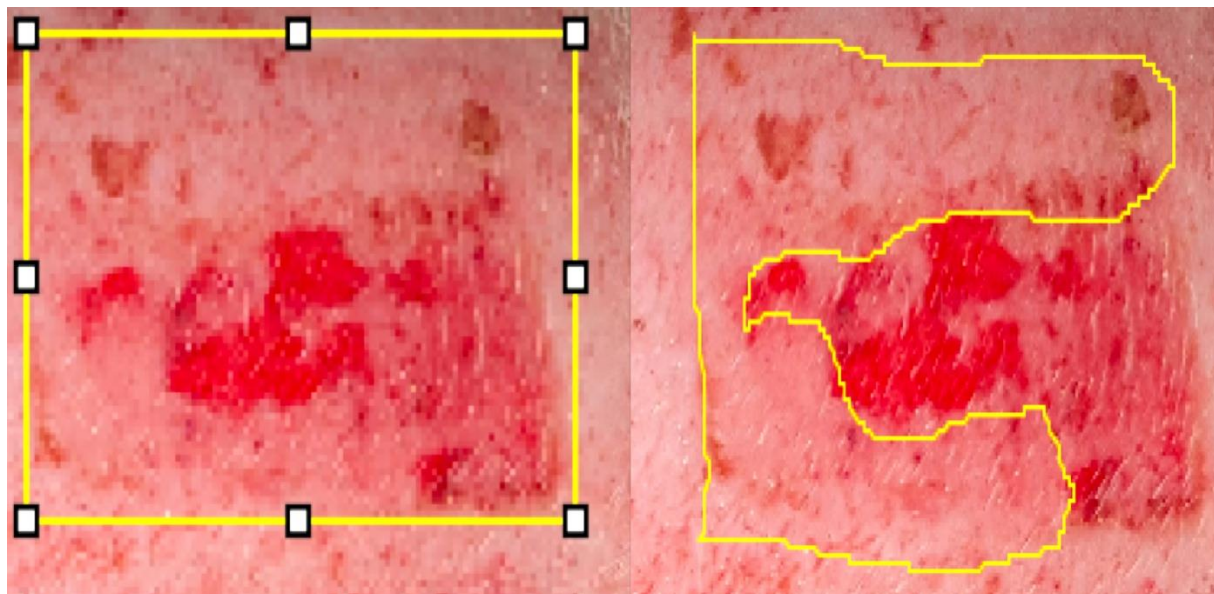
Evaluacija rane infracrvenom kamerom vršila se *Flir one Pro* kamerom, a fotografisanje opekotina i nastalog ožiljka fotoaparatom marke *Nikon* sa makroskopskim objektivom.

Fotografije su obrađene i analizirane u programu *Fiji (ImageJ)*.

3.6 Merenje površine reepitelizacije (REP) (morfometrija ili planimetrija)

Makroskopska evaluacija opekotine:

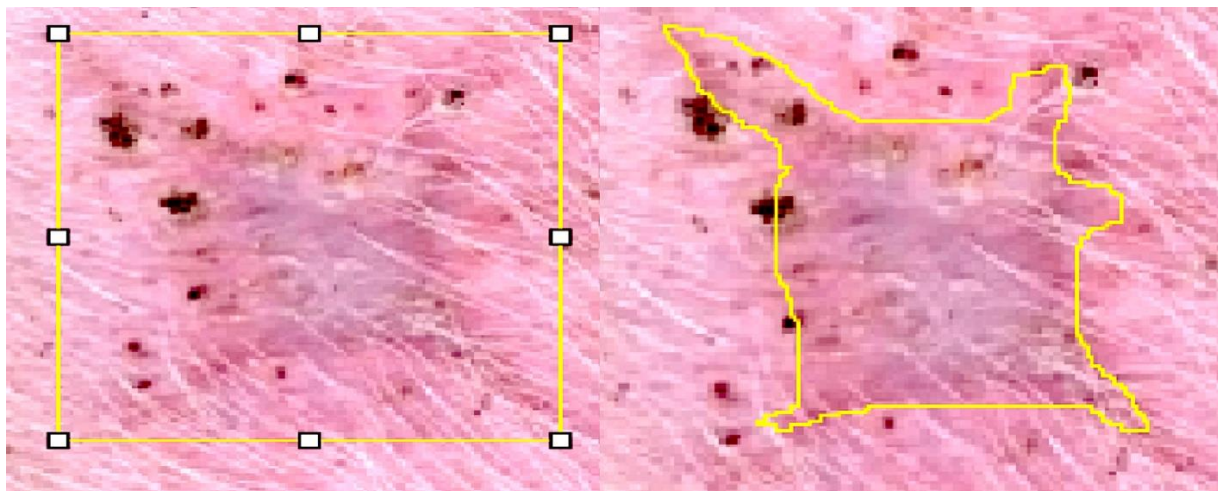
1. vreme proteklo od momenta nanošenja termičke povrede pa sve do potpune epitelizacije;
2. smanjivanje površine otvorene rane tokom vremena.



Slika 14. Merenje planometrije u *Fiji* programu (originalna slika)

Evaluacija ožiljka:

Makroskopski se računao procenat kontrakcije rane tokom zarastanja te posledično sažimanje ožiljka.



Slika 15. Merenje površine kontrakcije ožiljka (originalna slika)

Estetski izgled ožiljka se procenjivao sa Vankuverskom skalom:

Vankuverska skala ožiljka				
Pigmentacija	Vaskularizacija	Elevacija	Rastegljivost	Skor
Normalna	Normalna	Ravan	Normalna	0
Hipopigmentacija	Ružičasta	sa elevacijom < 2 mm	Umanjena blažeg stepena	1
Hiperpigmentacija	Crvena	Elevacija >2 mm i < 5mm	Umanjena težeg stepena	2
	Ljubičasta	Elevacija > 5 mm	Tvrda	3
			Grudvičava	4
			Kontraktura	5

Tabela 1. - Vankuverska skala ožiljka

3.7 Histološka evaluacija opekotinske rane i ožiljka

3.7.1 Uzimanje patohistoloških uzoraka

Biopsija kože su se uzimale 1., 2., 3. 4., 8.,11., 14.,18., 21. i 60 . dana sa 3 mm i 6 mm biopterom kože i skalpelom u vidu elipsaste ekscizije. Za verifikovanje dubine opekotinske rane su se uzimale biopsije kože 1., 2., 3. i 4. dana. Radi praćenja inflamatorne i proliferativne faze zarastanja su se uzimale biopsije kože 4., 8., 11., 18. i 21. dana. Šezdesetog dana su se uzimale biopsije radi evaluacije faze maturacije ožiljka.



Slika 16. Uzimanje biopsije sa 6 mm biopterom (originalna slika)

Histološka evaluacija opekotine: podrazumevala je dubinu oštećenja derma – demarkacione linije sa posebnim osvrtom na proširenje inflamacije epitela koji se pruža unutar apendiksa dlaka i žlezdanih struktura u odnosu na sledeće parametre: 1) kolagen, 2) krvni sudovi, 3) folikularne epitelijalne ćelije, 4) mezenhimalne, nervne i glatkomišićne ćelije. Za bojenje preparata su korišćene metode *Hematozin eozin* i *Mason trihrom*.

Histološki parametri evaluacije ožiljka: 1) debljina epiderma, 2) debljina epidermalnih prečki, 3) debljina ukupnog derma, 4) prisustvo i debljina organizovanog granulacionog tkiva sa rasporedom vlakana kolagena, 5) preostali normalni dermis ispod granulacionog tkiva, 6) prisutnost dlaka i znojnih žlezda zaraslih opekotina. Za bojenje preparata su korišćene metode *Mason trihrom* i *Hematozin eozin*.

3.8 Histološka, histohemijska i imunohistohemijska obrada

Uzorci tkiva dobijeni bioptrom su dehidrirani rastućim koncentracijama alkohola (70, 80, 95 i 100%) i pročišćeni ksilolom, nakon čega je usledilo kalupljenje u parafin. Parafinski kalupi su sečeni na mikrotomu marke Sakura na debljinu od 5 μm , a dobijeni preseki su bojeni standardnim hematoksilin eozin (H&E), mason trihromnim bojenjem, histohemijskim bojenjem na *Picrosirius red* kao i imunohistohemijskim bojenjem na (Ki67, Iba1 i citokeratim).

Imunohistohemijsko bojenje je zahtevalo antigen „retrival“ reakciju koja podrazumeva zagrevanje isečaka u odgovarajućem puferu na 850 W u mikrotalasnoj peći tokom 20 minuta, nakon čega su se na temperaturi od 25 °C isečci ohladili u trajanju od 30 minuta. Po završetku hlađenja isečci su bili isprani četiri puta u puferu (TBS, pH=7,4) i inkubirani dva sata sa 10% normalnim kozijim serumom radi blokiranja nespecifičnog bojenja. Nakon toga je na preparate bilo aplikovano primarno antitelo i to: zečije monoklonalno antitelo (Abcam, ab109025) u razblaženju 1:150. Nakon aplikacije pločice su preko noći ostavljene u frižideru na 4 °C. Sledećeg dana preparati su se na temperaturi od 25 °C, inkubirali 15 minuta sa 0,3%-tnim vodonik-peroksidom radi eliminisanja aktivnosti endogene peroksidaze, a zatim jedan sat sa HRP (*horseradish peroxidase*) konjugovanim sekundarnim antitelom. Kao hromogen za obeležavanje antitela korišćićemo 3, 3' diaminobenzidin – (DAB) hromogen (Abcam, ab64238). Kao kontrastana boja korišćiće se Majerov hematoksilin, a preparati su se nakon bojenja montirali DPH medijumom (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*). Preparati su bili analizirani na mikroskopu marke *Leica DMLB 100T* i fotografisani na uveličanju 400 x kamerom *Leica MC 190 HD*.

3.9 Infracrvena kamera (*Flir one Pro*)

Na svakom previjanju koristila se termografija sa portabilnom *Flir One* kamerom povezanom na smart telefon. Verifikovala se temperatura tkiva opečene regije te se utvrđivalo kolika je bila razlika u temperaturi između opečene regije i nepovređene kože.



Slika 17. – Prikaz termalne FLIR one kamere (originalna slika)

3.10 Statistička obrada podataka

Za analizu primarnih podataka korišćene su deskriptivne statističke metode i metode za testiranje statističkih hipoteza. Od deskriptivnih statističkih metoda korišćene su mere centralne tendencije (aritmetička sredina), mere varijabiliteta (standardna devijacija) i relativni brojevi (pokazatelji strukture). Od metoda za testiranje statističkih hipoteza korišćene su parametarske statističke analize (*One Way ANOVA*, *Post hoc Tukey test*) kao i neparametarske statističke analize (*Fisher's exact test*, *Mann-Whitney U test* i *Kruskal-Wallis H test*). Hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti (α nivo) od 0,05. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Obrada podataka rađena je primenjivanjem standardnog statističkog paketa (*IBM SPSS Statistics 26*).

Za izradu grafikona i tabela korišćen je programski paket *Microsoft Office Word 2007*.

U ovom radu rezultati su prikazani fotografijama, mikrofotografijama, tabelama i grafikonima.

3.11 Protokol istraživanja

Protokol 1 se koristio za planimetriju, utrđivao se procenat zarasle površine tokom vremena.

		0 Dan	3 Dan	7 dan	10 Dan	14 Dan	17 dan	20 Dan	23 Dan	30 Dan	31 Dan	32 Dan
Svinja X	Brufen 1											
	Brufen 2											
	K 1											
	K 2											
	MM 1											
	MM 2											
	EMU 1											
	EMU 2											

Protokol 1.

U Protokol 2 se koristio za izračunavanje ukupnog estetskog izgleda ožiljka po Vankuverskoj skali i sažimanje u odnosu na ukupnu površinu predhodno opečene površine.

Evaluacija ožiljka		
60 DAN	VANKUVERSKA SKALA	SAŽIMANJE
Svinja Z	Brufen 1	
	Brufen 2	
	K 1	
	K 2	
	MM 1	
	MM 2	
	EMU 1	
	EMU 2	

Protokol 2.

Protokol 3. se koristio za izračunavanje histoloških parametara opekotinske rane kod kojih je načinjena biopsija.

Topikalno sredstvo - Dan praćenja				
	epidermis	epidermalne prečke	granulaciono tkivo	retikularni derm
Broj svinje:				
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
AVERAGE				
AVERAGE µm				
75 piksel =				
piksel =				
1 px = µm				

Protokol 3.

Protokol 4 je utvrđivao razliku u temperaturi između opečene površine i neopečene kože u odnosu na proteklo vreme zarastanja opekotinskih rana.

		Epitelizacija 14 dana	Epitelizacija 14–21 dana	Epitelizacija preko 21 dana	Temperatura	Normalna temperatura	Razlika u temp
Svinja X	Brufen 1						
	Brufen 2						
	K 1						
	K 2						
	MM 1						
	MM 2						
	EMU 1						
	EMU 2						

Protokol 4.

4.0 Rezultati

4.1 Analize dubine opekotinske rane

Dubina opekotinske rane verifikovala se sa tri tehnike: makroskopskom analizom, biopsijom rane (histološki) i sa termografijom (*Flir One Pro*).

4.1.1 Makroskopska analiza opekotinske rane

Sve opekotine po nanošenju imale su ujednačenu homogenu beličastu boju koja je odgovarala dubokoj dermalnoj opekotini.

4.1.2 Histološka evaluacija opekotinske rane

Nulti dan

Nakon nanošenja opekotina (nulti dan) uzeta je biopsija kod četiri ogledne životinje radi utvrđivanja histopatološke dubine opekotine i njenih histopatoloških odlika (debljina nekrotičnog debrisa i neoštećenog retikularnog dermisa).

Srednja vrednost debljine nekrotičnog detritusa svih ispitivanih opekotina za nulti dan iznosile su $360,39 \pm 171,39 \mu\text{m}$, dok je medijana iznosila $321,02 \mu\text{m}$. Intaktni retikularni dermis svih opekotina za nulti dan bio je prosečne debljine $1608,56 \pm 350,72 \mu\text{m}$, dok je medijana iznosila $1734,96 \mu\text{m}$.

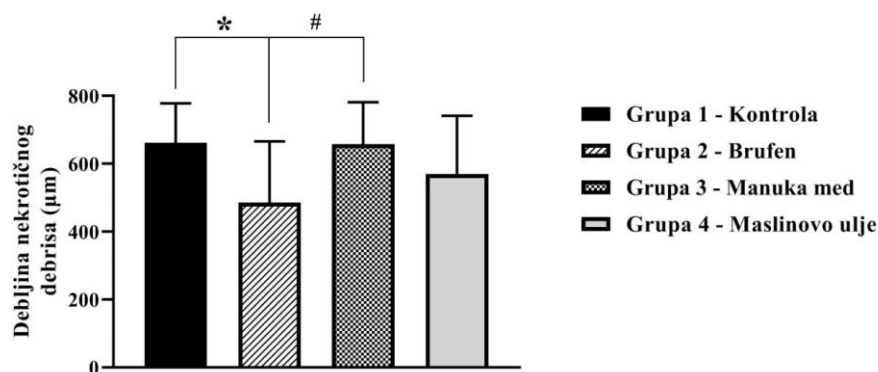
Treći dan

Trećeg dana kod načinjenih opekotina utvrđene su srednje vrednosti debljine nekrotičnog debrisa i intaktnog retikularnog dermisa (Tabela 2). Nađena je statistički značajna razlika u debljini nekrotičnog debrisa ($\chi^2 = 13,04$; $p = 0,005$) i intaktnog retikularnog dermisa ($\chi^2 = 23,03$; $p < 0,001$) kod različitih tretmana opekotina.

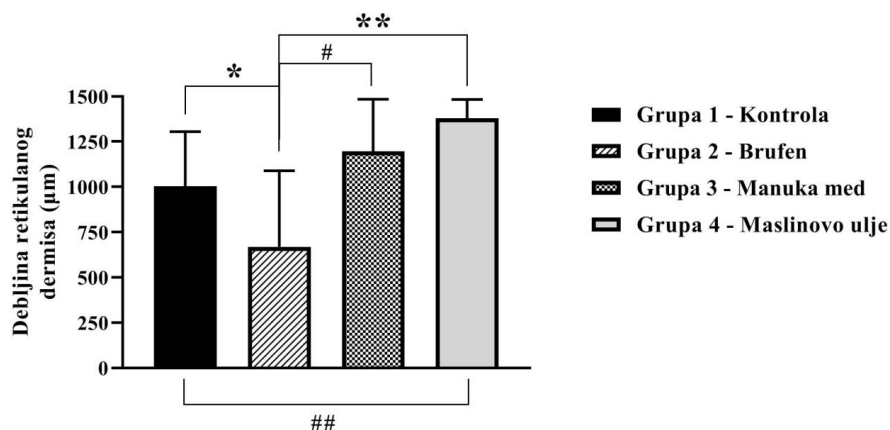
Grupa 2 – Brufen je imala statistički značajno manju prosečnu debljinu nekrotičnog detritusa u odnosu na Grupu 1 – Kontrola ($U = 85,00$; $p = 0,001$) i Grupu 3 – Manuka med ($U = 97,00$; $p = 0,005$) (Grafikon 1). Kad je u pitanju prosečna debljina intaktnog retikularnog dermisa, Grupa 2 – Brufen je imala manje vrednosti u odnosu na Grupu 1 – Kontrolu ($U = 94,00$; $p = 0,004$), Grupu 3 – Manuka med ($U = 85,00$; $p = 0,001$) i Grupu 4 - Maslinovo ulje ($U = 62,00$; $p < 0,001$). Takođe je pronađena značajna razlika između prosečne debljine intaktnog retikularnog dermisa Grupe 1 – Kontrola i Grupe 4 – Maslinovo ulje ($U = 91,00$; $p = 0,003$) (Grafikon 2).

	Grupa	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)	Medijana (M)
Nekrotični detritus (μm)	Grupa 1 – Kontrola	662,35	115,93	664,58
	Grupa 2 – Brufen	485,63	180,51	465,23
	Grupa 3 – Manuka med	657,70	123,86	662,53
	Grupa 4 - Maslinovo ulje	570,22	171,57	566,67
Intaktni Retikularni dermis	Grupa 1 – Kontrola	1003,47	302,69	913,64
	Grupa 2 – Brufen	669,43	617,43	442,03
	Grupa 3 – Manuka med	1196,01	287,83	1180,44
	Grupa 4 - Maslinovo ulje	1379,67	379,00	1533,33

Tabela 2. Srednje vrednosti debljine nekrotičnog detritusa i intaktnog retikularnog dermisa kod različitih tretmana opekotina (3. dan)

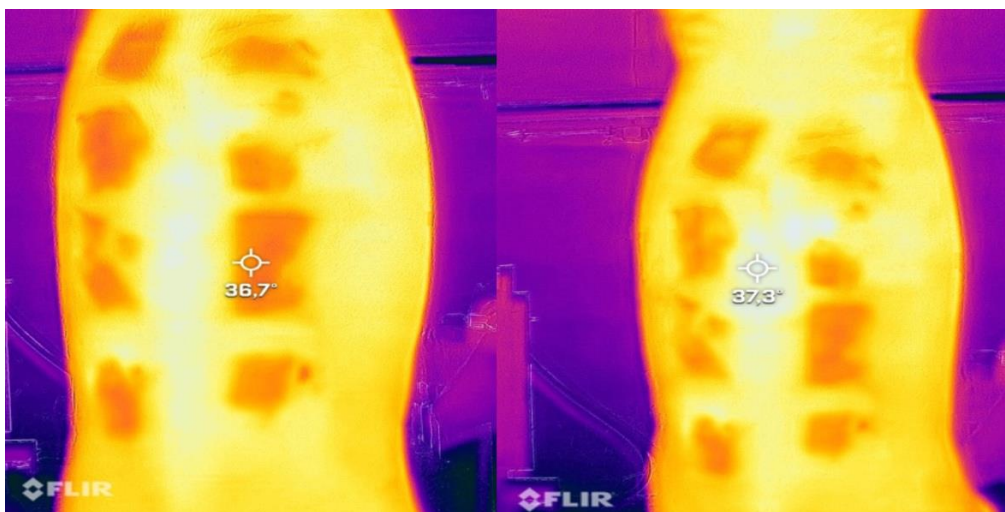


Grafikon 1. Srednje vrednosti debljine nekrotičnog debrisa – treći dan
(*,# $p < 0,05$)



Grafikon 2. Srednje vrednosti debljine intaktnog retikularnog dermisa – treći dan (*, #, ## p < 0,05; ** p < 0,001)

4.1.3 Termografijska evaluacija opekotinske rane



Slika 18. – Prikaz termovizijske procene dubine opekotine u razlici u temperaturi neopečenog dela kože i opečene regije (prvi dan) (originalna slika)

Dokazana je statistički značajna razlika u visini temperatura između neopečene površine tela i površine opekotine u odnosu na različite periode epitelizacije $F(2,69) = 147,52; p < 0.001$. *Post hoc Tukey test* je pokazao da se opekotinske povrede međusobno razlikuju u visini temperature. Najveća razlika u temperaturi uočavala se kod opekotina kod kojih je period epitelizacije trajao preko 21 dan, dok je najmanja razlika uočena kod opekotina kod kojih je period epitelizacije trajao do 14 dana (Tabela 3).

Period epitelizacije	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)
U 14 dana (površna dermalna)	0,78	0,26
14–21 dan (mezodermalna)	1,60	0,34
Preko 21 dan (duboka dermalna)	2,66	0,27

Tabela 3. Srednje vrednosti razlike u temperaturi površine opekotine i okolne kože u odnosu na period epitelizacije (°C)

Uz pomoć *One Way ANOVA* testa dokazana je statistički značajna razlika u razlici temperatura između površine tela i površine opekotine $F(3,68) = 3,95$; $p = 0,03$. *Post hoc Tukey* test je pokazao da je razlika u temperaturi najveća kod kontrolne grupe i da se statistički značajno razlikuje od Grupe 2 – Brufen, gde je razlika u temperaturi najniža (Tabela 4).

Tabela 4. Prosečna vrednost razlike u temperaturi (°C)

Kategorije	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)
Grupa 1 – Kontrola	1,84	0,65
Grupa 2 – Brufen	1,22	0,49
Grupa 3 – Manuka med	1,35	0,60
Grupa 4 – Maslinovo ulje	1,44	0,83

4.2 Patohistološko praćenje proliferativne faze zarastanje opekotinske rane

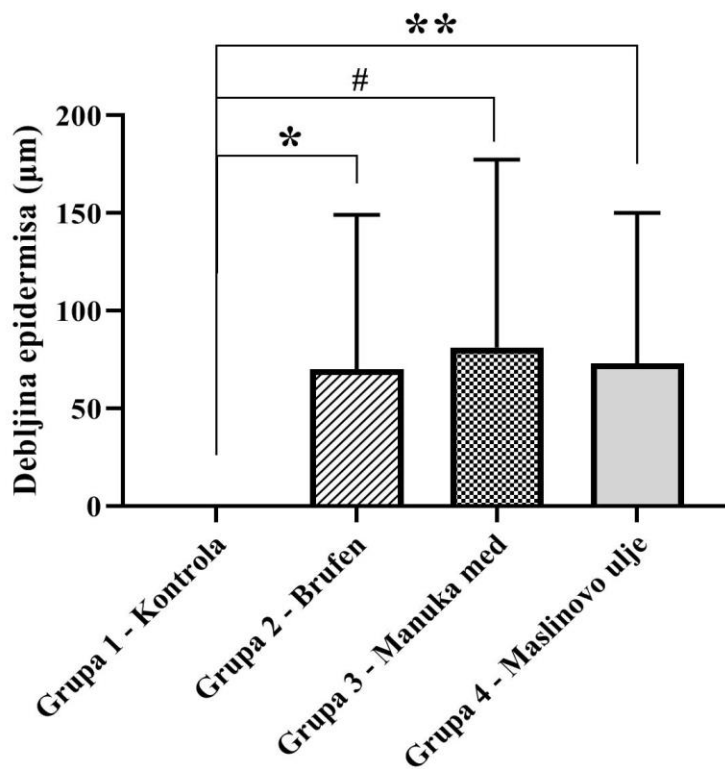
4.2.1 Sedmi dan

U Tabeli 5 prikazane su srednje vrednosti debljine epidermisa i epidermalnih prečki za 7. dan. Utvrđena je statistički značajna razlika u srednjim vrednostima debljine epidermisa ($\chi^2 = 14,72$; $p = 0,002$) i epidermalnih prečki ($\chi^2 = 15,83$; $p = 0,001$) kod različitih tretmana opekotina.

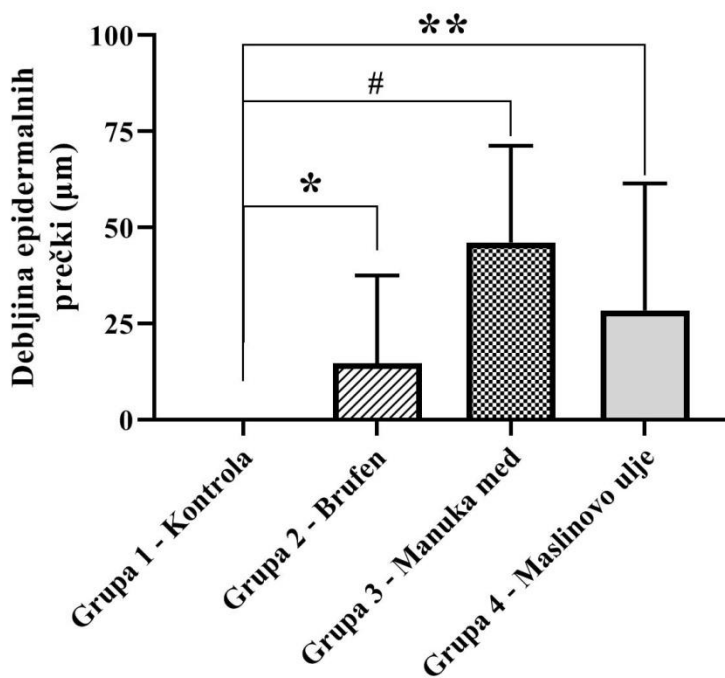
Kod Grupe 1 – Kontrola za 7. dan, epidermis i epidermalne prečke nisu zabeleženi na histološkim preparatima te je zbog toga njihova prosečna vrednost debljine iznosila 0 μm i značajno se razlikuje od ostalih oglednih grupa (Tabela 5, Grafikon 3 i Grafikon 4).

	Grupa	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)	Medijana (M)
Epidermis (μm)	Grupa 1 – Kontrola	0,00	0,00	0,00
	Grupa 2 – Brufen	70,03	79,03	34,94
	Grupa 3 – Manuka med	81,19	111,11	28,98
	Grupa 4 - Maslinovo ulje	72,96	77,04	49,15
Epidermalne prečke (μm)	Grupa 1 – Kontrola	0,00	0,00	0,00
	Grupa 2 – Brufen	14,65	22,93	2,53
	Grupa 3 – Manuka med	46,11	60,16	9,80
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	28,48	32,97	15,25

Tabela 5. Srednje vrednosti debljine epidermisa i epidermalnih prečki kod različitih tretmana opekotina (7. dan)



Grafikon 3. Srednje vrednosti debljine epidermisa – 7. dan (*, #, ** p < 0,05)



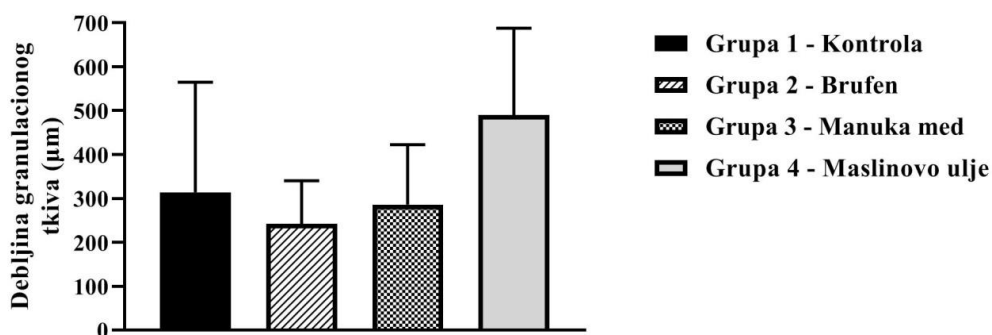
Grafikon 4. Srednje vrednosti debljine epidermalnih prečki – 7. dan (*, #, ** p < 0,05)

Srednje vrednosti debljine granulacionog tkiva i intaktnog retikularnog dermisa za 7. dan prikazani su u Tabeli 6. Dokazana je statistički značajna razlika u debljini intaktnog retikularnog derma kod različitih tretmana opekotina ($\chi^2 = 38,92$; $p < 0,001$). Nije dokazana bitna statistička razlika u prosečnoj debljini granulacionog tkiva kod različitih tretmana opekotina ($\chi^2 = 4,73$; $p = 0,192$) (Tabela 6, Grafikon 5).

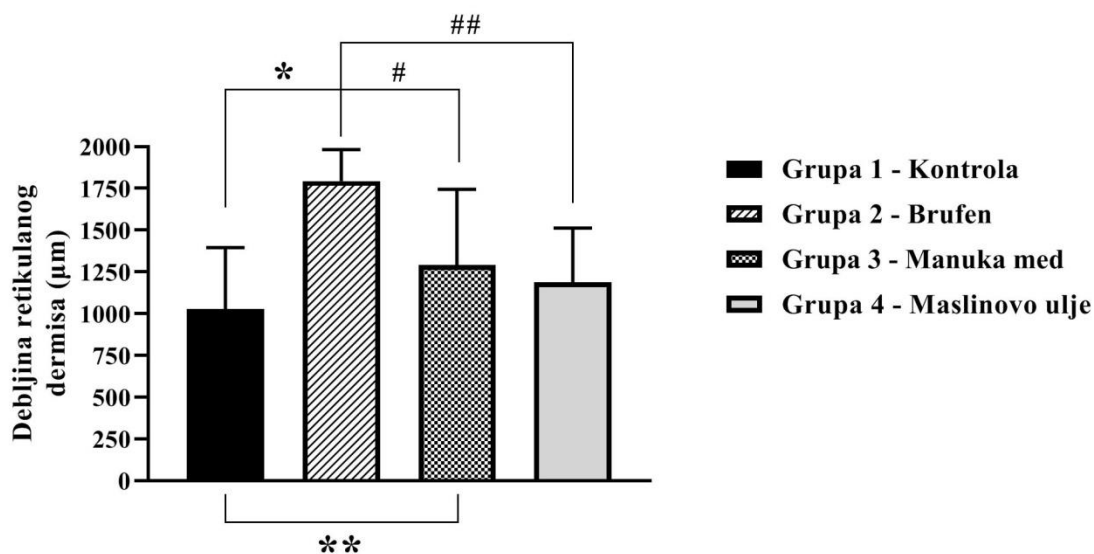
Grupa 2 – Brufen je imala veću prosečnu debljinu intaktnog retikularnog dermisa u odnosu na Grupu 1 – Kontrola ($U = 4,00$; $p < 0,001$), Grupu 3 – Manuka med ($U = 54,00$; $p < 0,001$) i Grupu 4 – Maslinovo ulje ($U = 15,00$; $p < 0,001$). Takođe, Grupa 1- Kontrola je imala značajno manju prosečnu debljinu intaktnog retikularnog dermisa u odnosu na Grupu 3 – Manuka med ($U = 114,00$; $p = 0,02$) (Tabela 6, Grafikon 6).

	Grupa	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)	Medijana (M)
Granulaciono tkivo (μm)	Grupa 1 – Kontrola	313,85	251,38	193,18
	Grupa 2 – Brufen	241,94	98,34	219,69
	Grupa 3 – Manuka med	286,06	136,74	229,41
	Grupa 4 - Maslinovo ulje	489,65	655,25	131,48
Intaktni Retikularni dermis	Grupa 1 – Kontrola	1027,72	368,85	1139,53
	Grupa 2 – Brufen	1794,09	187,76	1821,41
	Grupa 3 – Manuka med	1291,95	452,21	1358,63
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	1186,71	325,02	1260,17

Tabela 6. Srednje vrednosti debljine granulacionog tkiva i intaktnog retikularnog dermisa kod različitih tretmana opekotina (7. dan)



Grafikon 5. Srednje vrednosti debljine granulacionog tkiva – 7. dan



Grafikon 6. Srednje vrednosti debljine intaktnog retikularnog dermisa – 7. dan
 (*, #, ## p < 0,05; ** p < 0,001)

4.2.2 Deseti dan

U Tabeli 7 su prikazane srednje vrednosti debljine epidermisa i epidermalnih prečki kod različitih tretmana opekotina za 10. dan. Uz pomoć Kruskal–Volisovog testa utvrđena je statistički značajna razlika u debljini epidermisa ($\chi^2 = 34,73$; $p < 0,001$) i epidermalnih prečki ($\chi^2 = 20,26$; $p < 0,001$) kod različitih tretmana opekotina.

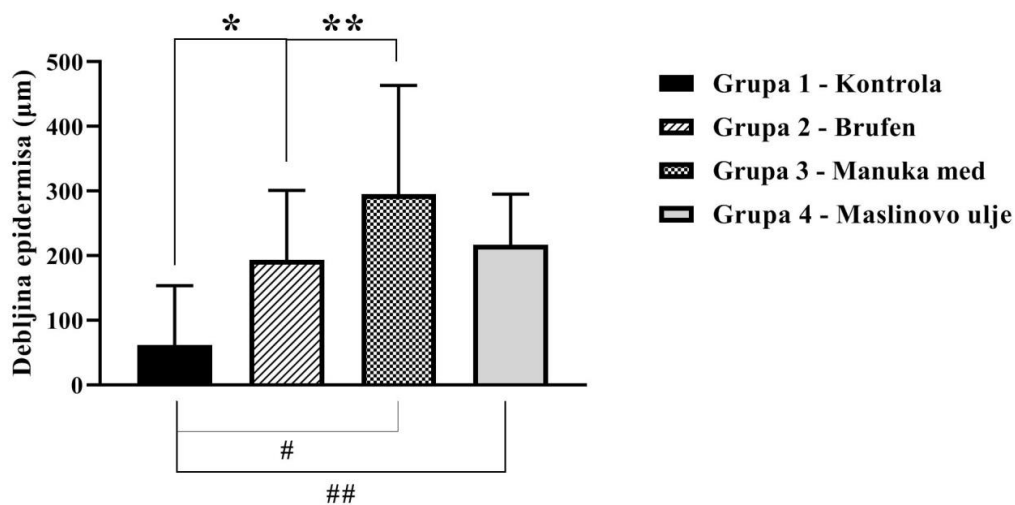
Srednja vrednost debljine epidermisa u Grupi 1 – Kontrola je statistički značajno manja od debljine epidermisa u Grupi 3 – Manuka med ($U = 23,00$; $p < 0,001$) i Grupi 4 – Maslinovo ulje ($U = 28,00$; $p < 0,001$). Grupa 2 – Brufen je imala veću prosečnu debljinu epidermisa u odnosu na Grupi 1 – Kontrola ($U = 45,00$; $p < 0,001$), dok sa druge strane je imala značajno manju prosečnu debljinu epidermisa u odnosu na Grupi 3 – Manuka med ($U = 124,00$; $p = 0,04$) (Tabela 7, Grafikon 7).

Grupa 1 – Kontrolna grupa je imala statistički značajno manju srednju vrednosti debljine epidermalnih prečki u odnosu na Grupi 2 – Brufen ($U = 74,00$; $p < 0,001$), Grupi 3 – Manuka

med (U = 74,00; p < 0,001) i Grupu 4 – Maslinovo ulje (U = 52,00; p < 0,001) (Tabela 7, Grafikon 8).

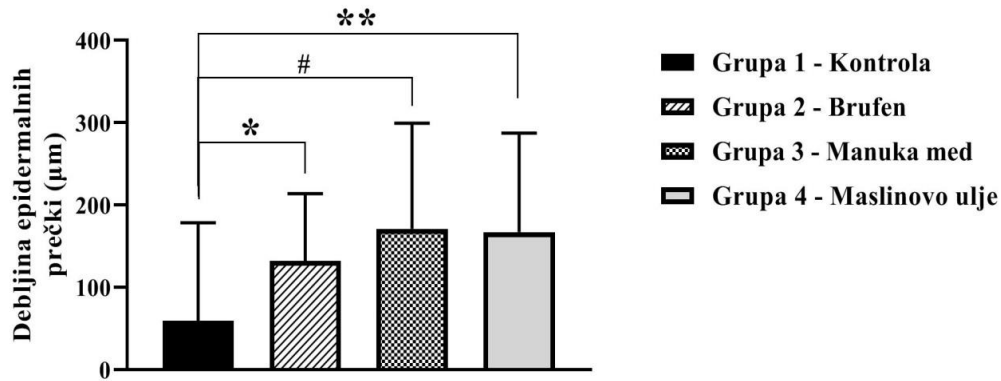
	Grupa	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)	Medijana (M)
Epidermis (μm)	Grupa 1 – Kontrola	61,59	92,07	23,26
	Grupa 2 – Brufen	193,71	107,28	175,35
	Grupa 3 – Manuka med	295,31	168,05	228,85
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	216,47	78,66	197,44
Epidermalne prečke (μm)	Grupa 1 – Kontrola	59,49	119,12	6,98
	Grupa 2 – Brufen	132,11	81,69	119,54
	Grupa 3 – Manuka med	171,06	128,44	167,36
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	167,07	120,28	129,27

Tabela 7. Srednje vrednosti debljine epidermisa i epidermalnih prečki kod različitih tretmana opekotina (10. dan)



Grafikon 7. Srednje vrednosti debljine epidermisa – 10. dan

(* , # , ## p < 0,001; ** p < 0,05)



Grafikon 8. Srednje vrednosti debljine epidermalnih prečki – 10. dan

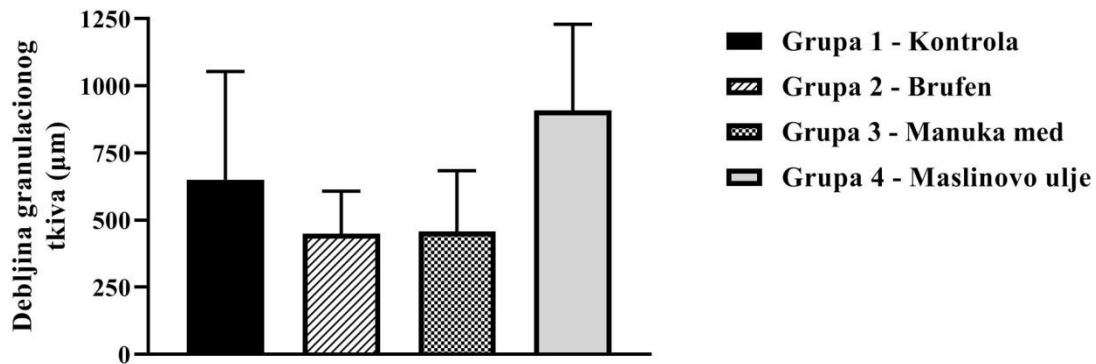
(*,#,** p < 0,001)

Srednje vrednosti debljine granulacionog tkiva i intaktnog retikularnog dermisa kod različitih tretmana opekotina za 10. dan su prikazane u Tabeli 8. Nisu nađene statistički značajne razlike u debljini granulacionog vezivnog tkiva kod različitih tretmana opekotina ($\chi^2 = 2,32$; $p = 0,51$) (Tabela 8, Grafikon 9). S druge strane, potvrđena je statistički značajna razlika u prosečnoj debljini intaktnog retikularnog dermisa kod različitih tretmana opekotina ($\chi^2 = 11,92$; $p = 0,008$).

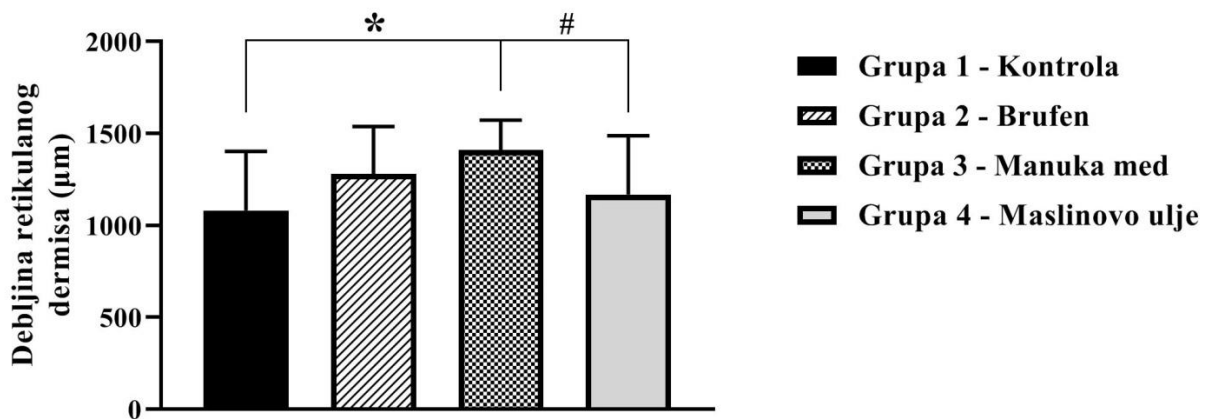
Uz pomoć Man–Vitnijevog (*Mann–Whitney*) testa, utvrđeno je da Grupa 1 – Kontrola ($U = 85,00$; $p = 0,001$) i Grupa 4 – Maslinovo ulje ($U = 110,50$; $p = 0,01$) su imale statistički značajno manju prosečnu debljinu intaktnog retikularnog dermisa od Grupe 3 – Manuka med (Tabela 8, Grafikon 10).

	Grupa	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)	Medijana (M)
Granulaciono tkivo (µm)	Grupa 1 – Kontrola	650,11	403,33	526,16
	Grupa 2 – Brufen	448,55	159,59	408,22
	Grupa 3 – Manuka med	458,08	225,28	421,87
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	908,17	985,83	425,00
Intaktni Retikularni dermis	Grupa 1 – Kontrola	1081,43	321,89	961,50
	Grupa 2 – Brufen	1280,67	256,60	1259,16
	Grupa 3 – Manuka med	1411,40	161,67	1472,00
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	1167,48	319,94	1229,35

Tabela 8. Srednje vrednosti debljine granulacionog tkiva i intaktnog retikularnog dermisa kod različitih tretmana opekotina (10. dan)

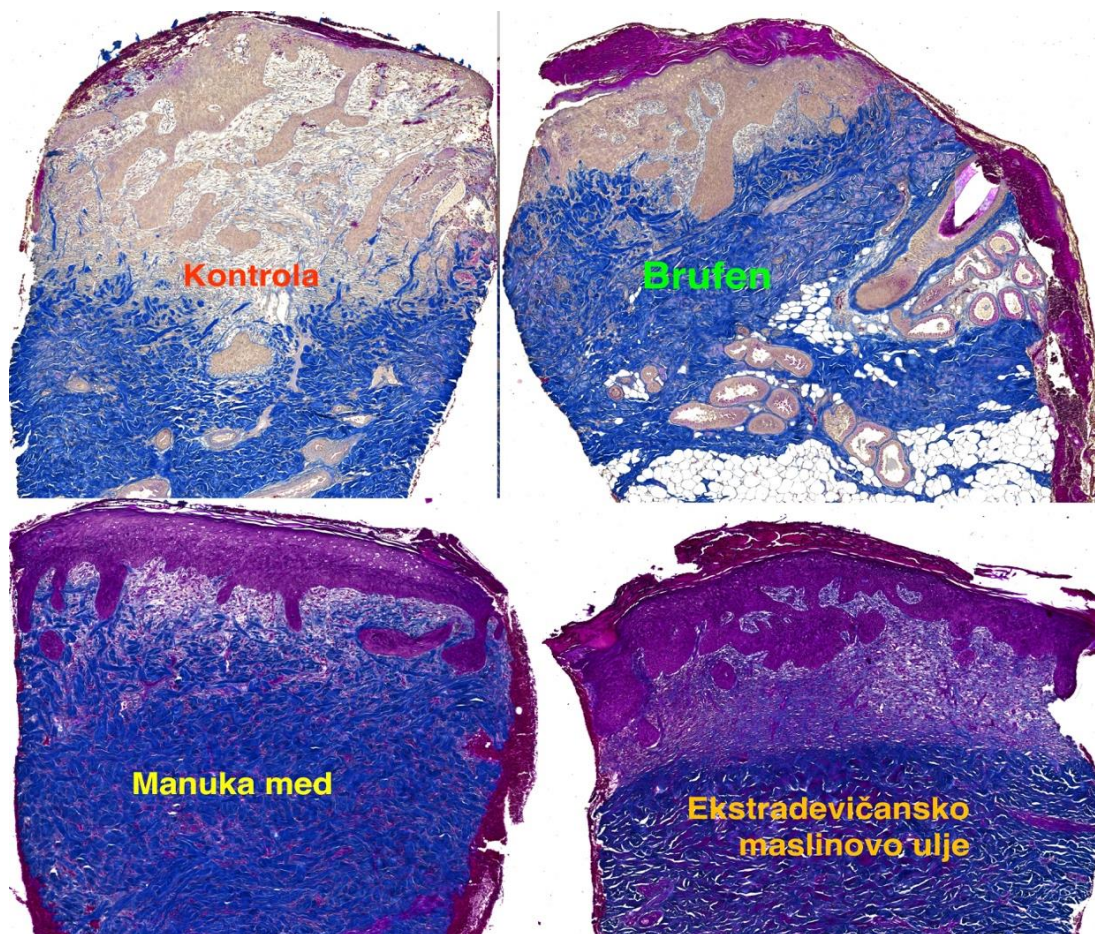


Grafikon 9. Srednje vrednosti debljine granulacionog tkiva – 10. dan



Grafikon 10. Srednje vrednosti debljine intaktnog retikularnog dermisa – 10. dan (*,# p < 0,05)

Na mason trihromnom bojenju u 10. Danu istraživanja (Slika 19.) vidimo rezultate koji pokazuju najslabije razvijen epiderm, najmanje izražen intaktni retikularni dermis, kao i najveće organizaciono tkivo kod kontrolne grupe, dok je najbolje patohistološke karakteristike imala grupa kod koje je korišćen manuka med.



Slika 19. – 10. dan *Masson trihrom* tehnika (originalna slika)

4.2.3 Četrnaesti dan

Srednje vrednosti debljine epidermisa i epidermalnih prečki kod različitih tretmana opekotina za 14. dan su prikazani u Tabeli 9. Dokazana je statistički značajna razlika u prosečnoj debljini epidermisa ($\chi^2 = 29,06$; $p < 0,001$) i epidermalnih prečki ($\chi^2 = 16,92$; $p = 0,001$) kod različitih tretmana opekotina.

U Grupi 1 – Kontrola prosečna debljina epidermisa je statistički značajno manja od prosečne debljine epidermisa u Grupi 3 – Manuka med ($U = 70,00$; $p < 0,001$) i Grupi 4 – Maslinovo ulje ($U = 29,00$; $p < 0,001$).

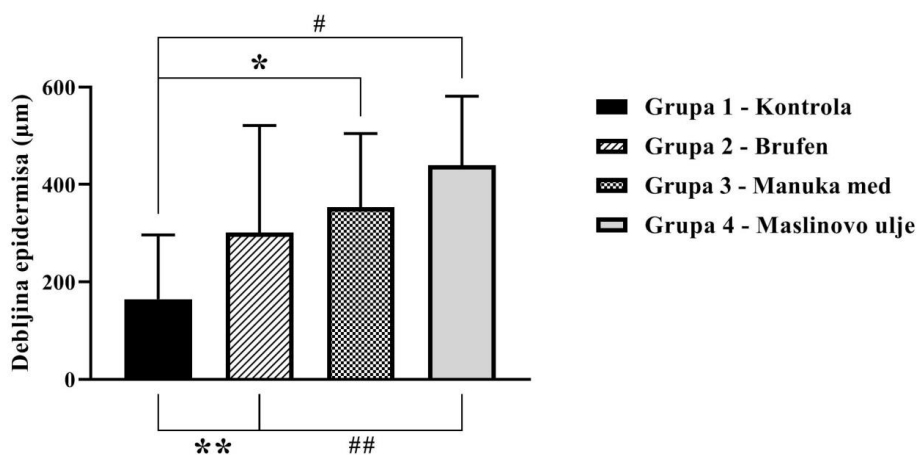
Grupa 2 – Brufen je imala veću srednju vrednost debljine epidermisa u odnosu na Grupi 1 – Kontrola ($U = 114,00$; $p = 0,02$), dok sa druge strane je pokazala statistički značajno manju

vrednost debljine epidermisa u odnosu na Grupu 4 – Maslinovo ulje ($U = 65,00$; $p < 0,001$) (Tabela 9, Grafikon 11).

Grupa 4 – Maslinovo ulje je imala statistički značajno veću prosečnu debljinu epidermalnih prečki u odnosu na Grupu 2 – Brufen ($U = 57,00$; $p < 0,001$) i Grupu 3 – Manuka med ($U = 64,00$; $p < 0,001$) (Tabela 9, Grafikon 12).

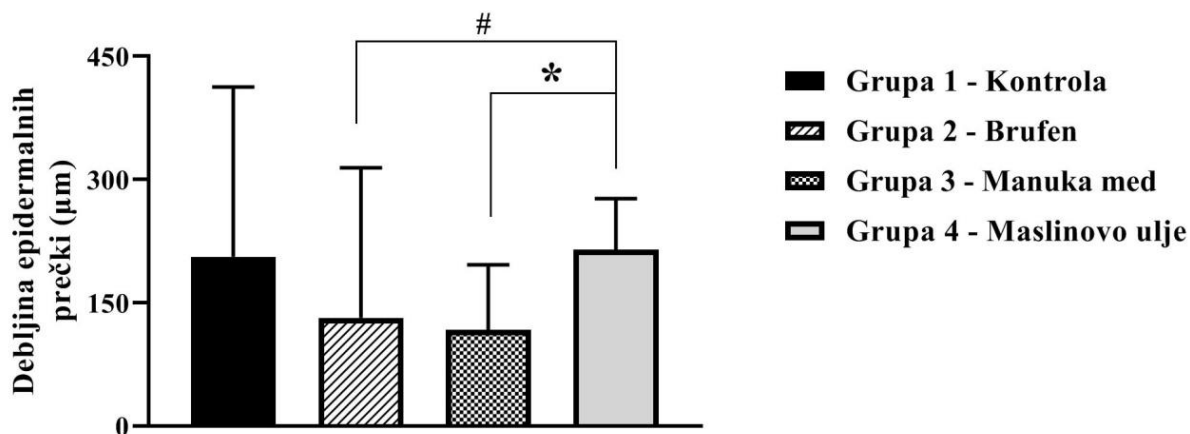
	Grupa	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)	Medijana (M)
Epidermis (μm)	Grupa 1 – Kontrola	164,67	132,01	146,95
	Grupa 2 – Brufen	301,54	219,65	236,58
	Grupa 3 – Manuka med	353,71	151,21	363,37
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	439,33	142,04	419,34
Epidermalne prečke (μm)	Grupa 1 – Kontrola	206,05	206,54	163,93
	Grupa 2 – Brufen	131,69	182,84	59,30
	Grupa 3 – Manuka med	117,14	79,29	116,86
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	214,66	62,26	208,66

Tabela 9. Srednje vrednosti debljine epidermisa i epidermalnih prečki kod različitih tretmana opekotina (14. dan)



Grafikon 11. Srednje vrednosti debljine epidermisa – 14. dan

(* , # , ## $p < 0,001$; ** $p < 0,05$)



Grafikon 12. Srednje vrednosti debljine epidermalnih prečki – 14. dan (*, # p < 0,001)

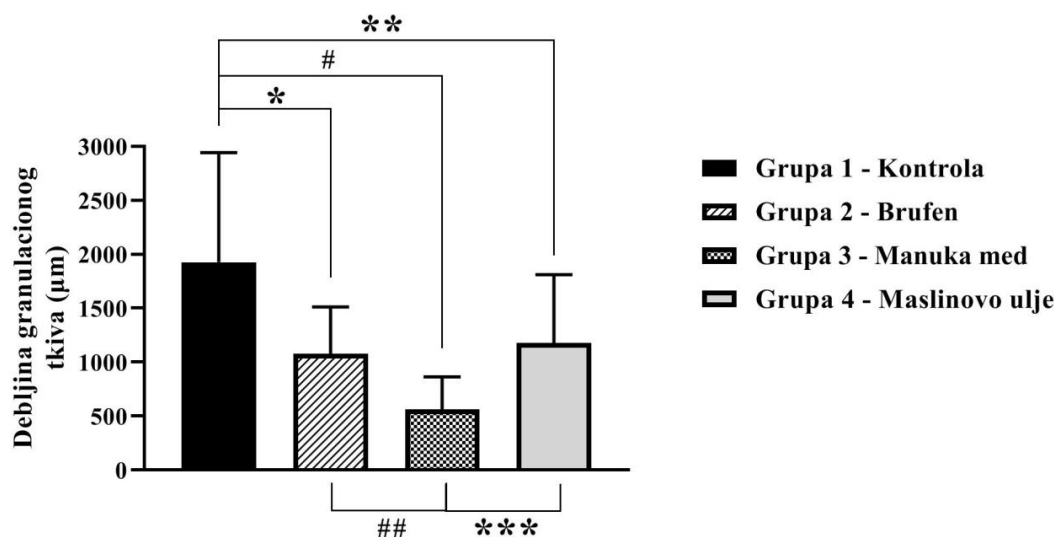
U Tabeli 10. predstavljene su prosečne debljine granulacionog tkiva i intaktnog retikularnog dermisa kod različitih tretmana opekotina za 14. dan. Kruskal–Volisov test je pokazao statistički značajne razlike u prosečnoj debljini granulacionog tkiva ($\chi^2 = 18,84$; $p < 0,001$) i intaktnog retikularnog dermisa ($\chi^2 = 12,27$; $p = 0,007$) kod različitih tretmana opekotina.

Grupa 1 – Kontrola je imala statistički značajno veću srednju vrednost debljine granulacionog tkiva u odnosu na Grupu 2 – Brufen ($U = 95,00$; $p = 0,004$), Grupu 3 – Manuka med ($U = 73,00$; $p < 0,001$) i Grupu 4 – Maslinovo ulje ($U = 122,00$; $p = 0,04$). Grupa 3 – Manuka med je imala manju srednju vrednost debljine granulacionog tkiva u odnosu na Grupu 2 – Brufen ($U = 89,00$; $p = 0,002$) i Grupu 4 – Maslinovo ulje ($U = 112,00$; $p = 0,02$) (Tabela 10, Grafikon 13).

Grupa 1 – Kontrola je imala statistički značajno manju prosečnu debljinu intaktnog retikularnog dermisa u odnosu na Grupu 3 – Manuka med ($U = 125,00$; $p = 0,04$) i Grupu 4 – Maslinovo ulje ($U = 89,00$; $p = 0,002$). Grupa 4 – Maslinovo ulje je imala veću prosečnu debljinu intaktnog retikularnog derma u odnosu na Grupu 2 – Brufen ($U = 95,00$; $p = 0,004$) (Tabela 10, Grafikon 14).

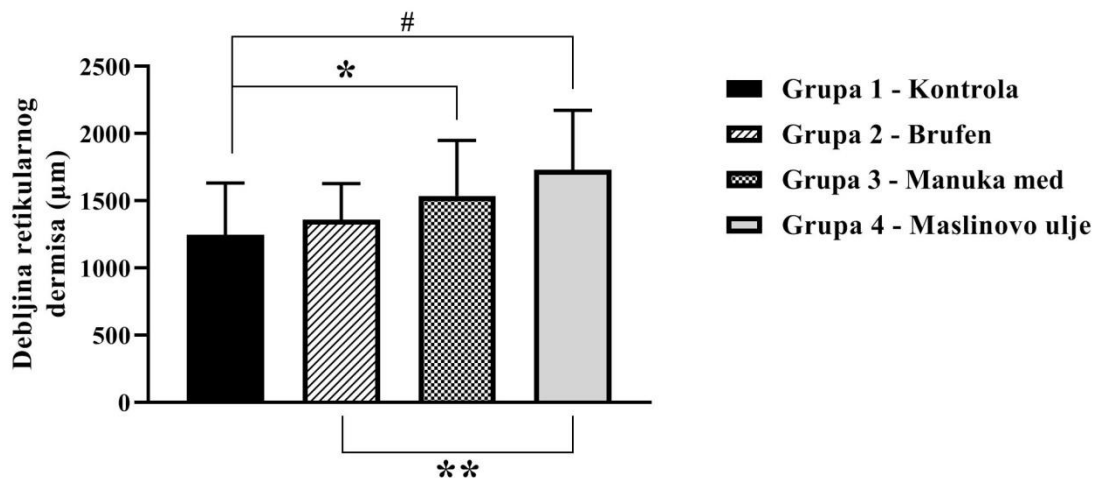
	Grupa	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)	Medijana (M)
Granulaciono tkivo (μm)	Grupa 1 – Kontrola	1925,97	1014,30	1948,78
	Grupa 2 – Brufen	1078,18	432,01	1167,35
	Grupa 3 – Manuka med	562,35	300,54	651,16
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	1175,68	635,17	942,60
Intaktni Retikularni dermis	Grupa 1 – Kontrola	1246,04	387,08	1180,33
	Grupa 2 – Brufen	1358,42	270,68	1475,87
	Grupa 3 – Manuka med	1536,01	412,18	1411,63
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	1730,86	443,75	1819,62

Tabela 10. Srednje vrednosti debljine granulacionog tkiva i intaktnog retikularnog dermisa kod različitih tretmana opekotina (14. dan)



Grafikon 13. Srednje vrednosti debljine granulacionog tkiva – 14. dan

(* , ## , ** , *** $p < 0,05$; # $p < 0,001$)



Grafikon 14. Srednje vrednosti debljine intaktnog retikularnog dermisa – 14. dan
 (*, #, ** p < 0,05)

4.2.4 Sedamnaesti dan

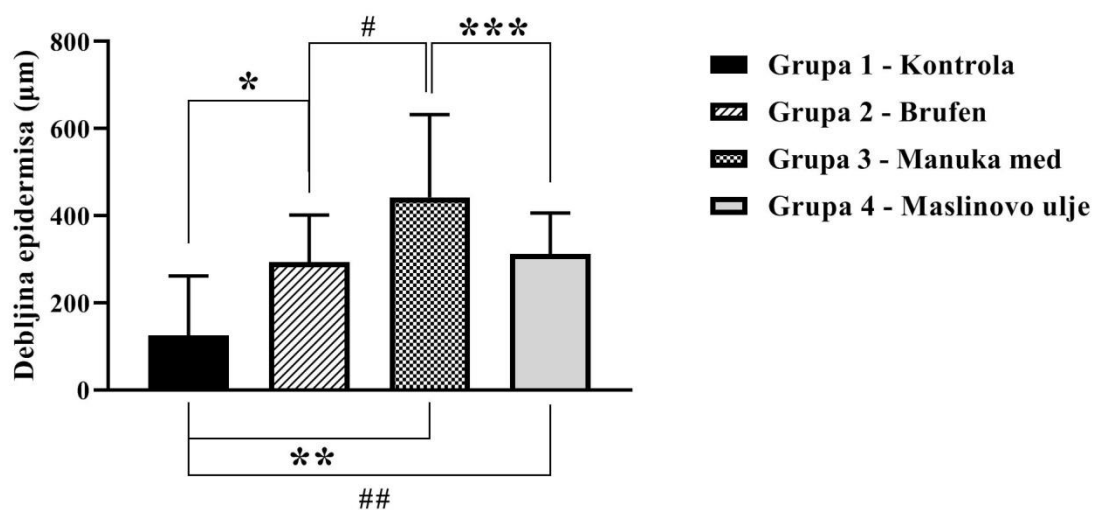
Prosečne debljine epidermisa i epidermalnih prečki kod različitih tretmana opekotina za 17. dan prikazane su u Tabeli 11. Prisutna je statistički značajna razlika u prosečnoj debljini epidermisa ($\chi^2 = 28,95$; $p < 0,001$) i epidermalnih prečki ($\chi^2 = 13,87$; $p = 0,003$) kod različitih tretmana opekotina.

Grupa 1 – Kontrola je imala statistički značajno manju prosečnu debljinu epidermisa u odnosu na Grupu 3 – Manuka med ($U = 30,00$; $p < 0,001$), Grupu 4 – Maslinovo ulje ($U = 59,00$; $p < 0,001$). Grupa 2 – Brufen je imala statistički značajno veću prosečnu debljinu epidermisa u poređenju sa Grupom 1 – Kontrola ($U = 93,00$; $p = 0,003$), dok je sa druge strane imala statistički značajno manju debljinu epidermisa u poređenju sa Grupom 3 – Manuka med ($U = 98,00$; $p = 0,005$). Prosečna debljina epidermisa iz Grupe 3 – Manuka med se statistički značajno razlikuje od prosečne debljine epidermisa iz Grupe 4 – Maslinovo ulje ($U = 124,00$; $p = 0,04$) (Tabela 11, Grafikon 15).

Srednja vrednost debljine epidermalnih prečki Grupe 2 – Brufen je imala statistički značajno manju vrednost u poređenju sa srednjim vrednostima debljine prečki iz Grupe 3 – Manuka med ($U = 55,00$; $p < 0,001$) i Grupe 4 – Maslinovo ulje ($U = 53,00$; $p < 0,001$) (Tabela 11, Grafikon 16).

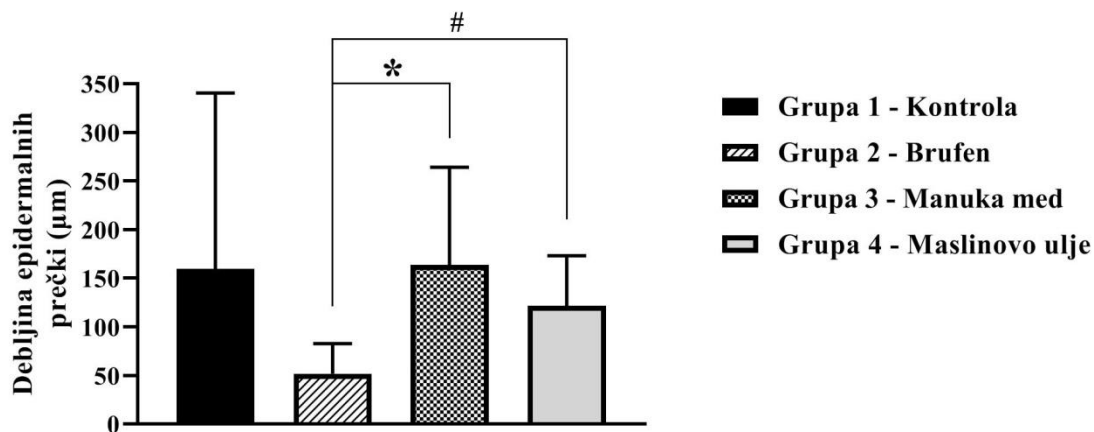
	Grupa	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)	Medijana (M)
Epidermis (μm)	Grupa 1 – Kontrola	125,12	136,73	57,45
	Grupa 2 – Brufen	293,39	107,99	257,06
	Grupa 3 – Manuka med	442,47	189,81	398,80
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	312,01	94,47	300,00
Epidermalne prečke (μm)	Grupa 1 – Kontrola	159,49	180,92	78,72
	Grupa 2 – Brufen	51,77	31,03	41,24
	Grupa 3 – Manuka med	163,65	100,43	177,10
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	121,67	51,55	131,01

Tabela 11. Srednje vrednosti debljine epidermisa i epidermalnih prečki kod različitih tretmana opekotina (17. dan)



Grafikon 15. Srednje vrednosti debljine epidermisa – 17. dan

(*,#,*** $p < 0,05$; ##, ** $p < 0,001$)



Grafikon 16. Srednje vrednosti debljine epidermalnih prečki – 17. dan (*,# p < 0,001)

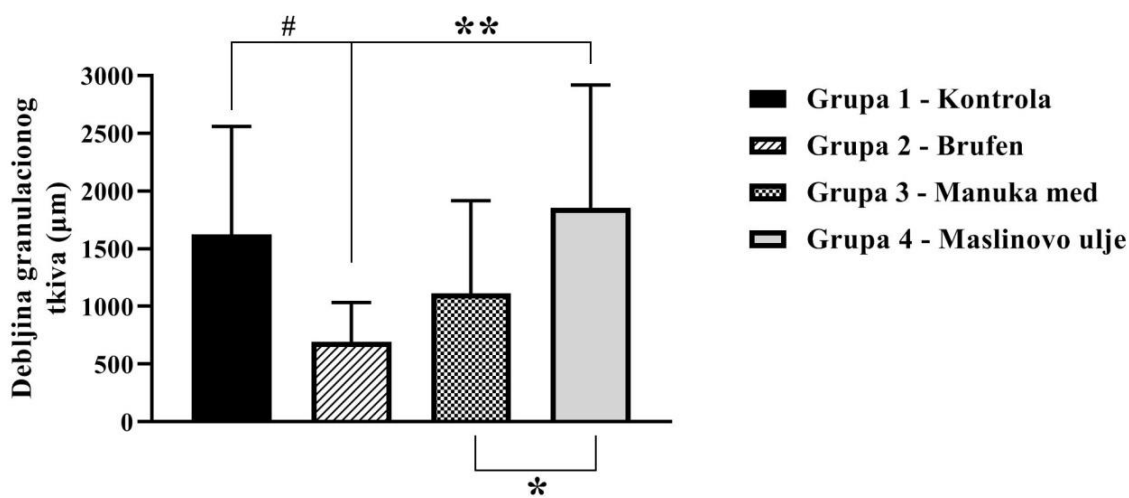
Prosečne debljine granulacionog tkiva i intaktnog retikularnog dermisa kod različitih tretmana opekotina za 17. dan su prikazane u Tabeli 12. Nađena je značajna razlika u prosečnoj debljini granulacionog tkiva ($\chi^2 = 16,72$; $p = 0,001$) i prosečnoj debljini intaktnog retikularnog dermisa ($\chi^2 = 34,61$; $p < 0,001$) kod različitih tretmana opekotina.

Man–Vitnjev test je pokazao da Grupa 2 – Brufen imala statističko značajno manju prosečnu debljinu granulacionog tkiva u odnosu na Grupu 1- Kontrola ($U = 89,00$; $p = 0,002$) i Grupa 4 – Maslinovo ulje ($U = 67,00$; $p < 0,001$). Srednja vrednost debljine granulacionog tkiva Grupe 3 – Manuka med je imala značajno manju debljinu granulacionog tkiva Grupe 4 – Maslinovo ulje ($U = 111,00$; $p = 0,02$) (Tabela 12, Grafikon 17).

Prosečne vrednosti debljine intaktnog retikularnog dermisa Grupe 1 – Kontrola su manje u odnosu na prosečne vrednosti debljine intaktnog retikularnog dermisa Grupe 2 – Brufen ($U = 14,00$; $p < 0,001$), Grupe 3 – Manuka med ($U = 11,00$; $p < 0,001$), Grupu 4 – Maslinovo ulje ($U = 47,00$; $p < 0,001$) (Tabela 12, Grafikon 18).

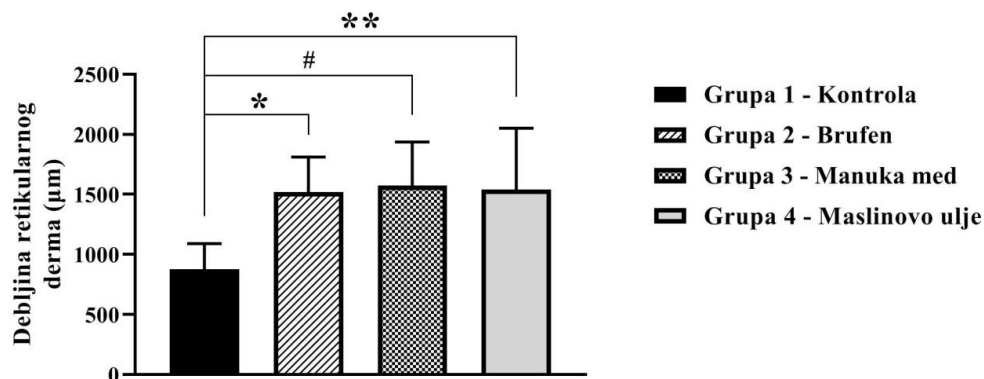
	Grupa	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)	Medijana (M)
Granulaciono tkivo (μm)	Grupa 1 – Kontrola	1622,55	936,41	1819,57
	Grupa 2 – Brufen	690,42	342,55	643,13
	Grupa 3 – Manuka med	1111,65	805,07	831,33
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	1854,89	1062,80	1877,2
Intaktni Retikularni dermis	Grupa 1 – Kontrola	878,13	212,44	821,78
	Grupa 2 – Brufen	1517,41	294,08	1501,83
	Grupa 3 – Manuka med	1574,06	362,63	1435,84
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	1541,18	509,40	1483,46

Tabela 12. Srednje vrednosti debljine granulacionog tkiva i intaktnog retikularnog dermisa kod različitih tretmana opekotina (17. dan)



Grafikon 17. Srednje vrednosti debljine granulacionog tkiva – 17. dan

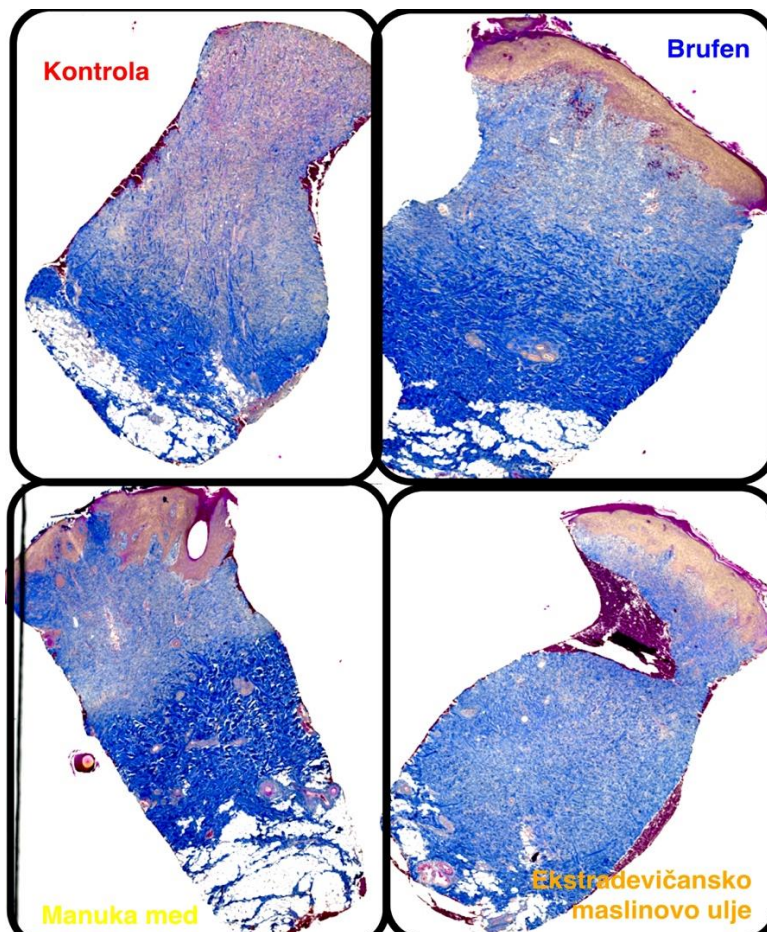
(*,# $p < 0,05$; ** $p < 0,001$)



Grafikon 18. Srednje vrednosti debljine intaktnog retikularnog dermisa – 17. dan

(*,#,** p < 0,001)

Na mason trihromnom bojenju vidimo rezultate koji pokazuju da Brufen u 17. danu imala najbolje patohistološke karakteristike (dobro formiran epiderm, manje epidermalne prečke, najmanje organizaciono granulaciono tkivo i najmanji retikularni dermis, dok je kontrola imala najgore patohistološke karakteristike.(Slika 20.)



Slika 20. – 17. dan Masson trihrom bojenje (originalna slika)

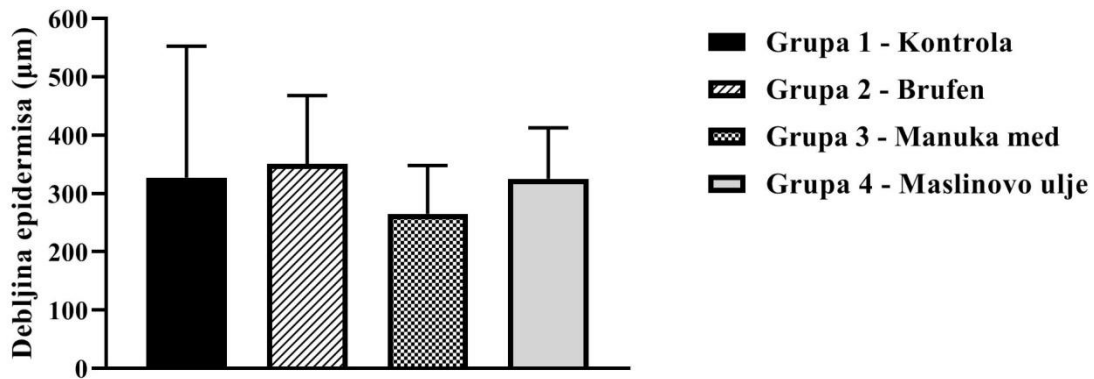
4.2.5 Dvadeseti dan

Tabelarno su prikazane srednje vrednosti debljine epidermisa i epidermalnih prečki kod različitih tretmana opekotina za 20. dan (Tabela 13). Kruskal–Volisov test nije pokazao statistički značajnu razliku u prosečnoj debljini epidermisa ($\chi^2 = 5,64$; $p = 0,13$) (Tabela 13, Grafikon 19). Međutim, dokazana je statistički značajna razlika u prosečnoj debljini epidermalnih prečki kod različitih tretmana opekotina ($\chi^2 = 15,51$; $p = 0,001$).

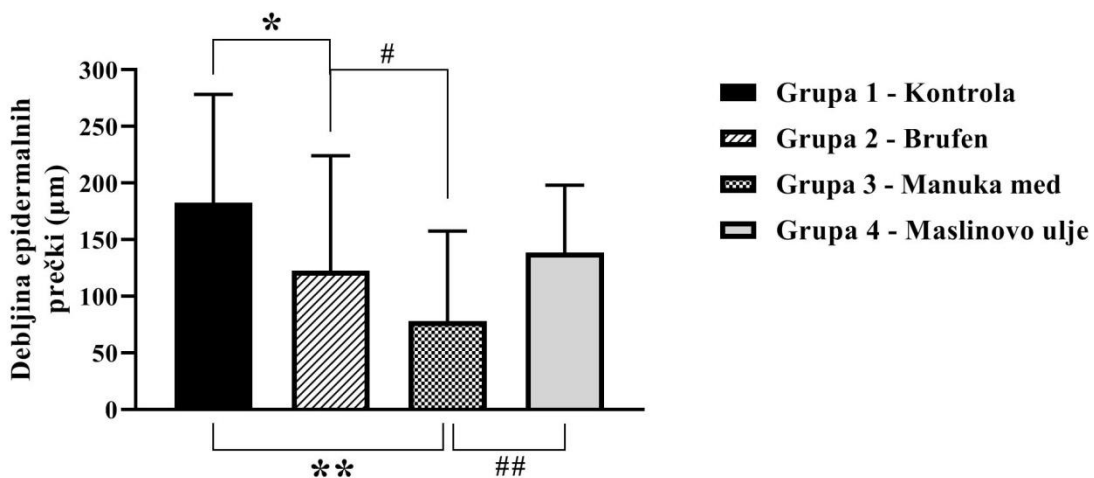
Srednja vrednost debljine epidermalnih prečki u Grupi 2 – Brufen je imala statističko značajno manju od debljine epidermisa u Grupi 1 – Kontrola ($U = 123,00$; $p = 0,04$), dok je statistički značajno veća od debljine epidermisa kod Grupe 3 – Manuka med ($U = 107,00$; $p = 0,01$). Grupa 1 – Kontrola je imala veću prosečnu debljinu epidermalnih prečki u odnosu na Grupu 3 – Manuka med ($U = 90,00$; $p = 0,002$). Prosečna debljina epidermalnih prečki kod Grupe 3 – Manuka med je bila značajno manja od prosečne debljine epidermalnih prečki u Grupi 4 – Maslinovo ulje ($U = 92,00$; $p = 0,003$) (Tabela 13, Grafikon 20).

	Grupa	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)	Medijana (M)
Epidermis (μm)	Grupa 1 – Kontrola	327,13	225,71	276,27
	Grupa 2 – Brufen	351,26	117,19	350,58
	Grupa 3 – Manuka med	265,24	83,19	254,55
	Grupa 4 - Maslinovo ulje	325,09	87,73	302,03
Epidermalne prečke (μm)	Grupa 1 – Kontrola	182,66	117,72	184,09
	Grupa 2 – Brufen	122,39	101,75	99,79
	Grupa 3 – Manuka med	77,76	79,76	40,93
	Grupa 4 - Maslinovo ulje	138,64	59,52	134,87

Tabela 13. Srednje vrednosti debljine epidermisa i epidermalnih prečki kod različitih tretmana opekotina (20. dan)



Grafikon 19. Srednje vrednosti debljine epidermisa – 20. dan



Grafikon 20. Srednje vrednosti debljine epidermalnih prečki – 20. dan

(* , # , ## , ** p < 0,05)

Prosečne debljine granulacionog tkiva i intaktnog retikularnog dermisa kod različitih tretmana opekotina za 20. dan su prikazane u Tabeli 14. Dokazana je statistički značajna razlika u prosečnoj debljini granulacionog tkiva ($\chi^2 = 17,73$; $p = 0,001$) i intaktnog retikularnog dermisa ($\chi^2 = 19,46$; $p < 0,001$) kod različitih tretmana opekotina.

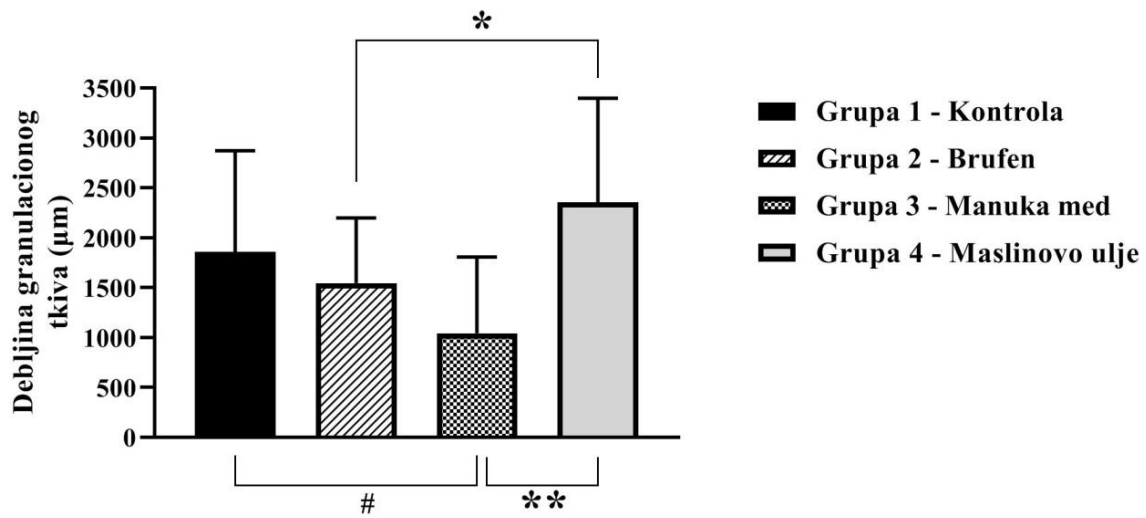
U Grupi 2 – Brufen, prosečna debljina granulacionog tkiva bila je manja u poređenju sa prosečnom debljinom granulacionog tkiva iz Grupe 4 – Maslinovo ulje ($U = 82,50$; $p < 0,001$). Srednja vrednost debljine granulacionog tkiva iz Grupe 3 – Manuka med je imala statističko

značajno manju u odnosu na debljinu granulacionog tkiva u Grupi 1 – Kontrola ($U = 112,00$; $p = 0,02$) i u Grupi 4 – Maslinovo ulje ($U = 68,00$; $p < 0,001$) (Tabela 14, Grafikon 21).

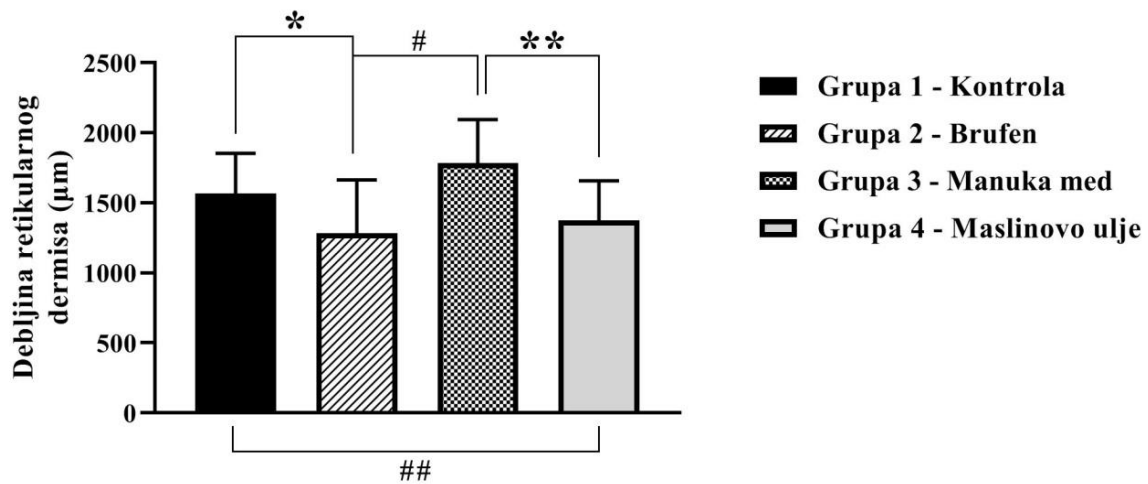
Grupa 2 – Brufen je imala manju prosečnu debljinu intaktnog retikularnog dermisa u odnosu na prosečnu debljinu dermisa iz Grupe 3 – Manuka med ($U = 73,50$; $p < 0,001$) i Grupe 1 – Kontrola ($U = 122,00$; $p = 0,03$). Grupa 4 – Maslinovo ulje imalo je manju prosečnu debljinu intaktnog retikularnog dermisa u odnosu na debljinu retikularnog dermisa iz Grupe 3 – Manuka med ($U = 64,00$; $p < 0,001$). Grupa 1 – Kontrola imala je statističko značajno veće srednje vrednosti debljine intaktnog retikularnog dermisa u odnosu na srednje vrednosti debljine intaktnog retikularnog dermisa u Grupi 4 – Maslinovo ulje ($U = 116,00$; $p = 0,02$) (Tabela 14, Grafikon 22).

	Grupa	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)	Medijana (M)
Granulaciono tkivo (um)	Grupa 1 – Kontrola	1860,23	1010,95	1960,84
	Grupa 2 – Brufen	1544,61	653,54	1618,62
	Grupa 3 – Manuka med	1042,27	763,45	883,48
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	2356,32	1041,24	2541,21
Intaktni Retikularni dermis	Grupa 1 – Kontrola	1565,65	288,03	1544,28
	Grupa 2 – Brufen	1281,79	382,53	1287,50
	Grupa 3 – Manuka med	1782,08	313,50	1712,90
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	1372,97	285,01	1320,00

Tabela 14. Srednje vrednosti debljine granulacionog tkiva i intaktnog retikularnog dermisa kod različitih tretmana opekotina (20. dan)



Grafikon 21. Srednje vrednosti debljine granulacionog tkiva – 20. dan
 (# $p < 0,05$; *, ** $p < 0,001$)

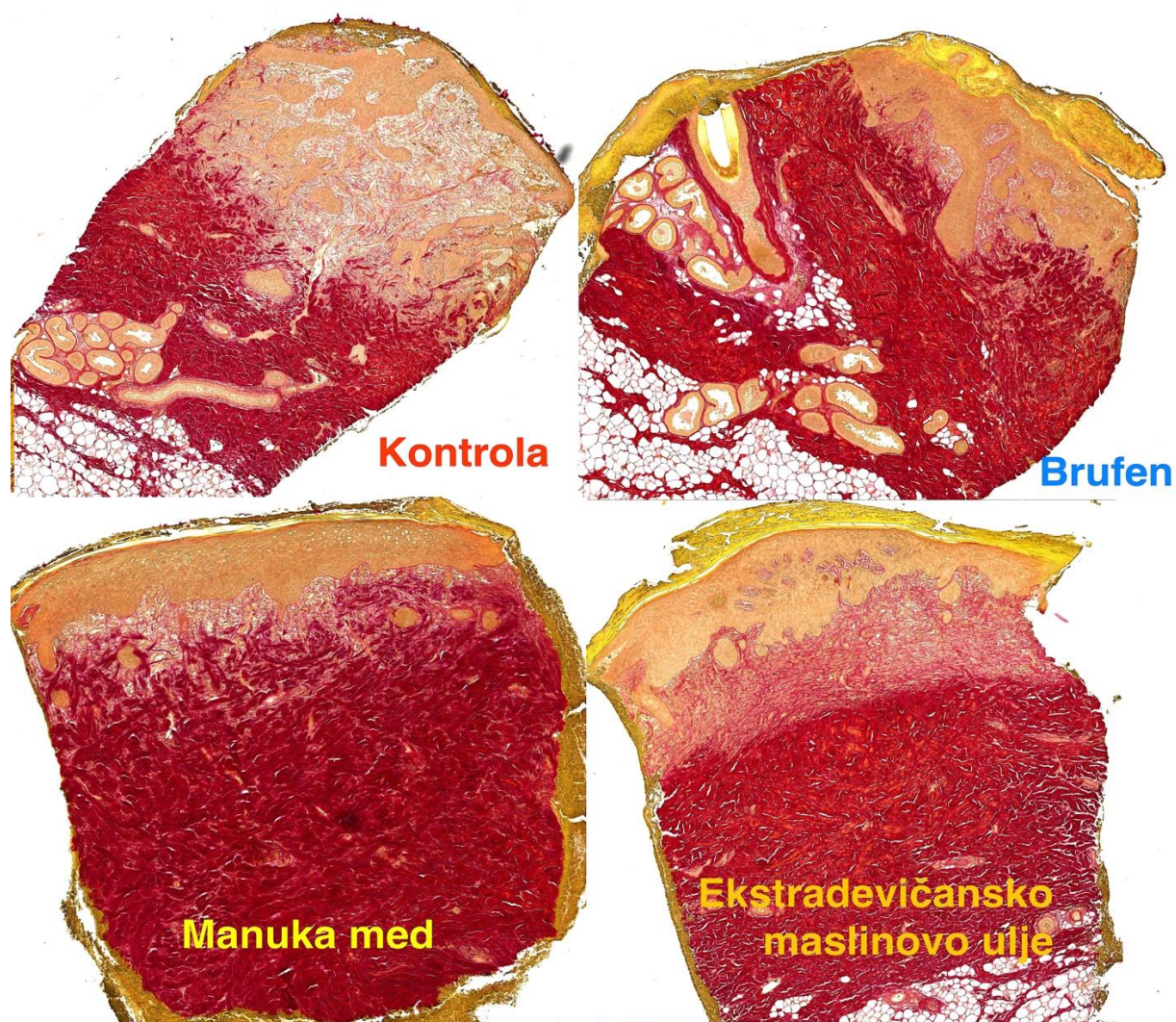


Grafikon 22. Srednje vrednosti debljine intaktnog retikularnog dermisa – 20. dan
 (*, ## $p < 0,05$; #, ** $p < 0,001$)

4.3 Histochemijska i imunohistochemijska obrada opekotinske rane

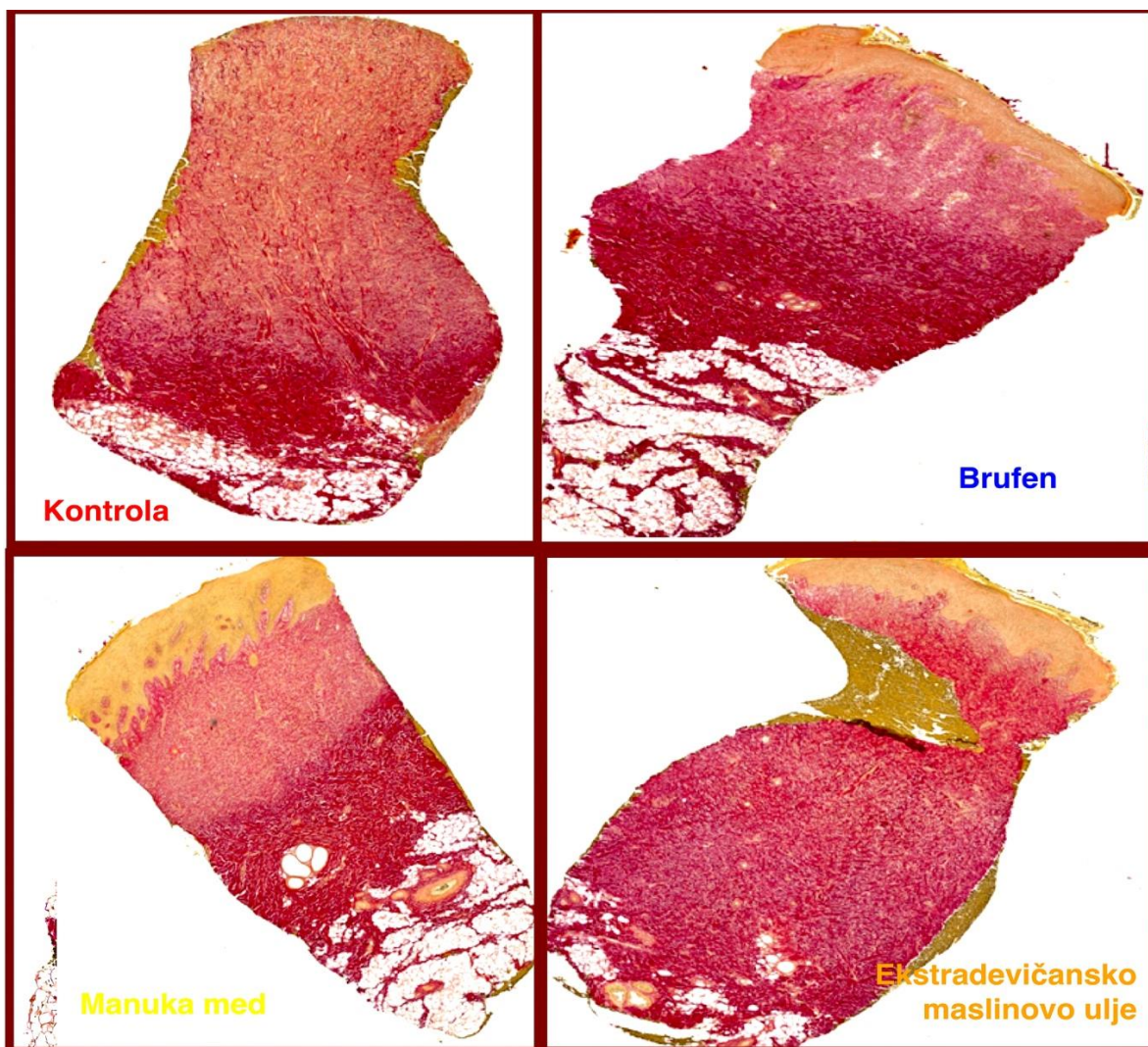
4.3.1 Histochemijsko bojenje Picrosirius red

Desetog dana istraživanja vršilo se histochemijsko bojenje *Picrosirius red*, koja boji gustinu dobro formiranog derma, najbolji denzitet i gustinu je imala Grupa manuka med, a najslabiju Kontrola (Slika 21).



Slika 21. – *Picrosirius* bojenje 10. Dana istraživanja (originalna slika)

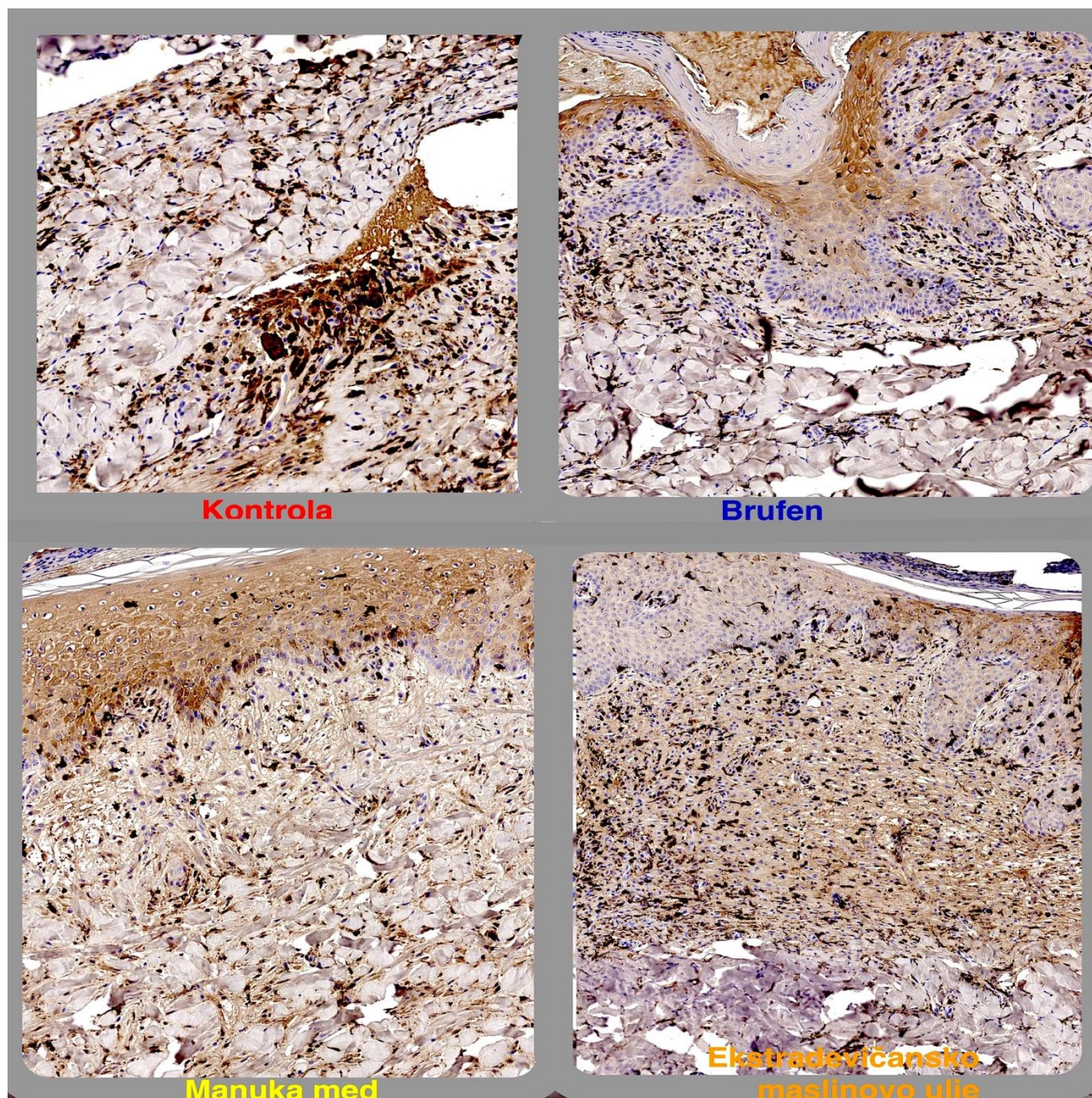
Histohemijsko bojenje na *Pictosirius red* načinjeno je i 17.dana, najbolje formiran dermis (denzitet kolagenih vlakana) je pokazala grupa Brufen, manuka med, Ekstradevičansko maslinovo ulje, a najlošije kontrolna grupa.(Slika 22.)



Slika 22.- *Picrosirius* bojenje 17. dan istraživanja (originalna slika)

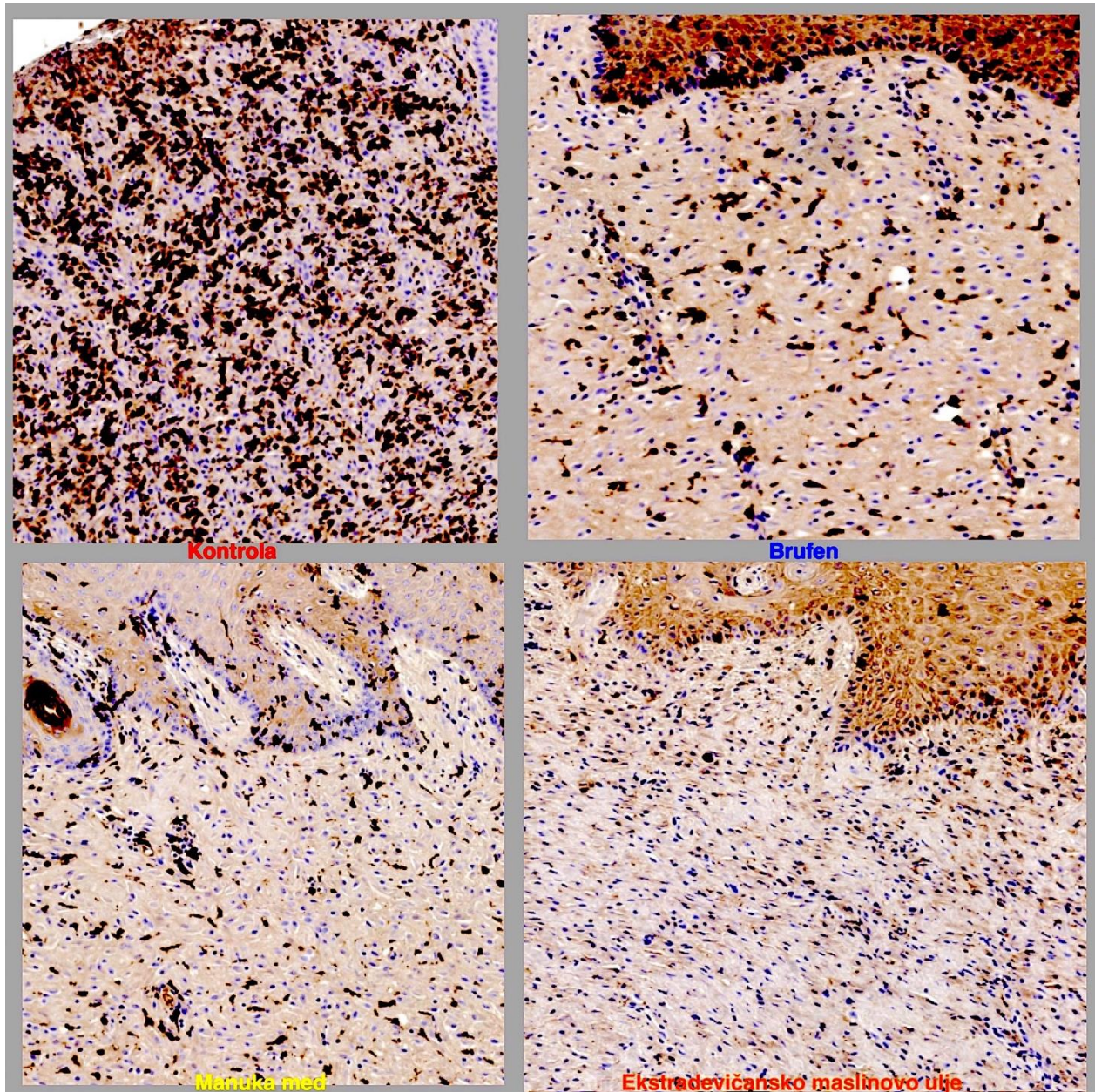
4.3.2 Imunohistohemijsko bojenje Iba1

Imunohistohemija Iba1 marker verifikuje aktivnost makrofaga. Najveća aktivnost makrofaga u 10. danu istraživanja verifikovana je kod kontrole, a najmanja u grupi kod koje je korišćen manuka med. (Slika 23.)



Slika 23.– Iba 1 imunohistohemija 10. dan istraživanja (originalna slika)

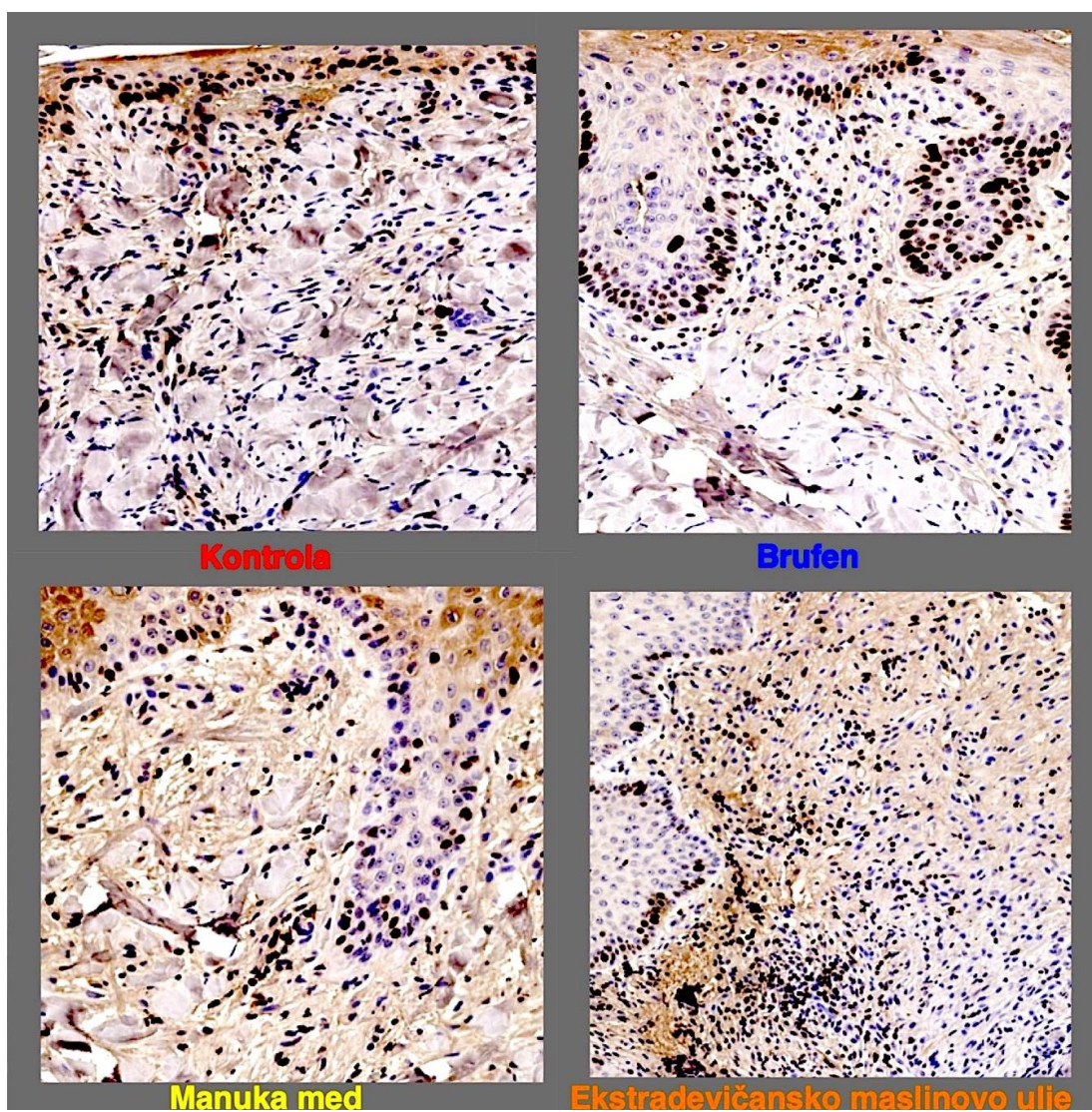
Imunohistohemijsko bojenje na Iba1 načinjeno je i 17. Dana istraživanja pokazuje značajno najveću aktivnost makrofaga u kontroli u odnosu na ostale grupe, što pokazuje da je faza inflamacije i dalje prisutna.(Slika 24.)



Slika 24.– Imunohistohemija na Iba1 17. Dan (originalna slika)

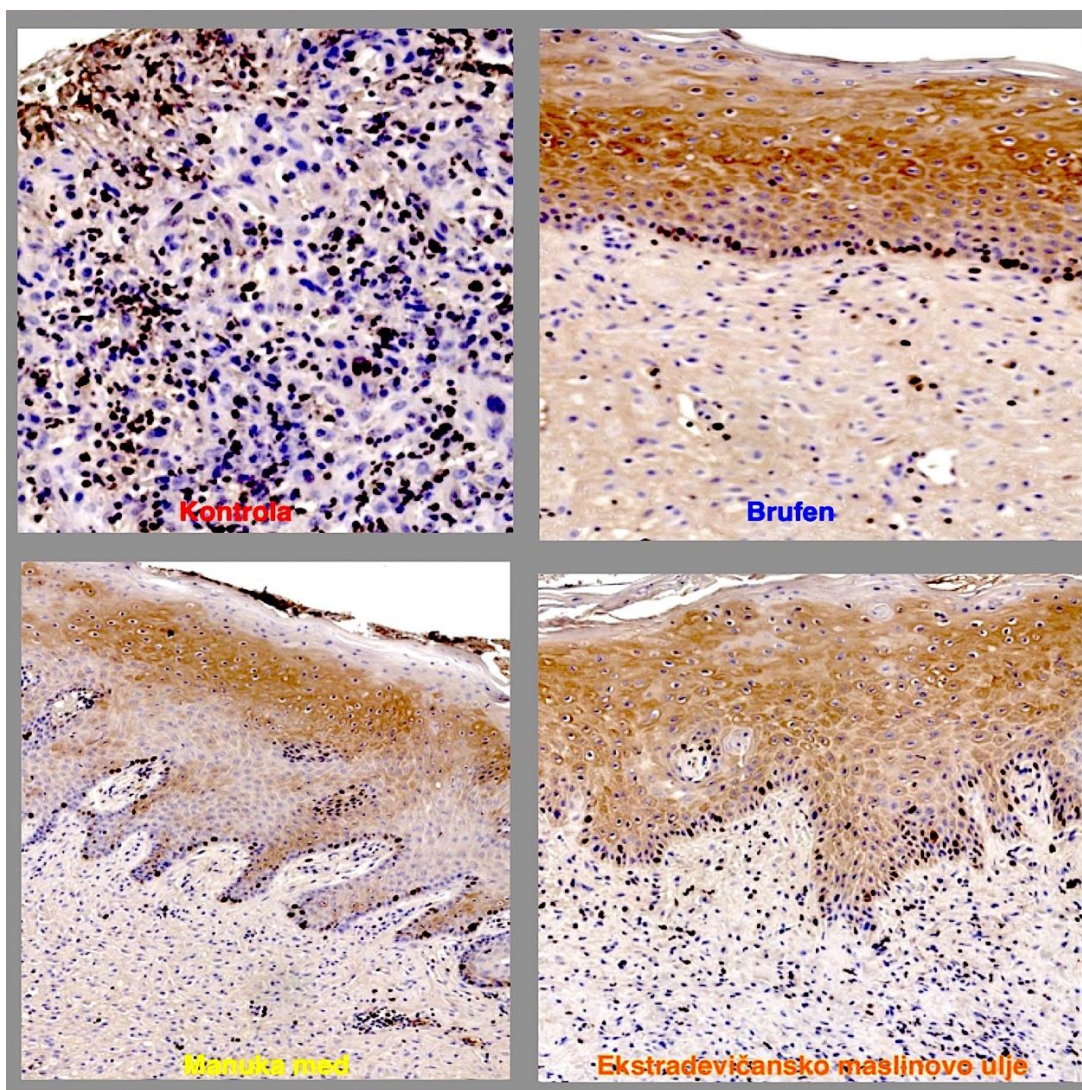
4.3.3 Imunohistohemijsko bojenje Ki67

Imunohistohemija Ki67 bojenje je utvrđivalo sposobnost deobe ćelija. Desetog dana istraživanja, najmanja aktivnost je verifikovana u kontrolnoj grupi, dok je najveća verifikovana u Brufen grupi. (Slika 25.)



Slika 25. – Ki 67 imunohistohemija 10. dan istraživanja (originalna slika)

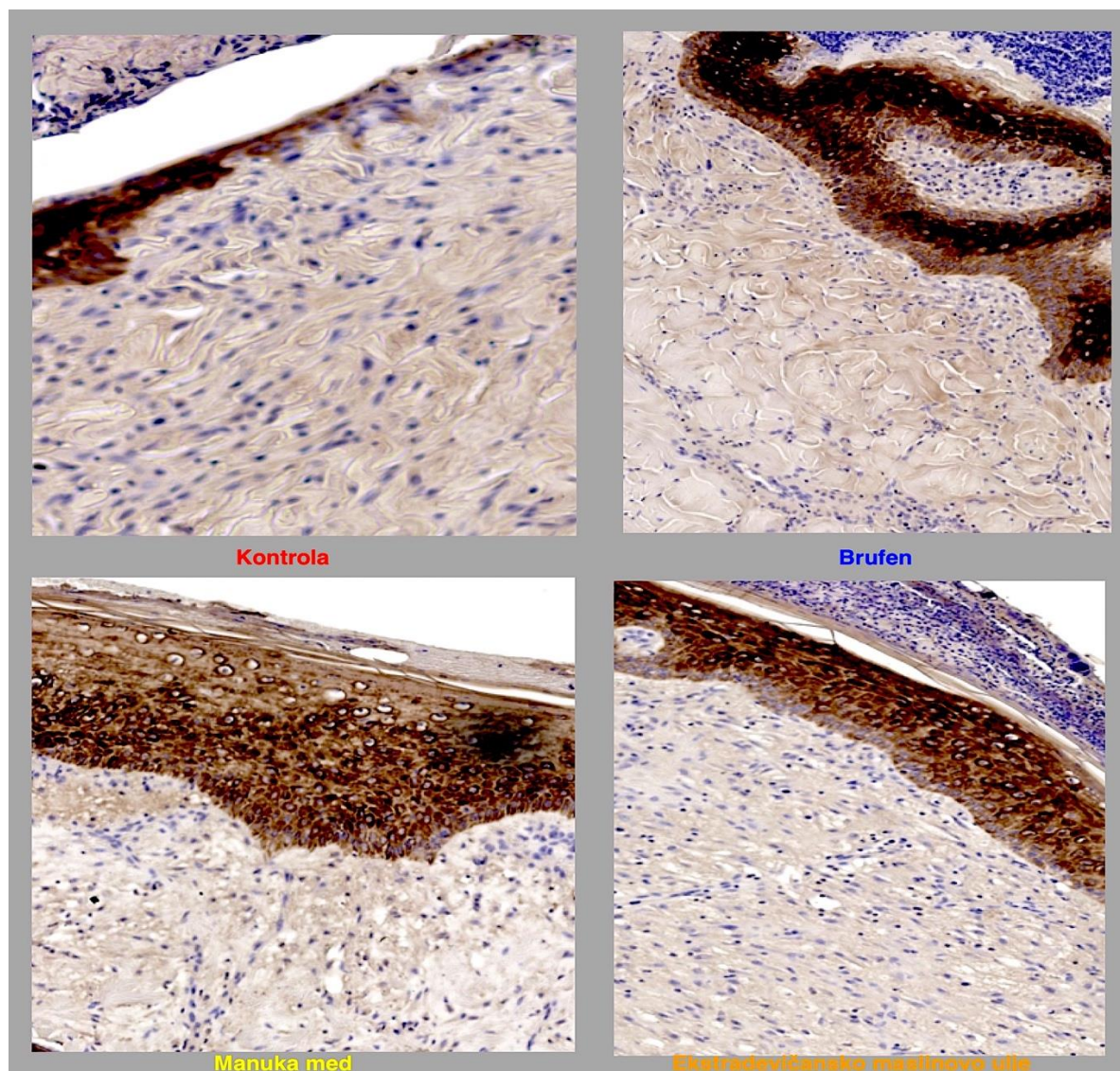
Imunohistohemijsko bojenje Ki67 u 17. danu je pokazivala najveću deobu ćelija u u organizacionom granulacionom tkivu kod kontrolne grupe, pa potom kod grupe sa ekastradevičanskim maslinovim uljem, dok je deoba ćelija kod grupa Brufen i Manuka med bila izrazito mala u organizacionom granulacionom tkivu, ali je zato bila izražena u bazalnom sloju epiderma, što je ukazivalo da je proces reepitelizacije pri kraju.(Slika 26.)



Slika 26.- Ki67 bojenje u 17. danu istraživanja (originalna slika)

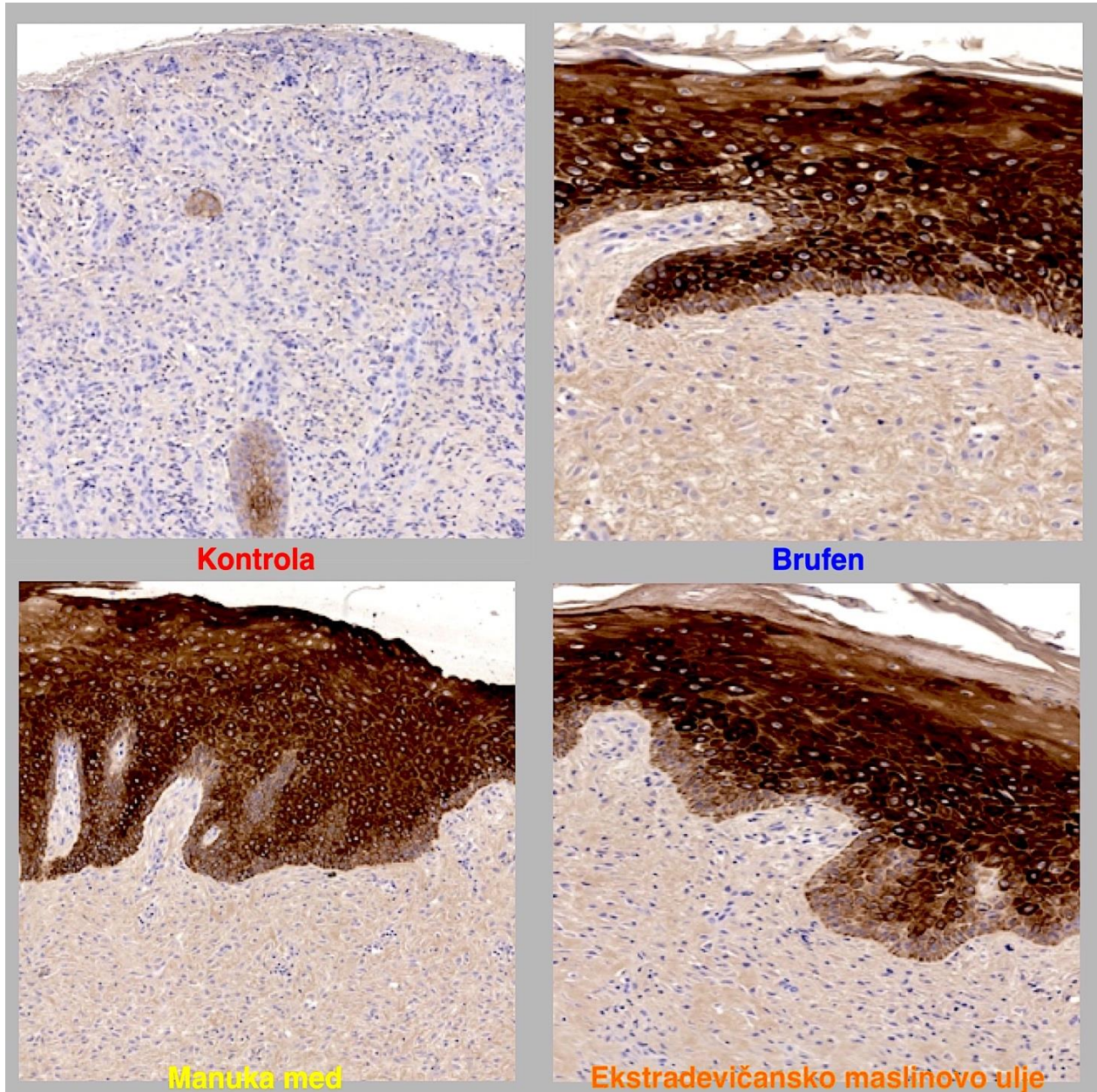
4.3.4 Imunohistohemijsko bojenje na Pancitokeratin

Imunohistohemijsko bojenje na Pancitokeratin desetog dana istraživanja je pokazao najbolje formiran epitel kod Manuka med grupe dok je kod kontrolne grupe najslabije izražen. (Slika 27.)



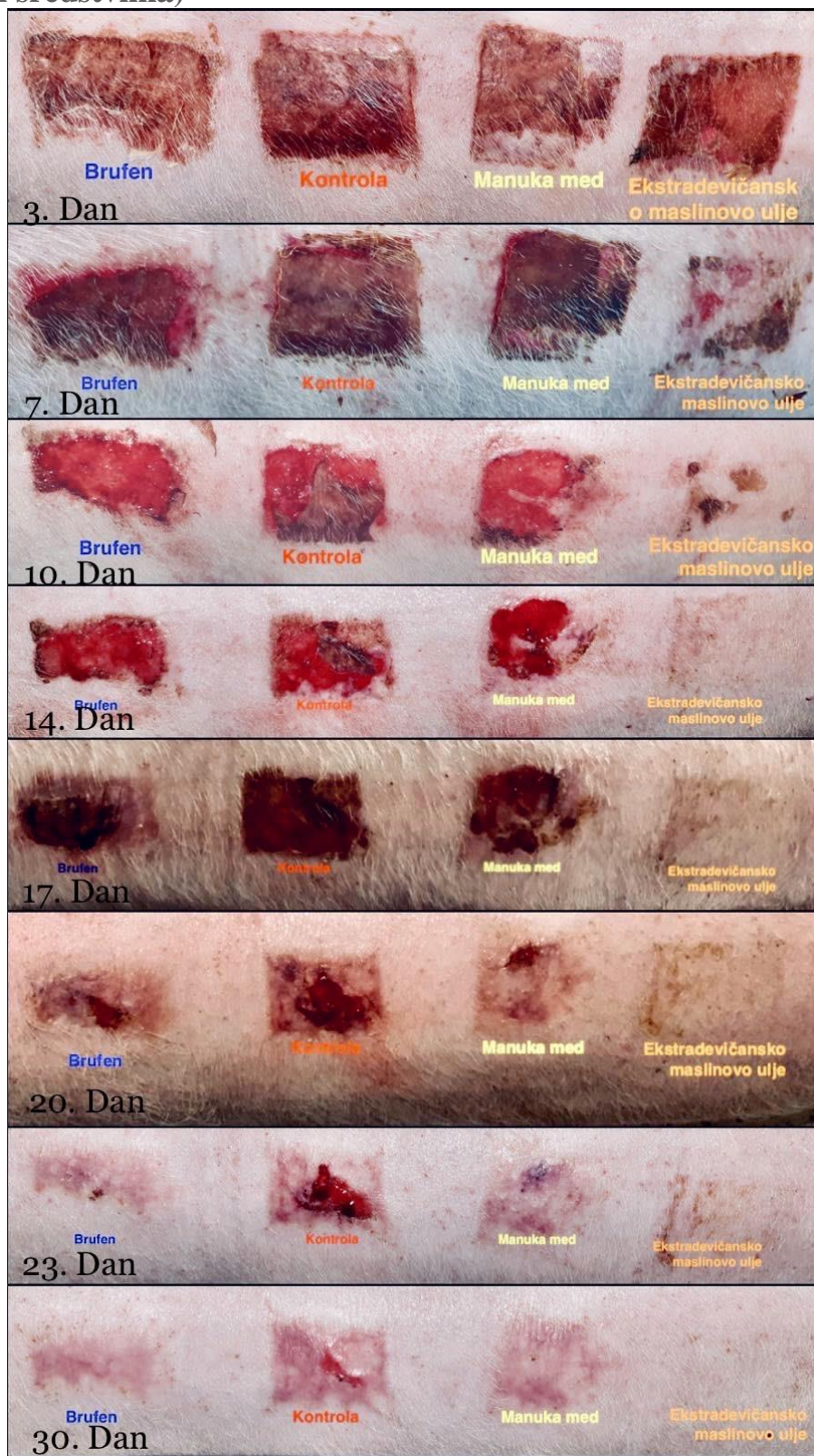
Slika 27. – Imunohistohemijsko bojenje na Pancitokeratin 10. dan istraživanja (originalna slika)

Pancitokeratin bojenje prikazano je i 17. dana istraživanja. Neformiran epitel je uočen kod kontrolne grupe, tek minimalno izražen uz folikul dlake, dok je kod ostalih grupa prisutan dobro formiran epiderm. Najmanje epidermalne prečke su bile uočene kod grupe Brufen, što govori da je dobro diferentovan epitel najboljih karakteristika. (Slika 28.)



Slika 28. – Imunohistohemijsko bojenja na Pancitokeratin 17. Dan istraživanja (originalna slika)

4.4 Planimetrija (merenje površine reepitelizacije kroz vreme sa različitim topikalnim sredstvima)



Slika 29. – Prikazano zarastanje opekotinske rane od 3. do 30 dana. (originalna slika)

Merena je površina reepitelizacije tj. smanjivanje površine otvorene rane od vremena nanošenja termičke povrede pa sve do potpune epitelizacije.

Prvog dana (nulti dan) kod svih tretiranih grupa opekotina zabeležene su istovetne površine sa opekotinskim povredama, stoga se računalo kao da sve grupe imaju 0% reepitelizacije. U narednom periodu praćen je proces reepitelizacije svih opekotina koji je trajao sve do 32. dana. Srednje vrednosti i medijane procenata reepitelizacije opekotina tokom trećeg (3. dan), sedmog (7. dan), desetog (10. dan), četrnaestog (14. dan), sedamnaestog (17. dan), dvadesetog (20. dan), dvadeset i trećeg (23. dan), tridesetog (30. dan), trideset i prvog (31. dan) i trideset i drugog (32. dan) dana, za svaku grupu različito tretiranih opekotina su prikazani u Tabeli 15.

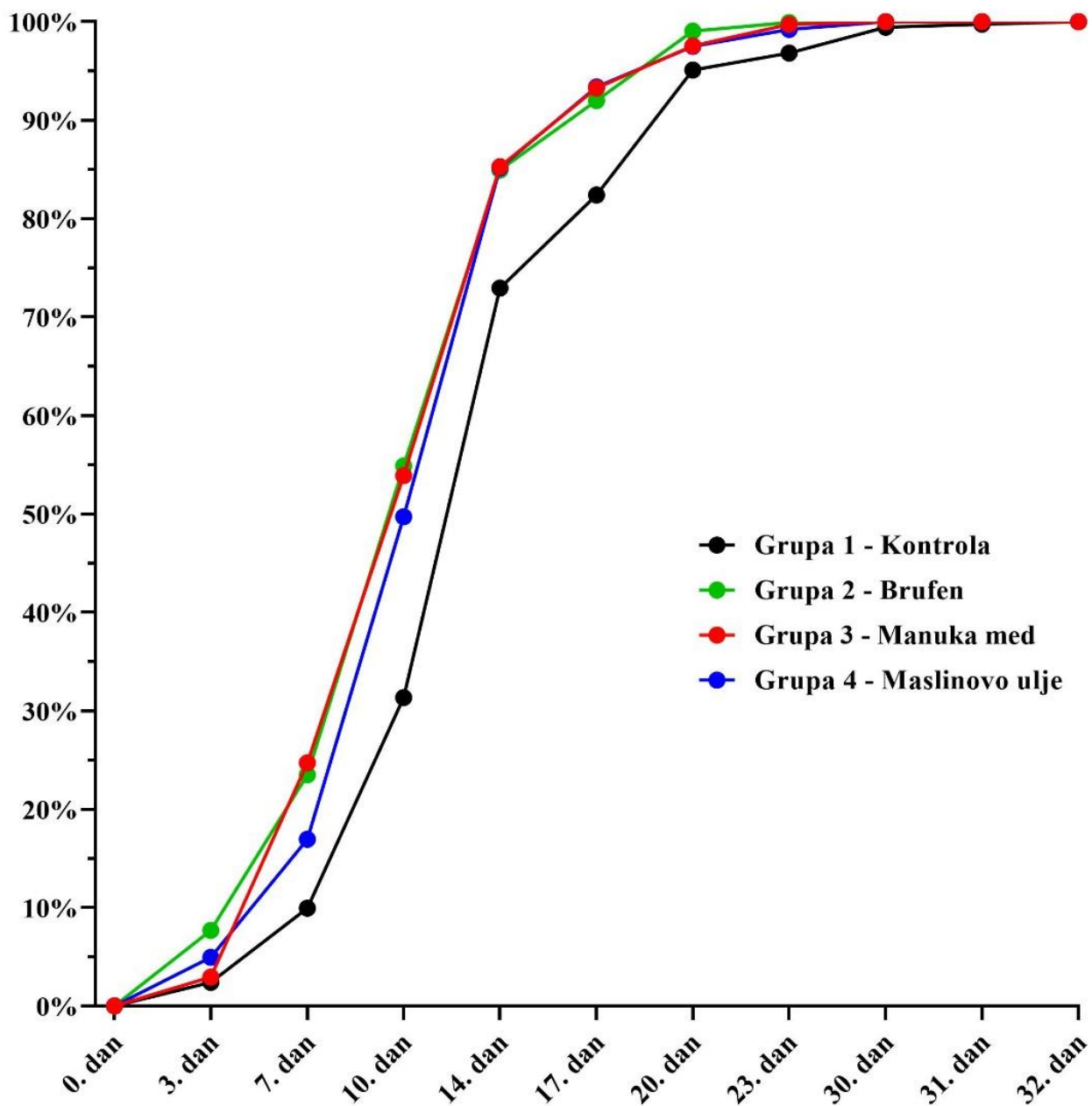
Uz pomoć Kruskal–Volisovog (*Kruskal–Wallis*) testa, utvrđena je statistički značajna razlika između različito tretiranih opekotina za 3. dan ($\chi^2 = 10,66$; $p = 0,01$), 7. dan ($\chi^2 = 8,59$; $p = 0,04$) i 10. dan ($\chi^2 = 1809$; $p < 0,001$).

Trećeg dana od početka oglada, Grupa 2 – Brufen je imala statistički značajno veći procenat smanjenja opekotinske rane od Grupe 1 – Kontrola ($U = 68,00$; $p = 0,002$) i Grupe 3 – Manuka med ($U = 85,00$; $p = 0,014$) (Tabela 15, Grafikon 23). Sedmog dana, Grupa 1 – Kontrola je imala statistički značajno veću reepitelizovanu površinu od Grupe 2 – Brufen ($U = 71,00$; $p = 0,003$) i Grupe 3 – Manuka med ($U = 97,00$; $p = 0,04$) (Tabela 15, Grafikon 23). Desetog dana, Grupa 1 – Kontrola je imala statistički značajno manji procenat epitelizacije od Grupe 2 – Brufen ($U = 41,00$; $p < 0,001$), Grupe 3 – Manuka med ($U = 77,00$; $p = 0,006$) i Grupe 4 – Maslinovo ulje ($U = 46,50$; $p < 0,003$) (Tabela 15, Grafikon 23).

Kod preostalih dana u toku oglada, sve do trideset i drugog dana (potpuna epitelizacija svih opekotina), uočeno je da se reepitelizacija znatno sporije odvijala kod Grupe 1 – Kontrola u odnosu na sve preostale ispitivane grupe, ali nije nađena statistički značajna razlika (Tabela 15, i Grafikon 23).

Dan	Grupa	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)	Medijana (M)
3. dan	Grupa 1 – Kontrola	2,42	1,95	1,75
	Grupa 2 – Brufen	7,69	6,69	5,00
	Grupa 3 – Manuka med	2,94	2,73	2,00
	Grupa 4 - Maslinovo ulje	4,94	4,92	3,00
7. dan	Grupa 1 – Kontrola	9,94	8,235	8,00
	Grupa 2 – Brufen	23,50	15,57	23,00
	Grupa 3 – Manuka med	24,72	24,54	16,00
	Grupa 4 - Maslinovo ulje	16,94	10,20	18,50
10. dan	Grupa 1 – Kontrola	31,33	16,90	28,00
	Grupa 2 – Brufen	54,89	15,54	54,32
	Grupa 3 – Manuka med	53,89	24,25	62,00
	Grupa 4 - Maslinovo ulje	49,72	14,44	46,50
14. dan	Grupa 1 – Kontrola	72,94	23,79	81,50
	Grupa 2 – Brufen	84,94	17,13	90,00
	Grupa 3 – Manuka med	85,28	15,58	91,50
	Grupa 4 - Maslinovo ulje	85,17	14,45	88,50
17. dan	Grupa 1 – Kontrola	82,39	22,69	91,50
	Grupa 2 – Brufen	92,00	10,79	96,00
	Grupa 3 – Manuka med	93,28	10,36	99,50
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	93,39	8,65	97,50
20. dan	Grupa 1 – Kontrola	95,11	7,251	91,50
	Grupa 2 – Brufen	99,06	1,69	96,00
	Grupa 3 – Manuka med	97,56	5,58	99,50
	Grupa 4 - Maslinovo ulje	97,50	4,98	97,50
23. dan	Grupa 1 – Kontrola	96,83	5,57	100,00
	Grupa 2 – Brufen	99,94	0,23	100,00
	Grupa 3 – Manuka med	99,72	1,17	100,00
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	99,22	1,86	100,00
30. dan	Grupa 1 – Kontrola	99,44	1,38	100,00
	Grupa 2 – Brufen	100,00	100,00	100,00
	Grupa 3 – Manuka med	100,00	100,00	100,00
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	100,00	100,00	100,00
31. dan	Grupa 1 – Kontrola	99,75	0,78	100,00
	Grupa 2 – Brufen	100,00	100,00	100,00
	Grupa 3 – Manuka med	100,00	100,00	100,00
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	100,00	100,00	100,00
32. dan	Grupa 1 – Kontrola	100,00	100,00	100,00
	Grupa 2 – Brufen	100,00	100,00	100,00
	Grupa 3 – Manuka med	100,00	100,00	100,00
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	100,00	100,00	100,00

Tabela 15. Srednje vrednosti procenta reepitelizacije opekotina (%) u različitim vremenskim fazama



Grafikon 23. Procenat reepitelizacije opekotina u različitim vremenskim fazama

Pronađena je statistički značajna razlika u periodu epitelizacije opekotina u okviru različitih eksperimentalnih grupa (*Fishers's exact test* = 12,88; $p = 0,03$). U periodu posle 21. dana, statistički značajno najveći broj opekotina je epitelizovao u Grupi 1 – kontrola, dok je najmanji broj opekotina zarastao u Grupi 4 – Manuka med. Tokom perioda do 14. dana najviše opekotina je epitelizovalo u Grupi 3 – Manuka med (9; 12,5%), dok je najmanje opekotina epitelizovalo u Grupi 1 – Kontrola, ali bez statističke značajnosti.

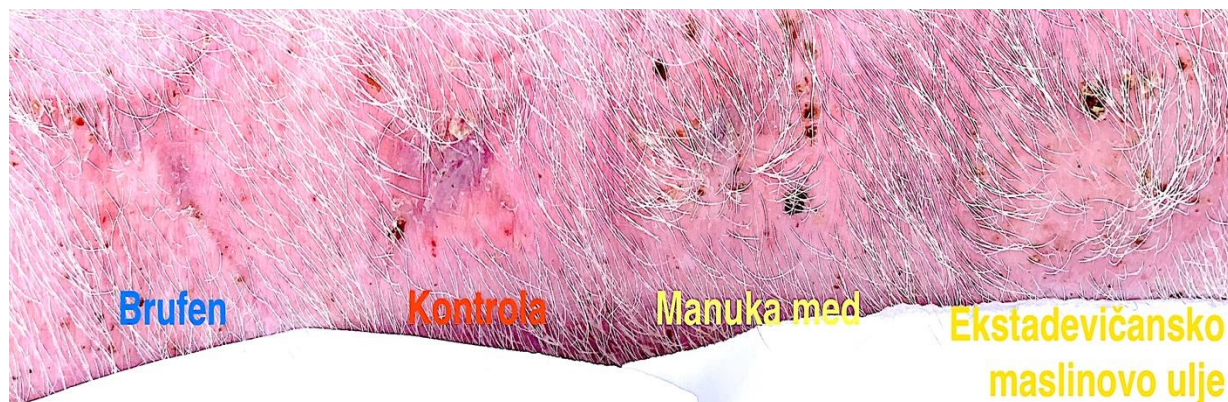
Gledajući čitav period epitelizacije, statistički najveći broj opekotina je zarastao 14–21. dana u okviru Grupe 2 – Brufen (Tabela 16.).

Grupe	Period epitelizacije			Ukupno	p
	U 14 dana	14-21 dan	Preko 21 dan		
Grupa 1 – Kontrola	2	10	6	18	0,03
	2,8%	13,9%	8,3%	25,0%	
Grupa 2 – Brufen	7	11	0	18	
	9,7%	15,3%	0,0%	25,0%	
Grupa 3 – Manuka med	9	8	1	18	
	12,5%	11,1%	1,4%	25,0%	
Grupa 4 – Maslinovo ulje	7	8	3	18	
	9,7%	11,1%	4,2%	25,0%	
Ukupno	25	37	10	72	
	34,7%	51,4%	13,9%	100,0%	

Tabela 16. Distribucija reepitelizacije opekotina u različitim vremenskim periodima

4.5 Evaluacija ožiljka

4.5.1 Makroskopska evaluacija ožiljka



Slika 30.- Makroskopski prikaz ožiljaka 60. dan (originalna slika)

Nakon šezdeset dana od početka ogleda, uz pomoć Vankuverske skale izvršena je evaluacija ožiljka. Kruskal–Volisov test je pokazao da ne postoji statistički značajna razlika u skorovima ožiljka po Vankuverskoj skali kod različitih tretmana opekotina ($\chi^2 = 2,85$; $p = 0,42$) (Tabela 17).

Dan	Grupa	Medijana (M)	Minimum (Min)	Maksimum (Max)
60. dan	Grupa 1 – Kontrola	3,00	0,00	8,00
	Grupa 2 – Brufen	2,50	0,00	6,00
	Grupa 3 – Manuka med	1,50	0,00	5,00
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	2,00	0,00	7,00

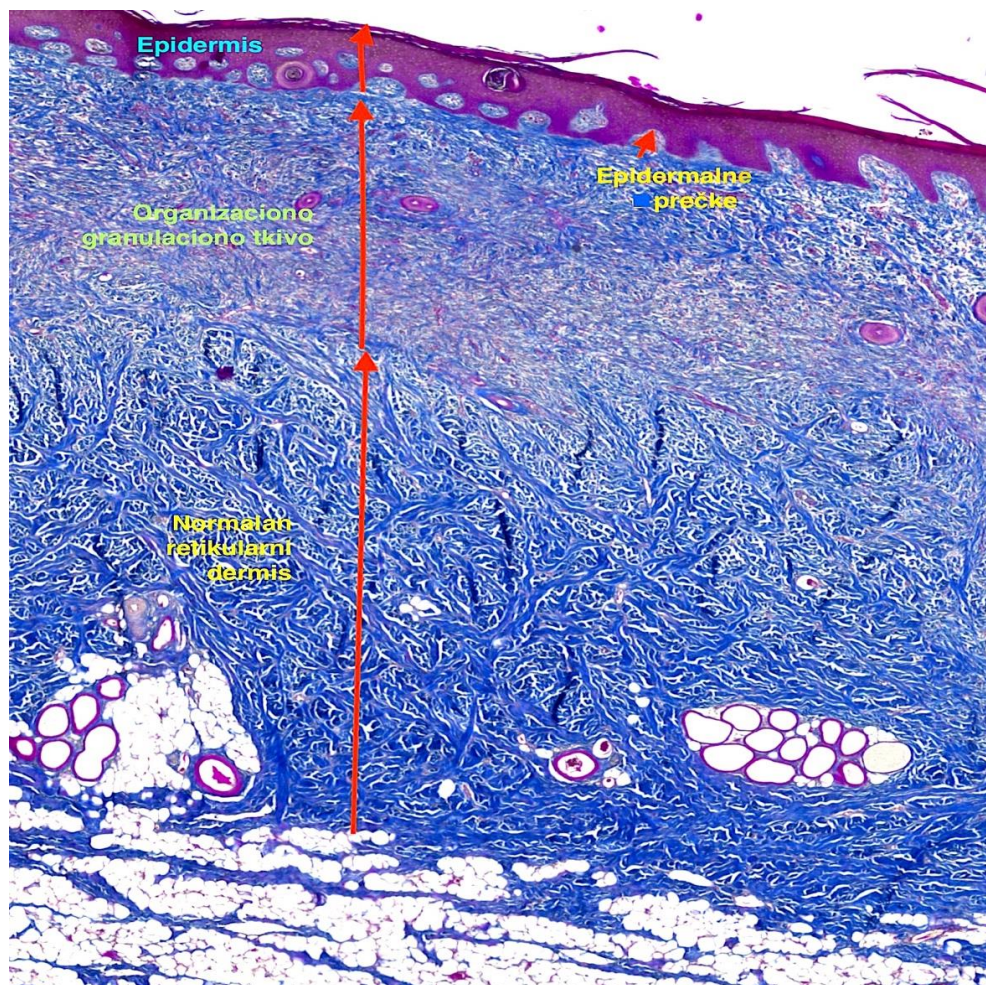
Tabela 17. Medijana, minimum i maksimum vrednosti skora ožiljka po Vankuverskoj skali kod različitih tretmana opekotina

Takođe je izračunato različito sažimanje ožiljka šezdesetog dana od počinjanja ogleda. Nije utvrđena statistički značajna razlika u srednjim vrednostima procenta sažimanja ožiljka kod različitih tretmana opekotina ($\chi^2 = 4,87$; $p = 0,18$) (Tabela 19).

Dan	Grupa	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)	Medijana (M)
60. dan	Grupa 1 – Kontrola	12,28	10,27	11,00
	Grupa 2 – Brufen	7,11	6,48	9,00
	Grupa 3 – Manuka med	5,50	7,17	5,00
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	8,28	8,13	8,50

Tabela 18. Srednje vrednosti procenta sažimanja ožiljka (%) kod različitih tretmana opekotina

4.5.2 Patohistološka evaluacija ožiljka



Slika 31. – Patohistološki prikaz ožiljka 60. dan. Masson trihrom bojenjem (originalna slika)

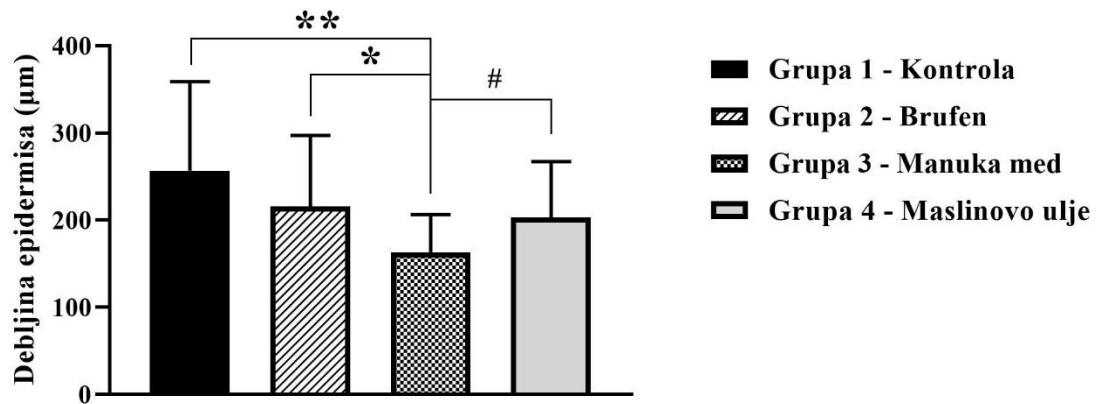
Srednje vrednosti debljine epidermisa i epidermalnih prečki kod različitih tretmana opekotina za 60. dan prikazani su u Tabeli 19. Dokazana je statistički značajna razlika u prosečnoj debljini epidermisa ($\chi^2 = 11,46$; $p = 0,009$) i epidermalnih prečki ($\chi^2 = 32,11$; $p < 0,001$) kod različitih tretmana opekotina.

U Grupi 3 – Manuka med, prosečna debljina epidermisa je bila statistički značajno manja od prosečne debljine epidermisa u Grupi 1 – Kontrola ($U = 84,50$; $p = 0,002$), Grupi 2 – Brufen ($U = 122,00$; $p = 0,04$) i Grupi 4 – Maslinovo ulje ($U = 124,00$; $p = 0,04$) (Tabela 19, Grafikon 24).

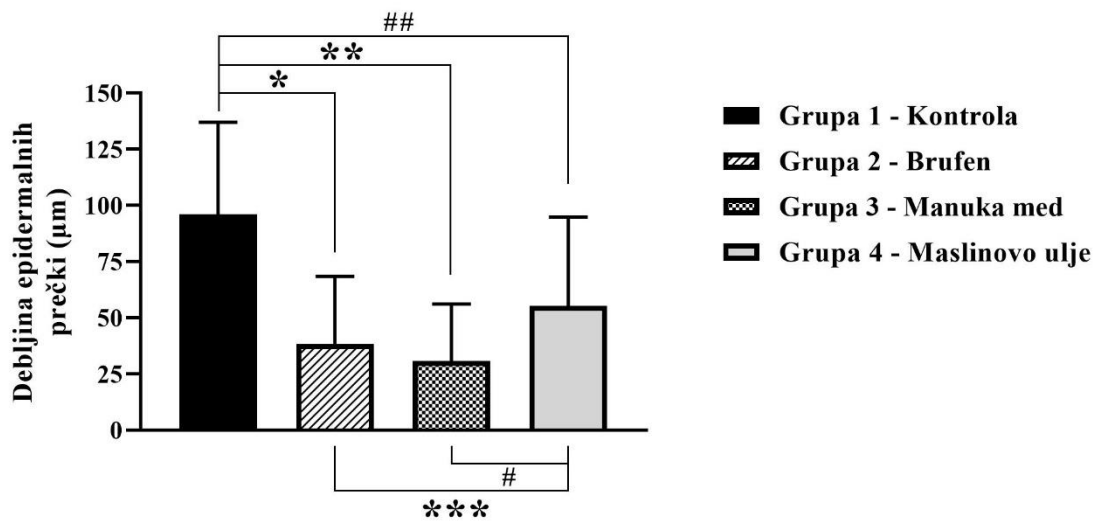
Kad su u pitanju epidermalne prečke, njihova prosečna dužina u Grupi 1 – Kontrola je bila statistički značajno veća prosečne dužine u Grupi 2 – Brufen ($U = 47,00$; $p < 0,001$), u Grupi 3 – Manuka med ($U = 32,00$; $p < 0,001$) i Grupi 4 – Maslinovo ulje ($U = 77,00$; $p = 0,001$). U Grupi 4 – Maslinovo ulje, prosečna dužina epidermalnih prečki je statistički značajno veća u odnosu na prosečnu dužinu u Grupi 2 – Brufen ($U = 123,00$; $p = 0,04$) i Grupi 3 - Manuka med ($U = 75,00$; $p = 0,001$) (Tabela 19, Grafikon 25).

	Grupa	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)	Medijana (M)
Epidermis (μm)	Grupa 1 – Kontrola	256,72	102,05	248,08
	Grupa 2 – Brufen	215,49	81,74	199,01
	Grupa 3 – Manuka med	162,69	43,73	162,46
	Grupa 4 - Maslinovo ulje	203,09	64,029	197,01
Epidermalne prečke (μm)	Grupa 1 – Kontrola	96,21	40,86	105,93
	Grupa 2 – Brufen	38,34	30,15	31,26
	Grupa 3 – Manuka med	30,83	25,37	32,26
	Grupa 4 - Maslinovo ulje	55,28	39,69	58,42

Tabela 19. Srednje vrednosti debljine epidermisa i epidermalnih prečki kod različitih tretmana opekotina (60. dan)



Grafikon 24. Srednje vrednosti debljine epidermisa – 60. dan (*, #, ** p < 0,05)



Grafikon 25. Srednje vrednosti debljine epidermalnih prečki – 60. dan

(* , ** , p < 0,001; #, ##, *** p < 0,05)

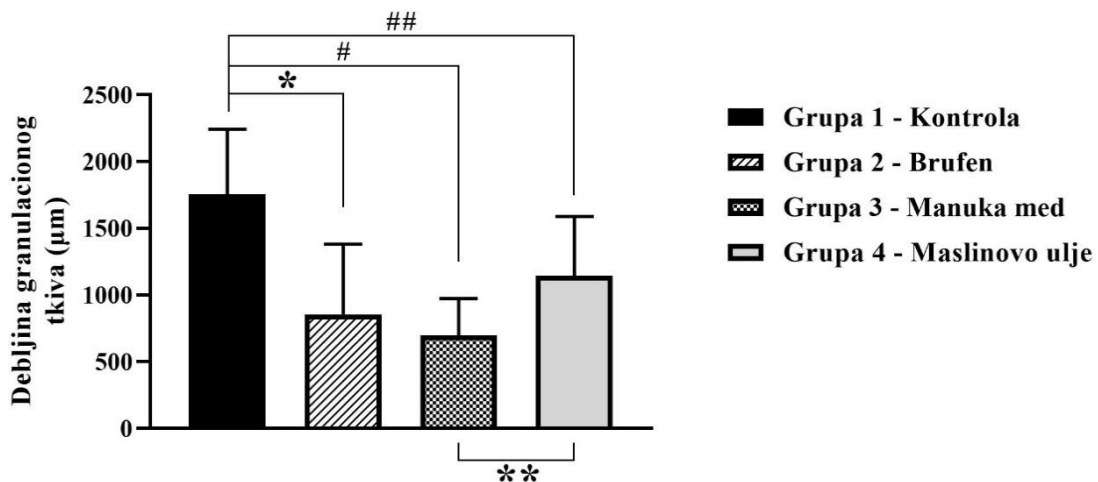
U Tabeli 20 su predstavljene prosečne debljine granulacionog tkiva i intaktnog retikularnog dermisa kod različitih tretmana opekotina za 60. dan. Kruskal–Volis test pokazao je statistički značajne razlike u prosečnoj debljini granulacionog tkiva ($\chi^2 = 35,47$; p < 0,001) i retikularnog dermisa ($\chi^2 = 18,67$; p < 0,001) kod različitih tretmana opekotina.

Prosečna debljina granulacionog tkiva u Grupi 1 – Kontrola je bila statistički značajno veća u odnosu na prosečnu debljinu granulacionog tkiva u u Grupi 2 – Brufen ($U = 46,00$; $p < 0,001$), u Grupi 3 – Manuka med ($U = 70,00$; $p < 0,001$) i Grupi 4 – Maslinovo ulje ($U = 70,00$; $p < 0,001$). U Grupi 4 – Maslinovo ulje, prosečna debljina granulacionog tkiva je statistički značajno veća u odnosu na prosečnu dužinu u Grupi 3 – Manuka med ($U = 127,00$; $p = 0,04$) (Tabela 20, Grafikon 26). Najmanje granulaciono tkivo bilo je prisutno u grupi kod koje je korišćen topikalno manuka med. (Slika 32)

Grupa 2 – Brufen ima statistički značajno veću srednju vrednost debljine intaktnog retikularnog dermisa u odnosu na Grupi 1 – Kontrola ($U = 51,50$; $p < 0,001$), Grupi 3 – Manuka med ($U = 91,00$; $p = 0,003$) i Grupi 4 – Maslinovo ulje ($U = 83,50$; $p = 0,002$) (Tabela 20, Grafikon 27,).

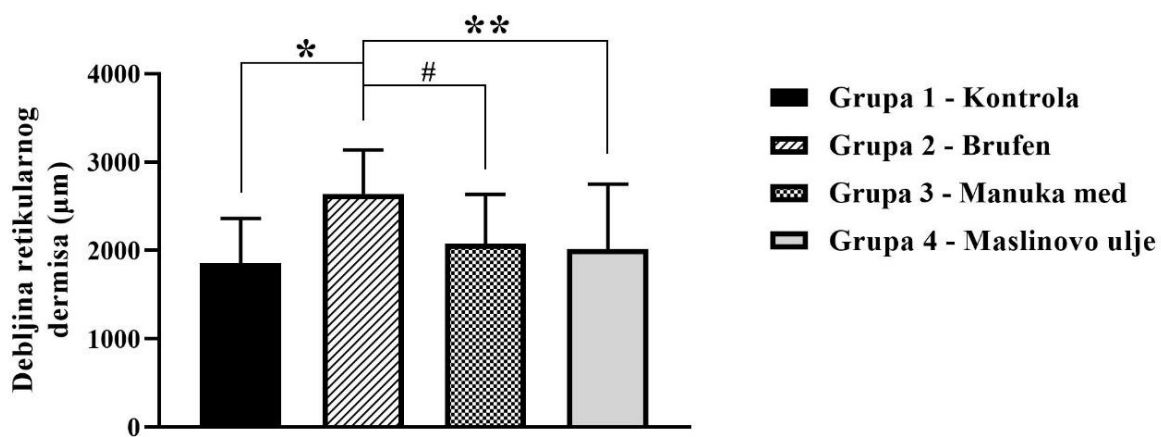
	Grupa	Srednja vrednost (\bar{x})	Standardna devijacija (SD)	Medijana (M)
Granulaciono tkivo (um)	Grupa 1 – Kontrola	1754,27	488,62	1697,72
	Grupa 2 – Brufen	854,18	525,98	708,16
	Grupa 3 – Manuka med	698,95	275,24	649,01
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	1144,03	444,39	1051,55
Intaktni Retikularni dermis	Grupa 1 – Kontrola	1853,59	507,59	1972,72
	Grupa 2 – Brufen	2642,43	496,38	2746,15
	Grupa 3 – Manuka med	2076,44	559,34	2081,82
	Grupa 4 – Maslinovo ulje	2015,23	736,95	1958,76

Tabela 20. Srednje vrednosti debljine granulacionog tkiva i intaktnog retikularnog dermisa kod različitih tretmana opekotina (60. dan)



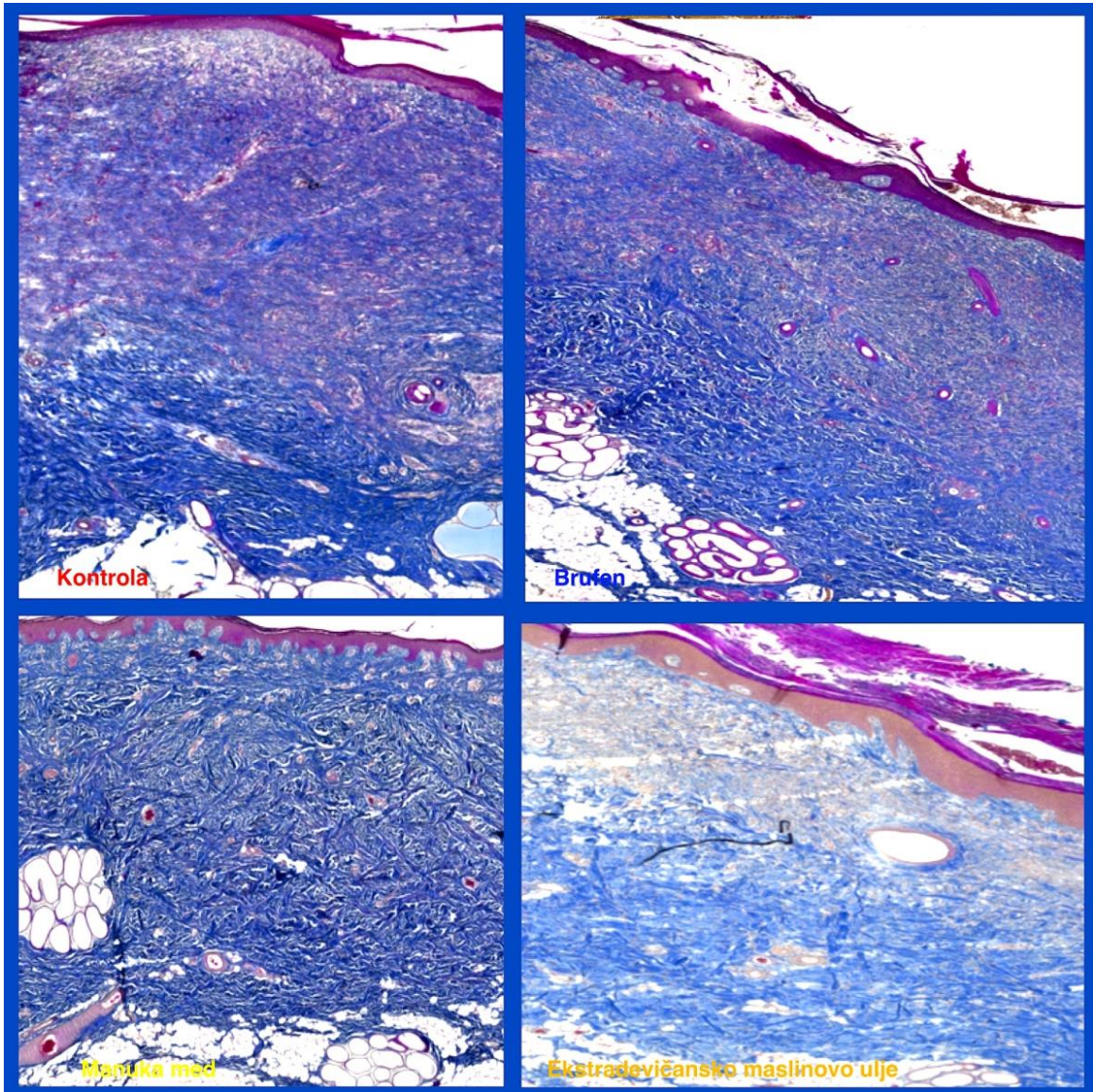
Grafikon 26. Srednje vrednosti debljine granulacionog tkiva – 60. dan

(* , #, ## p < 0,001; ** p < 0,05)



Grafikon 27. Srednje vrednosti intaktnog retikularnog dermisa – 60. dan

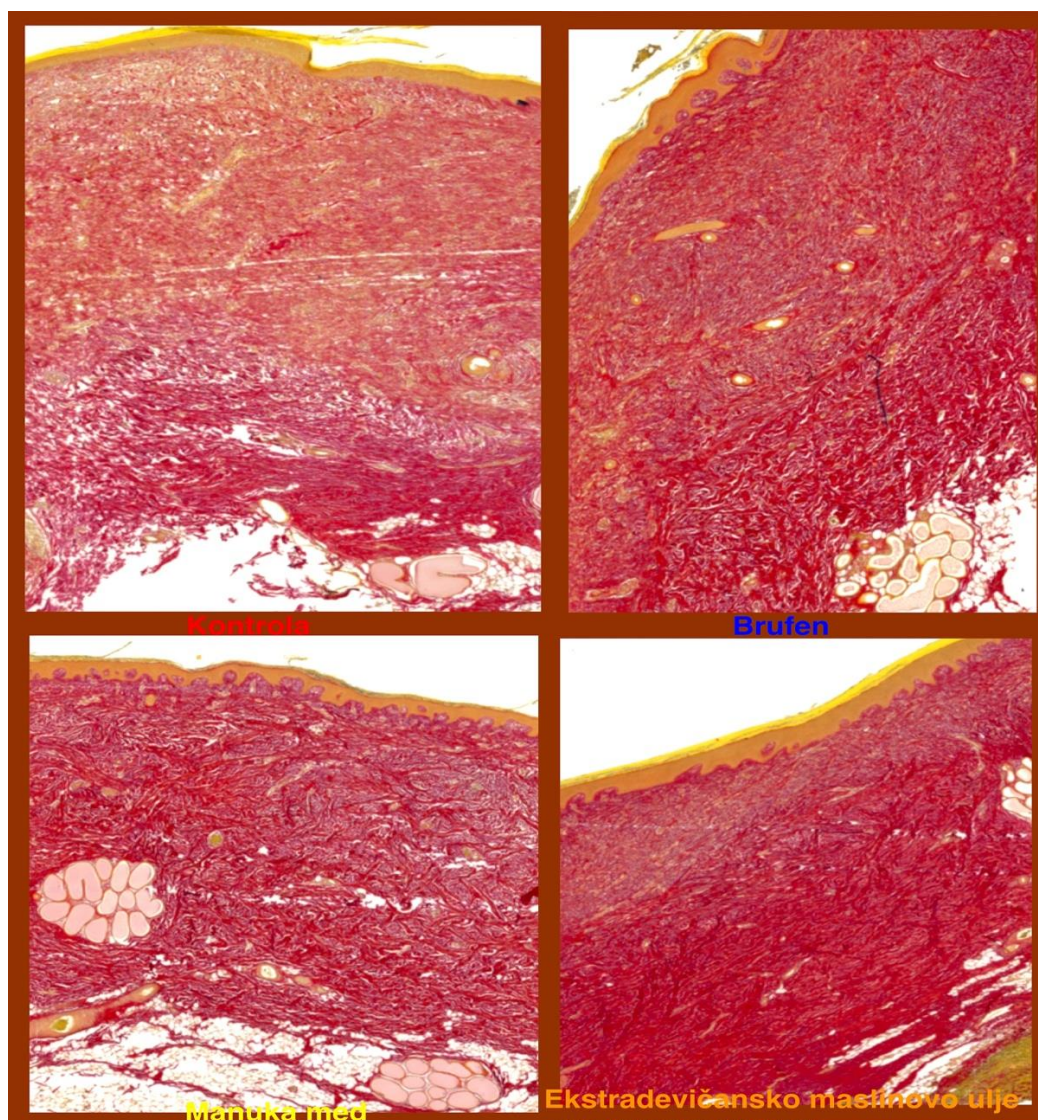
(* p < 0,001; #, ** p < 0,05)



Slika 32. –Patohistološki prikaz ožiljaka Masson trihrom bojenjem (originalna slika)

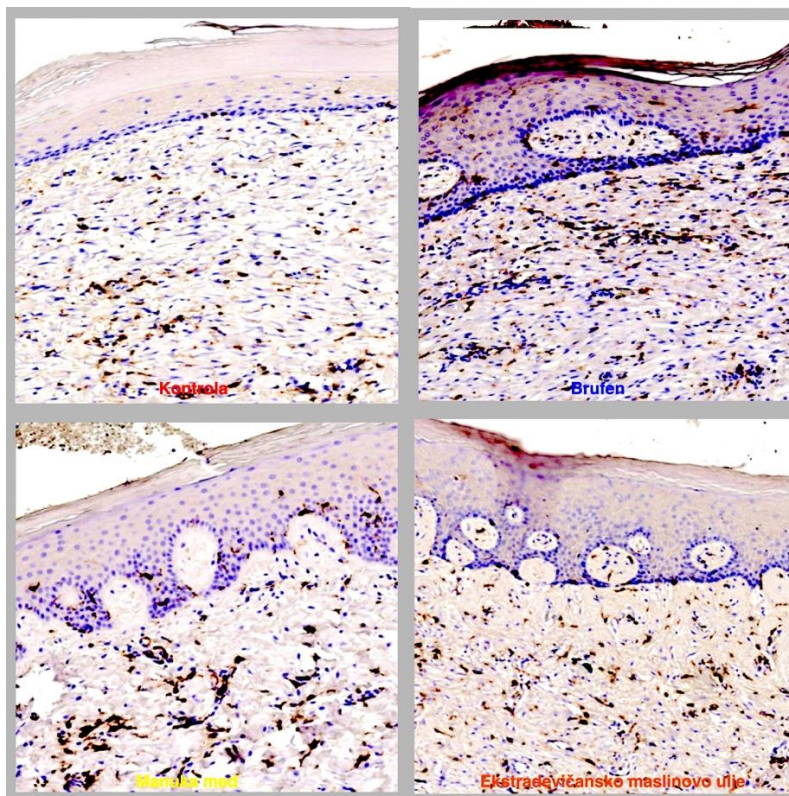
4.5.3 Imunohistochemijska i histochemijska obrada ožiljka

Picrosirius histochemijsko bojenje pokazuje da je denzitet kolagena najslabiji kod kontrolne grupe, kao i raspored vlakana koja su dominantno postavljena vertikalno, dok je kod ostalih grupa denzitet značajno bio veći, a vlakna su bila pretežno postavljena horizontalno. (Slika 33.)



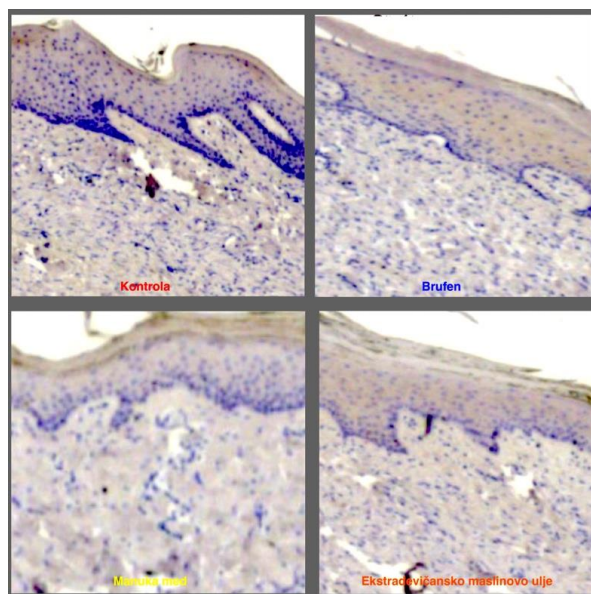
Slika 33.- Picrosirius red 60. dan istraživanja (originalna slika)

Imunohistohemijsko bojenje na Iba1 pokazalo je podjednaku aktivnost makrofaga kod svih grupa.(Slika 34.)



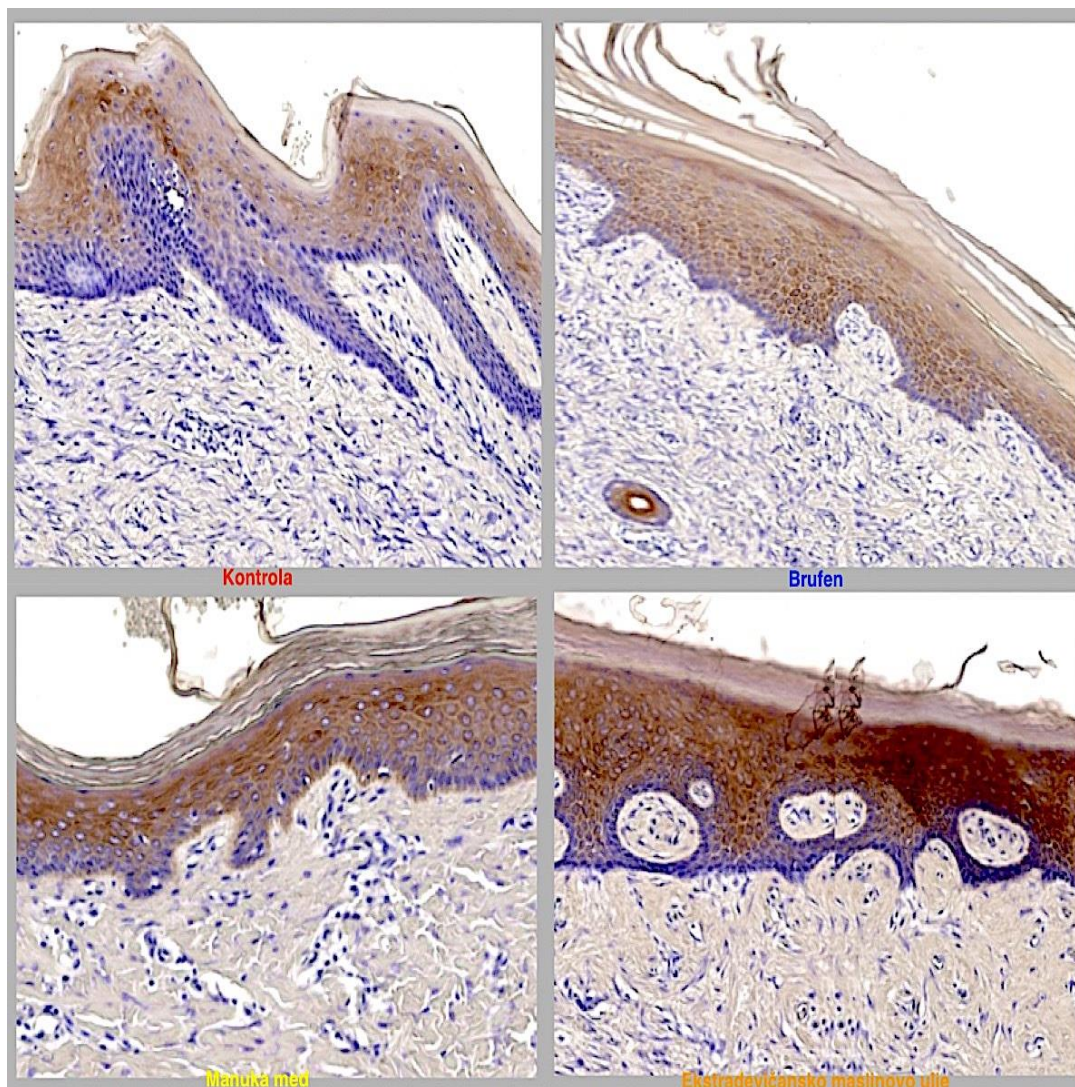
Slika 34. – Iba1 imunohistohemija 60. dan (originalna slika)

Imunohistohemijsko bojenje deobe ćelija Ki67 nije pokazao značajnu deobu ćelija ni kod jedne grupe, te su ćelije bile u M0 fazi. (Slika 35.)



Slika 35.- Ki67 bojenje bez aktivnosti 60. dan istraživanja (originalna slika)

Imunohistohemijsko bojenje na Pancitokeratin 60. dana ogleda pokazalo je najbolje morfološke karakteristike epiderma najmanji epiderm je bio kod Manuka meda, pa kod Brufena, Ekstradevičanskog maslinovog ulja, kao i veličina epidermalnih prečki, dok je najgori rezultat bio kod kontrolne grupe. (Slika 36)



Slika 36. –Imunohistohemijsko bojenje na Pancitokeratin 60. dan (originalna slika)

4.6 Komplikacije

Tokom ogleda imali smo komplikacije u vidu prolapsa rektuma kod tri ogledne životinje, koji su uspešno zbrinuti. Kod ogledne životinje broj 1 javio se prolaps rektuma 10. postoperativnog dana koji je zbrinut repozicijom i šavom duvankese, potom smo imali recidiv kod iste životinje 23. postoperativnog dana, koji je zbrinut uz pomoć multiplih šavova uz korišćenje sonde CH23. Nakon hirurškog lečenja nije bilo novih komplikacija. Kod ogledne životinje 7 i 8 imali smo prolaps rektuma 17. postoperativnog dana, koji je uspešno zbrinut je repozicijom i šavom duvankese bez daljih komplikacija.



Slika 37. – Zbrinjavanje prolapsa rektuma repozicijom i šavom duvankese svinja broj 7 (17. postoperativni dan)



Slika 38. – Korišćenje sonde i stavljanje multiplih šavova kod recidiva prolapsa rektuma (originalna slika)

Kod ogledne životinje broj 3 imali smo prelom potkolenice 26. postoperativnog dana koji je uspešno lečen konzervativnim putem.

Nijedna ogledna životinja nije morala da bude isključena iz studije i sve su nakon 60 dana vraćena u prirodni zapat.

5.0 Diskusija

Lečenje opekotinskih povreda i dalje predstavlja veliki klinički izazov i dugoročni socioekonomski problem. Izbor idealnog sredstva koje bi trebalo da poseduje sve pozitivne karakteristike u vidu: antimikrobnog delovanja, bezbolne aplikacije, uticaja na derivate arahidonske kiseline, citokine, hemokine, odnosno blagotvorno dejstvo na sve faze zarastanja opekotinske rane je zadatak koji se i dalje postavlja u naučnoj javnosti. Rezultatima ove studije se pokušao dati jasniji uvid u mogućnosti upotrebe različitih topikalnih sredstava koje se koriste ili bi se mogli koristiti u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

5.1 Inhibitori COX u opekotinskoj rani

Po delovanju noxe u vidu visoke temperature dolazi do javljanja opekotinske rane koja, po opisu Džeksona, ima tri zone [2]. U prva tri dana postoji mogućnost produbljivanja opekotinske rane usled mikrotromboze krvnih sudova. Ova pojava može dovesti do progresije opekotinske rane [3]. Ovaj fenomen je naročito izražen kod opekotinskih povreda parcijalne dubine kože. Jedan od ključnih razloga za ovakvu pojavu je oslobađanje arahidonske kiseline. Delovanjem enzima cikloksigenaze i lipooksigenaze dolazi do transformacije arahidonske kiseline u svoje derivate kao što su prostaglandini, tromboksani i leukotrijeni [48,53]. Neki od ovih metabolita mogu negativno uticati na lokalni nalaz opekotinske rane. Jedan od glavnih razloga je vazokonstrikcija krvnih sudova na nivou mikrovaskularizacije, koja nastaje delovanjem metabolita prostaglandina kao što su tromboksani TXA_2 koji pored vazokonstrikcije dovode i do agregacije trombocita u krvnim sudovima i stvaranje tromba [59,60].

Ibuprofen je neselektivni inhibitor ciklooksigenaze koji može da inhibiše transformaciju prostaglandina u tromboksane i samim tim dovede zonu staze u zonu hiperemije, odnosno smanji dubinu opekotinske rane koja je bitna za ishod i brzinu zarastanja rana. Ibuprofen se može naći u topikalnom sredstvu kao što su 10%-tne i 5%-tne masti.

U našoj studiji je u jednoj eksperimentalnoj grupi, prva tri dana korišćena topikalno 5% Ibuprofen mast da bi se u narednim danima koristila antibiotska mast koja je upotrebljavana i za kontrolnu grupu. Želeli smo da utvrdimo da li topikalno dejstvo Ibuprofen masti može uticati, odnosno smanjiti inicijalnu dubinu opekotinske rane.

Sve rane koje smo pratili podelili smo po brzini reepitelizacije na tri kategorije: one koje su zarasle u 14 dana (površne dermalne), one koje su zarasle do 21. dana (mezodermalne) i one koje su zarasle nakon 21 dana (duboke dermalne). Pokazali smo da je kod grupe kod koje je prva tri dana korišćena Brufen mast kao topikalno sredstvo došlo do smanjenja broja dubokih dermalnih opekotina, šta više: od 18 opekotina koje smo tretirali sa ovim preparatom sve su zarasle unutar 21 dana. Unutar prvih 14 dana zaraslo je 39% opekotina, a ostalih 61% zaraslo je unutar 21 dana (mezodermalne). Kod kontrolne grupe, svega 11% opekotina je zaraslo unutar 14 dana (površne dermalne), 55% su bile mezodermalne i zarasle su unutar 21 dana, dok je 33% zaraslo nakon 21. dana i ove opekotine su označene kao duboke dermalne.

Dubina derma kod svinje u proseku iznosi 1200 μm [134,135]. Patohistološkom analizom je prosečna dubina nekrotičnog tkiva posle trećeg dana kod kontrolne grupe iznosila oko 650 μm , dok je kod Brufen eksperimentalne grupe iznosila oko 460 μm . Kod kontrolne grupe polovina debljine derma je bila u proseku nekrotična, dok je kod Brufen grupe nekrotična bila u proseku oko trećina derma.

Kada je reč o merenju reepitelizacije kroz vreme, reepitelizacija je brže nastupila kod Brufenske grupe. U 10. danu istraživanja iznosila je oko 55% kod Brufen grupe, a kod kontrolne grupe svega 31%. U 17. danu istraživanja reepitelizacija kod Brufen grupe iznosila je 92%, a kod kontrolne 82%.

Ovakav rezultat je sličan istraživanjima koja su objavili Hegers i saradnici u dve studije. [56,57]. Oni su takođe patohistološki verifikovali da topikalni Brufen može da utiče na smanjenu aktivnost TxA₂ pa samim tim i da bude odgovoran za bržu reepitelizaciju. Patohistološki rezultati naše studije se podudaraju sa studijama koju su obavili Hegers i saradnici.

Da je odnos prostaglandina i tromboksana u opekotinskoj rani bitan za mikrotrombozu i smanjenje dubine opekotinske rane prikazali su Huang i Kac [55,139]. U studiji kod ljudi koji su oralno dobijali Ibuprofen došlo je do brže reepitelizacije opekotinske rane.

Topikalno delovanje 5% Flurbiprofen masti na ovcama pokazao je i LaLonde u svojoj studiji, utvrdivši da je došlo do smanjivanja hipermetabolizma opekotinske rane pa samim tim i smanjenja dubine opekotinske rane i prisustva posledičnih komplikacija [58].

U studiji na 757 pacijenata Huang i saradnici [140] pokazali su da prvih sedam dana davanja nesteroidnih antiinflamatornih (NSAI) lekova, osim smanjenja dubine opekotinske rane, može dovesti i do smanjenja pojave diseminovane intravaskularne koagulopatije.

Lihtenberger [141] je aplikovao topikalno na kožu i supkutano Ibuprofen na pacovima i pokazao je da kod dermalnih opekotina može da dovede i do analgetskog delovanja, kao i do smanjivanja dubine opekotinske rane. Ovakav rezultat u potpunosti se slaže sa našim istraživanjem.

Aktivnost makrofaga u vidu imunohistohemijskog bojenja Iba1 pokazao je da je u 10. i 17. danu aktivnost makrofaga značajno veća u kontrolnoj grupi, što sugeriše da je opekotinska rana u kontrolnoj grupi i dalje bila u fazi inflamacije. U ovoj fazi makrofazi naseljavaju ranu i ulaze u proces fagocitoze. Oslobađaju faktore rasta i citokine. Oni uključuju citokine kao što su inteleukin-1 (IL-1), inteleukin 6 (IL-6) i tumor nekrotizirajući faktor alfa (TNF- α). Studija Shah-a i Sim-a je pokazala da je nivo ovih citokina za 4 puta manji u ranama koje zarastaju, a da je povišen kod stagnirajućih rana.[142,143].

Formiranje epidermisa je verifikovano sa standardnim patohistološkim bojenjem (Masson trihrom i Hematozin-eozonofilin) i pancitokeratinskim imunohistohemijskim bojenjem. kod kontrolne grupe u 10. i 17. danu. Epiderm je bio slabo izražen ili nije ni postojao, dok je kod Brufen grupe bio znatno izraženiji pogotovo u 17. danu ogleđa. Ovaj imunohistohemijski parametar posebno je opisan u procesu zarastanja rana [144-146] Pancitokeratinska imunohistohemijska analiza podrazumeva identifikaciju antitela koja vezuje citokeratina 1 do citokeratina 20. Pomaže u razlikovanju epidermalnih keratocita od mezodermalnih ćelija koje ne luče keratin.

Imunohistohemijskom analizom Ki67, koji predstavlja marker deobe ćelija, utvrđeno je da se deoba ćelija u organizovanom granulacionom tkivu gotovo zaustavila u 17. danu istraživanja kod grupe kod koje je korišćena Brufen krema, dok je kod kontrolne grupe bila izražena. S druge strane je u Brufen grupi pokazana značajno veća aktivnost deobe ćelija u bazalnom sloju epidermisa na osnovu čega se moglo zaključiti da je faza proliferacije bila pri kraju kod Brufen grupe, dok je kod kontrolne grupe tek započeta reepitelizacija.

Analgetsko delovanje topikanog Ibuprofena je opisano u nekoliko studija [147-149]. Zbog složenosti izvođenja eksperimenta, rezultati našeg istraživanja iz tehničkih razloga nisu uključivali ovu vrstu ispitivanja.

Kod istraživanja od strane Amblera-a i saradnika je profilaktički korišćena Ibuprofen mast u cilju smanjenja dubine opekotinskih povreda koje su nastajale nakon korišćenja defibrilatora [150]. Ova studija potvrđuje tezu da Brufen može povoljno da utiče na dubinu opekotinske rane.

Da Ibuprofen utiče na perfuziju kod opekotinskih rana pokazali su Barou i saradnici na opekotinskim povredama koje su nanošene na zečijim ušima [151]. Pokazali su da topikalno aplicirana Ibuprofen mast povećava perfuziju ukoliko se koristi topikalno u odnosu na grupu kod koje je korišćen običan fiziološki rastvor. Samim tim, inhibicijom prostaciklina se može uticati na smanjenje pojave edema.

Novije studije [152,153] uključile su topikalno tretiranje opekotinske rane poliuretanom koji sadrži Ibuprofen. Pokazali su da je apsolutno bezbedno koristiti Ibuprofen kao topikalno sredstvo. Ispitivani pacijenti su izjavili da su imali znatno manji osećaj bola nakon zadobijanja opekotinskih rana i da je proces reepitelizacije bio kraći uz značajno manji broj previjanja. Nisu imali povećanu incidencu infekcija koja je bitna u zarastanju opekotinske rane. Svaka infekcija može dovesti do destrukcije epitela i granulacionog tkiva te produžiti proces zarastanja .

Iz svega se može zaključiti da Ibuprofen može bezbedno da se koristi kod opekotinskih rana, da deluje pozitivno na hiperperfuziju, da utiče analgetski na smanjenje bola i ubrzava reepitelizaciju rane putem smanjivanja dubine inicijalne opekotinske povrede. Premda brufen mast nema antiseptično dejstvo, nisu zabeleženi slučajevi povećanog prisustva infekcije, budući da je većina preparata bazirana na smanjivanju broja mikroorganizama. Može se smatrati da je aplikovanje Brufen masti prva tri dana nakon povređivanja bezbedno.

5.2 Manuka med u lečenju opekotinske rane

Mikrobiološka aktivnost meda je dobro poznata i koristi se od davnina [83-89]. Med nema mogućnost uticanja na derivate arahidonske kiseline, ali poseduje dobru antibakterijsku aktivnost. Manuka med koji je korišćen u našoj studiji pokazuje značajno bolje antibakterijske karakteristike od običnog meda zbog sadržaja supstanci kao što su: metilglioksali, bee-defensin 1 i melanoidi [90-92].

U našoj studiji je korišćen manuka med u nosaču od Ca-alginata. Prednost korišćenja kalcijum alginata u odnosu na direktnu aplikaciju meda je zbog visoke moći apsorpcije i formiranja hidrofилne strukture u formi gela, što omogućuje upijanje eksudata, zadržavanje mikroorganizama i atraumatično previjanje[91,118,120].

Patohistološkom analizom kojom je trećeg postoperativnog dana procenjivano oštećenja derma, utvrđeno je da je debljina nekroze kod kontrolne grupe iznosila je 662 μm , dok je kod manuka meda iznosila 657 μm . Reepitelizacija je u trećem danu kod kontrolne grupe iznosila 2,42%, dok je kod manuka meda iznosila 2,94%. Iz ovih parametara se može zaključiti da manuka med nije imao uticaj na delovanje zone staze u prva tri dana tokom povređivanja.

Kod grupe gde je korišćen manuka med je sedmog dana reepitelizacija iznosila 54%, dok je kod kontrolne grupe iznosila 31%, da bi 10. dana reepitelizacija kod manuka meda iznosila 85%, a kod kontrolne grupe 72%, što upućuje na zaključak da je reepitelizacija značajno brže nastupala kod grupe kod koje je korišćen manuka med u nosaču od alginata. Potvrda ovih istraživanja dokazana je i na patohistološkom nivou. Sedmog dana istraživanja epitel je već počeo da se razvija, dok kod kontrolne grupe uopšte nije postojao. Desetog dana istraživanja epitel kod manuka meda je bio 295 μm , dok je kod kontrolne grupe jedva i postojao – iznosio je oko 50 μm . Ovaj rezultat je potvrđen i pancitokeratinskim imunohistohemijskim bojenjem, što se podudara sa referentnim studijama [144-146]. Sedamnastog dana istraživanja epitel je već bio dobro formiran kod grupe sa manuka medom, dok je kod kontrolne grupe bio minimalno prisutan. Dvadesetog dana istraživanja, kada je uzeta i poslednja biopsija, epitel je bio sa malim epidermalnim prečagama, dok su kod kontrolne grupe one bile slične veličine kao epitel. Ogranizaciono granilaciono tkivo je bilo znatno veće debljine kod kontrolne grupe nego kod grupe kod koje je korišćen manuka med.

Kapur i saradnici [154] poredili su retrospektivnu studiju kod hroničnih rana kod kojih su koristili kao topikalno sredstvo manuka med i pokazali su da su imali značajno bržu reepitelizaciju nego kod ostalih topikalnih sredstava koje su upotrebljavali; što je potvrđeno i u našoj studiji, pogotovo u prvoj nedelji nakon aplikovanja manuka meda.

Japanski istraživači [155] su u eksperimentu na pacovima utvrđivali delovanje manuka meda na Džeksonovu zonu staze. Studija nije dokazala da manuka med može da utiče na dubinu opekotinske rane, ali je pokazala značajno bržu reepitelizaciju u odnosu na grupu pacova tretiranih sa srebro-sulfadiazinom. Ovako istraživanje u skladu je sa našim rezultatima.

Brojne studije govore u prilog pozitivnog delovanja manuka meda kod opekotinske rane. Pokazano je da je vreme reepitelizacije značajno skraćeno u odnosu na kontrolni preparat. Bahman i saradnici [91] su upoređivali efikasnost različitih kompresa kao nosača manuka meda kod pacova kojima su nanošene opekotinske povrede. Pokazali su da opekotine koje su tretirane manuka

medom u nosaču od Ca-alginata imaju značajno bržu reepitelizaciju. Druge studije takođe govore u prilog ubrzane reepitelizacije. [89,95,154].

Smanjena aktivnost makrofaga u grupi kod koje je korišćen manuka med u 10. danu, pa potom i u 17. danu istraživanja u odnosu na kontrolnu grupu potvrdili smo imunohistohemijskim bojenjem Iba1. Ovakav rezultat pozitivnog delovanja manuka meda na smanjivanje faze inflamacije prikazali su i drugi istraživači koji su procenjivali antiinflamatorno delovanje manuka meda [93-95,99,155]. Hatice i saradnici[156] su na novozelandskim zečevima nanosili opekotinske rane pune debljine kože i utvrdili da je kod grupe kod koje je korišćen manuka med, faza inflamacije završena 7-og postinterventnog dana, te da je nastupila proliferativna faza sa posledičnom angiogenezom, intezivnim stvaranjem granulacionog tkiva i reepitelizacijom.

Manja debljina organizacionog granulacionog tkiva kod grupe kod koje je korišćen manuka meda je prikazana *masson trihrom* bojenjem. Pored toga je korišćeno histohemijsko bojenje *Picrosirius red* koje je prikazalo da je i denzitet derma bio značajno veći u odnosu na kontrolni preparat. Iz ovoga proizilazi da manuka med ima pozitivan efektan na fibroblaste i formiranje novoformiranog derma, čije se karakteristike mogu porediti sa neoštećenim dermom. Ovaj rezultat je u skladu i sa istraživanjima drugih istraživača [102,106]. Ranzato sa saradnicima je *in vitro* kultivacijom keratinocita (*Scratch wound healing model*) pokazao da je aktivnost fibroblasta značajno izraženija nego kod kontrolnog preparata. [157]

Savremena literatura potvrđuje da je za ishod zarastanja značajna pravovremena inhibicija matriks metaloproteinaza. Matriks metaloproteinaze (MMP) su zink endopeptitaze koje mogu da degradiraju sve komponentne ekstracelularnog matriksa. Oni su prisutni u svim fazama zarastanja rana tako što uklanjaju oštećene proteine, kod privremeno stvorenog ekstracelularnog matriksa tokom inflamatorne faze. Inflamatorna faza kod zarastanja rana zavisi od modulacije produkcije hemokina i citokina, koji igraju ulogu u degradaciji matriksa i remodelingu [158,159].

Pozitivno dejstvo manuka meda na keratinocite je pokazano imunohistohemijskim bojenjem na pancitokeratin 10. i 17. dana istraživanja. Ubrzano formiranje epidermisa se tumači pozitivnim uticajem meda na stimulaciju epitelijalnog faktora rasta (EGF) koji omogućava epitelizaciju što je u skladu sa rezultatima drugih istraživanja kod kojih je med korišćen kao topikalno sredstvo.[86,87,106] Ranzato i sar. su *in vitro* kultivacijom keratinocita pokazali značajno bržu reepitelizaciju prilikom korišćenja manuka meda u poređenju sa kontrolnom grupom. [160]

Da med može da ubrzava debridman rane utvrdili smo kliničkom obsevacijom. Adherentna nekroza je mnogo brže demarkirana nego kod ostalih ispitivanih grupa. Kontinuirani topikalni tretman sa medom omogućava brže odvajanje devitalizovanih, nekrotičnih delova tkiva prema navodima iz literature koji su potvrđeni i u ovoj studiji. [105,106] Molan i sar. su kod tretmana venskog ulkusa upoređivali manuka med u alginatu i druge hidrogelove sa srebrom i pokazali da med omogućava snažniji debridman od hidrogelova u kojima nije korišćen med, i da može da bude alternativa hiruškom debridmanu.[105]

Budak i Çakıroğlu [161] takođe su koristili imunohistohemijsku analizu Ki67 radi praćenja brzine reepitelizacije kod otvorenih rana (nanešene punch biopterom) prilikom korišćenja manuka meda na miševima. Utvrđeno je da povećana deoba ćelija bila direktno srazmerna sa brzinom reepitelizacije rana. Kod kontrolne grupe u našoj studiji je značajno sporije napredovala što je u skladu je sa istraživanjem koje je sprovedeno na miševima.

Brojne studije [96-99] govore u prilog tome da med poseduje značajno antimikrobno delovanje kako na Gram-pozitivne tako i na Gram-negativne mikroorganizme, pa čak i na rezistentne sojeve. Lu [96] je sa saradnicima *in vitro* na krvnom agraru upoređivao delovanje manuka meda i pokazao antibakterijsko dejstvo na *Escherichiu coli*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosu*. Mada u našoj studiji nisu sprovedene mikrobiološke analize sa antibiogramom, niti patohistološki potvrđeno prisustvo biofilma, kliničkom observacijom nisu verifikovani znaci infekcije ni u jednoj ispitivanoj grupi. Pojedini autori su pokazali delovanje manuka meda na stvaranje biofilma [99-102]. Alandelajni [101] je sa saradnicima na *in vitro* modelu biofilma prikazao smanjeno formiranje biofilma prilikom aplikovanja preparata meda na *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosu*. Kod kontrolne grupe patohistološki je verifikovano na pojedinim preparatima formiranje biofilma.

Između ostalog, manuka med ima i protektivnu ulogu na ublažavanje oksidativnog stresa koja je potvrđena na modelima *in vivo* [162]. Sistemska peroralna primena meda na pacovima je omogućila redukciju oštećenja DNK, smanjivanje nivoa malondialdehida i aktivnosti glutacion peroksidaze u jetri. Ovi efekti kroz modulaciju antioksidansnih enzimskih aktivnosti kao što su katalaze i kroz visoki antioksidansni kapacitet pokrenuti su fenolskim komponentama. Rezultati sugerišu moguću upotrebu meda kao alternativni nutritivni suplement u poboljšanju fiziološkog oksidativnog statusa [163].

Manuka med ima pozitivno delovanje na opekotinsku ranu, tako što omogućava značajno bržu reepitelizaciju u odnosu na druga primenjena topikalna sredstva. Utiče pozitivno na smanjenje broja mikroorganizama, dovodi do bržeg obnavljanja epidermisa i remodelovanja fibroznog tkiva putem stimulacije fibroblasta.

5.3 Ekstradevičansko maslinovo ulje u lečenju opekotinske rane

Ekstradevičansko maslinovo ulje sadrži polifenolske komponentne. Prema literaturi, oni imaju dobru antimikrobnu aktivnost [71,72], antioksidativnu aktivnost [73], te mogu poput ibuprofena uticati na derivate arahidonske kiseline [73,75-79,81].

Trećeg dana istraživanja, nekroza derma kod grupe gde je korišćeno ekstradevičansko maslinovo ulje iznosila je 570 μm , dok je kod kontrolne grupe iznosila 662 μm . Procenat opekotina u grupi tretiranih sa ekstradevičanskim maslinovim uljem koji je zarastao unutar prvih 14 dana iznosio je 39%, između 14. i 21. dana iznosio je 44%, dok je kod opekotina koje su zarasle nakon 21 dana iznosio 16%. Kod kontrolne grupe je u prvih 14 dana iznosio 11%, između 14. i 21. dana 55%, dok je kod opekotina koje su zarasle nakon 21 dana iznosio 33%. Reepitelizacija u trećem danu istraživanja kod grupe gde je korišćeno maslinovo ulje iznosila je 4,94%, dok je kod kontrolne grupe iznosila samo 2,42%. Ovi rezultati govori u prilog tome da fenolske komponente u maslinovom ulju kao što su hidroksitirozol, oleocanthal i oleuropein mogu uticati na derivate arahidonske kiseline, te povoljno uticati na zonu staze po Džeksonu. Ovakvi rezultati se slažu sa literaturnim navodima [79] Lucas je sa sar. na molekularnom nivou objasnio da oleocanthal ima moć inhibicije COX1 i COX 2. [81]

Reepitelizacija rane je u grupi opekotina tretiranih maslinovim uljem bila naročito ubrzana u odnosu na kontrolnu grupu u 7. danu i 10. danu istraživanja. Sedmog dana istraživanja kod grupe sa maslinovim uljem iznosila je 16,94%, dok je kod kontrolne grupe bila 9,94%, da bi 10. dana istraživanja dostigla 49,72%, dok je kod kontrolne grupe iznosila 31,34%. Sve ovo navodi na zaključak da je reepitelizacija bila značajno brža kod grupe kod koje je korišćeno maslinovo ulje u odnosu na kontrolnu grupu. Ovaj rezultat se podudara sa drugih studijama gde je poređeno delovanje ekstradevičanskog maslinovog ulja sa drugim topikalnim sredstvima [71-73].

Zahmatkesh i saradnici [74] su kod miševa nanosili opekotine pune debljine kože i poredili delovanje maslinovog ulja u odnosu na običan fiziološki rastvor i srebrosulfadiazin. Kod grupe

kod koje je korišćeno maslinovo ulje došlo je do brže kontrakcije rane i potpunog zatvaranja deepitelizovane površine, što je potvrđeno i u našoj studiji.

Desetog i sedamnaestog dana istraživanja načinjeno je imunohistohemijsko bojenje na pancitokeratin. Kod grupe gde je korišćeno maslinovo ulje uočen je značajno bolje formiran epitel, dok je kod kontrolne grupe jedva bio prisutan ili nije uopšte postojao. Donato-Trancoso je sa saradnicima u studiji na miševima kod kojih su sa magnetnom pločom načinjene deepitelizovane površine koristio je ekstradevičansko maslinovo ulje kao topikalno sredstvo i prikazao brže formiranje epidermisa[72], slične rezultate imao je i Nasopoulou sa saradnicima. [71]

Desetog i sedamnaestog dana istraživanja Iba1 imunohistohemijsko bojenje pokazalo je značajnu aktivnost makrofaga kod kontrolne grupe, dok je ona bila značajno snižena kod grupe kod koje je korišćeno maslinovo ulje. Ovakav rezultat ide u prilog završene faze inflamacije i započinjanja proliferativne faze u grupi kod koje je kao topikalno sredstvo korišćeno ekstradevičansko maslinovo ulje.[74]

Desetog dana istraživanja imunohistohemijsko bojenje na Ki67 pokazalo je značajnu deobu ćelija u grupi kod koje je korišćeno maslinovo ulje u odnosu na kontrolnu grupu, da bi sedamnaestog dana istraživanja deoba ćelija bila značajno ispoljena kod kontrolne grupe, a slabije izražena kod grupe sa maslinovim uljem. Sve ovo govori u prilog tome da je proces proliferativne faze u grupi kod koje je korišćeno maslinovo ulje ranije započeo i bio brže priveden kraju.

Kvalitet dermisa prikazan je histohemijskim *Picrosirius* i masontrihrom bojenjem preparata. Rezultati su pokazali da je znatno bolji kvalitet novog dermisa (manje organizaciono granulaciono tkivo, deblji intaktni dermis, veći denzitet vlakana u dermisu, horizontalno postavljena fibroblasna vlakna) zabeležen u grupi sa maslinovim uljem 10. i 17. dana istraživanja u odnosu na kontrolnu grupu. Ovakav rezultat se podudara sa istraživačima koji smatraju da maslinovo ulje promoviše obnavljanje derma [72,73,82]Donato-Trancoso sa sar. [72] je na miševima muškog pola nanosio rane sa magnetnim pločama i ustanovio je da je kvalitet dermisa i brzina reepitelizacije bila značajno brža kod grupe miševa koji su tretirani sa maslinovim uljem u odnosu na grupu kod koje je korišćen fiziološki rastvor.

Mnogi istraživači upućuju na to da hidrositirozol ima bakteriostatski efekat na Gram-pozitivne i Gram-negativne organizme [72,73,75], a naročito izražen uticaj na *Staphylococcus aureus*.

U studiji kod hospitalizovanih pacijenata koji su imali opekotinske rane od 10 do 20% verifikovana je delotvornost maslinovog ulja na opekotinsku ranu putem peroralnog unošenja [164]. Kod pacijenata koji su u ishrani koristili maslinovo ulje je ostvarena brža reepitelizacija u odnosu na kontrolnu grupu pacijenata. Sa ovom studijom je pokazano i da sistemska primena maslinovog ulja takođe može imati povoljno dejstvo na zarastanje opekotinske povrede.

Maslinovo ulje utiče pozitivno na kiseonične radikale putem antioksidativnog delovanja i difuzije kiseonika čemu u prilog govore pojedine studije [73,80]. Schanuel i sar. su na dekubitima kod miševa koji su nanošeni magnetnim ploča pokazali da topikalna primena maslinovog ulja može dovesti do smanjenog broja neutrofila, smanjene ekspresije COX 2 i povećane aktivnosti azot oksid sintetaze 2, što govori u prilog smanjenja oksidativnog stresa[80]. Maslinovo ulje je pored fenolskih komponentni bogato i mononezasićenim masnim kiselinama. Upravo su mononezasićene masne kiseline razlog otpornosti na oksidativni stres [165].

Nedostatak grupe kod koje je korišćeno maslinovo ulje bio je u tome što je maslinovo ulje korišćeno na sterilnoj gazi, te je povremeno dolazilo do spadanja gaze sa mesta opekotinske rane, pa nije uvek bilo moguće ispuniti potpuni efekat delovanja maslinovog ulja. Ipak, i pored toga, grupa opekotina koje su tretirane sa maslinovim uljem je pokazala ubranu proliferativnu fazu zarastanja, bržu reepitelizaciju i bolju maturaciju ožiljka u odnosu na kontrolnu grupu

5.4 Postopekotinski ožiljak

Postopekotinski ožiljci se smatraju za najteži oblik ožiljaka u poređenju sa bilo kojim drugim vidom ožiljaka nastalim nakon traume. Oni ne samo da dovode do trajnog naruženja i unakaženosti, već mogu uticati i na fiziološke funkcije ukoliko zahvate prirodne otvore. Ožiljne bride na velikim zglobovima mogu dovesti do kontraktura koje se jako teško mogu korigovati konzervativnim putem, pa često zahtevaju i operativno lečenje.

Postoje brojne klasifikacije postopekotinskih ožiljaka. U ovoj studiji je korišćena Vankuverska skala ožiljka zbog njene lake primenljivosti i jednostavnosti.

Faza remodelinga započinje od zatvaranja opekotinske rane i može trajati sve do isteka dve godine od povređivanja, no ipak je najintenzivnija u prvih mesec dana. Evaluacija ožiljka je

u našoj studiji procenjivana u 60. danu eksperimenta, budući da je većina opekotinskih rana zarasla unutar mesec dana.

U studiji je bilo 72 opekotinske rane, postojale su tri eksperimentalne grupe i jedna kontrolna. Za svaku je procenjivan ožiljak makroskopskim putem korišćenjem Vankuverske skale, planimetrijskom procenom sažimanja ožiljka ili njegove kontrakcije i patohistološkom analizom.

U našoj studiji najbolji estetski izgled ožiljka po Vankuverskoj skali imala je grupa kod koje je korišćen manuka med, zatim redom grupa kod koje je korišćeno maslinovo ulje, Brufen, pa kontrolna grupa. Ovi rezultati nisu imali statističku značajnost.

Planimetrijskom procenom ožiljaka je utvrđeno da je najveće sažimanje uočeno kod kontrolne grupe, zatim redom kod grupe kod koje je korišćeno maslinovo ulje, Brufen, a najmanje u grupi kod koje je korišćen manuka meda. Ovi rezultati takođe nisu imali statističku značajnost.

Patohistološkom analizom je utvrđeno da je manuka med imala najbolje karakteristike ožiljka koji se ogledao u najtanjem epidermisu sa veoma malim epidermalnim prečkama, potom Brufen eksperimentalna grupa, zatim grupa sa maslinovim uljem, dok su najveće epidermalne prečage i najdeblji epiderm uočeni kod kontrolne grupe. Ovi rezultati su potvrđeni i imunohistohemijskim bojenjem na pancitokeratin.

Masontrihromnim bojenjem i histohemijskim bojenjem na *Picrosirius* je utvrđeno da je najveće organizaciono granulaciono tkivo imala kontrolna grupa, zatim redom grupa kod koje je korišćeno maslinovo ulje, Brufen, dok je grupa sa manuka medom imala najtanje organizaciono granulaciono tkivo i samim tim najbolje patohistološke karakteristike

Nastanak hipertrofičnih, pa i keloidnih ožiljaka se češće ispoljava kod inficiranih rana i kod kojih je potrebno više vremena da zarastu. U našoj studiji je najduže zarastanje ispoljeno u kontrolnoj grupi te su patohistološki parametri ove grupe ožiljaka bili ubedljivo najgori.

Niessen i sar. su pokazali na pacijentima da razlog stvaranja hipertrofičnih ožiljaka leži u aktivaciji Langerhansovih ćelija i povećanoj sekreciji IL-4. [166,167] Med je u našoj studiji imao najbolje kozmetske rezultate, što se može tumačiti njegovim uticajem na smanjenje oksidativnog stresa i inhibiciju lučenja IL-4 [162,163]

Iz studija koje su rađene na molekularnom nivou je pokazano da razlog nastanka hipertrofičnih ožiljaka leži u različitom fenotipu fibroblasta. Fibroblasti kod hipertrofičnog ožiljka konstantno sekretuju više TGF- β i kolagena u odnosu na fibroblaste koji se nalaze u normalnom ožiljku [168]. Ovakvi fibroblasti se karakterišu sa većom sekrecijom kolagena i smanjenom

ekspresijom kolagenaza, manjom proliferacijom i uvećanom ekspresijom α -glatko mišićnog aktina u poređenju sa površnim fibroblastima (fibroblasti papilarnog dela dermisa). Kultivisani fibroblasti iz hipertrofičnih ožiljaka pokazuju smanjeni odgovor na IL-6 u odnosu na fibroblaste normalne kože, što ukazuje na smanjenu aktivaciju receptora na IL-6 koja može biti razlog nastanka hipertrofičnog ožiljaka [169].

Zhu i saradnici [170] pokazali su da razlog stvaranja hipertrofičnih ožiljaka kod različitih tipova svinja upravo leži u ekspresiji kolagenskih gena koji utiču na modifikaciju signalnog puta TGF- β .

Kod dece sa opekotinskih ranama koje razviju hipertrofične ožiljke totalna količina TGF- β 1 u plazmi se smanjuje za oko 180 dana [171]. Povećana cirkulacija TGF- β 1 korelira sa povećanom cirkulacijom fibrocita. Ovakvo stanje vodi do pojave hipertrofičnih ožiljaka sa povećanom fibrozom, negativnom regulacijom decorina, pozitivnom regulacijom veriscana, povećanom neovaskularizacijom i smanjenim delovanjem kolagenaza [172]. Sve ovo može dovesti do pojave hipertrofičnih ožiljaka.

Pojava hipertrofičnih ožiljaka je multifaktorska. Svakako da postoji više koncepata koji su široko prihvaćeni i koji još treba eksperimentalno da se dokažu. Pojava hipertrofičnih ožiljaka je posledica poremećaja regulacije normalnih procesa zarastanja rane i ukoliko su oni usporeni, doći će do njihovog formiranja. Nemogućnost normalne sekrecije kolagena i stvaranja ekstracelularnog matriksa vidljiva je u hipertrofičnim ožiljcima. Uloga mastoidnih ćelija u smanjivanju fibroze i kontrakcije koja je dokazana u savremenim radovima [173] otvara nove mogućnosti za terapiju prekomernog ožiljavanja. Miofibroblasti koji igraju značajnu ulogu u kontrakciji rane su naglašeniji u nezrelim i aktivnim hipertrofičnim ožiljcima nego što je to slučaj u normalnim i maturisanim ožiljcima.

Fibrozni nodusi koji mogu nekontrolisano rasti, imaju povišenu ekspresiju veriscana. Formacija ovih nodusa predstavlja abnormalno epitelialnu-mezenhimalnu interakciju epidermalnih ćelija i Langerhansovih ćelija u povećanoj količini IL-4 sa smanjenom ekspresijom IL-1 α koja utiče na dermalni remodeling i rezultuje hipertrofičnim ožiljavanjem [174]. U našoj studiji nisu evidentirani ni u jednoj od ispitivanih grupa.

Svakako, dalja istraživanja u budućnosti će nam dati mnogo jasniju sliku o razlozima stvaranja hipertrofičnih ožiljaka i novih mogućnosti terapijskog uticanja na sprečavanje njihovog pojavljivanja.

5.5 FLIR u proceni dubine opekotinske rane

U naučnoj i stručnoj javnosti postoji konsenzus o lečenju površnih i dubokih dermalnih opekotinskih rana, međutim značajno je teže se odlučiti za način lečenja opekotina granične dubine (intermedijalne, mezodermalnih) koje sadrže elemente i jedne i druge opekotinske povrede. Otežavajuća je okolnost ukoliko opekotinske rane sadrže karakteristike sve tri opisane dubine, kada je izbor lečenja kompleksan. Ovakve opekotine povezane su sa velikim izazovom u izboru adekvatnog i optimalnog lečenja.

Precizno definisanje dubine određenih delova opekotinske rane kako u ranoj a tako i u kasnijoj fazi lečenja je veliki zadatak i želja svakog hirurga koji se bavi ovom vrstom traume.

Klinička evaluacija iskusnog oka hirurga i dalje ostaje jedan od najboljih parametara u donošenju odluke [175]. Ova metoda uključuje redovne kliničke procene, koje mogu zbog neodlučnosti odložiti procenu dubine opekotine. Dileme oko donošenja odluke o načinu i brzini lečenja može dovesti i do nesporazuma sa nosiocima roditeljskog prava kod dece sa opsežnim opekotinama, usled izostanka potpune dijagnoze u ranoj fazi lečenja. Evaluacija opekotine nekad zna biti teška čak i nekoliko dana nakon povređivanja, te može doći do greške [175].

U našoj studiji sve opekotinske rane smo evaluirali FLIR kamerom prvi postinterventni dan sa udaljenosti od oko 30 cm da se ne bi uticalo na rezultate topikalnog tretmana. Podeljene su na rane koje su zarastale u prvih 14 dana (površne dermalne), koje su zarastale između 14. i 21. dana (intermedijalne) i one koje su zarastale nakon 21. dana (duboke dermalne). Prosečna razlika u temperaturi između intaktne kože i površne dermalne opekotine iznosila je 0,78 stepeni, dok je kod opekotina koje su bile intermedijalne bila 1,6 stepeni, a kod onih koje su zarastale preko 21 dan razlika je iznosila 2,66 stepeni. Dobijeni rezultati su imali statističku značajnost. U ova merenja su uključene eksperimentalne grupe opekotina kod kojih je korišćena Brufen mast i ekstradevičansko maslinovo ulje, budući da su ovi preparati inicijalno uticali na dubinu opekotinske rane.

Ostvareni rezultati u našoj studiji bi mogli biti iskorišćeni u svakodnevnom kliničkom radu. Duboke opekotine na različitim lokacijama na koži koje su *Flir one* termografijom pokazivale razliku u temperaturi preko 2,66 stepena u odnosu na površnije opekotine bi se mogle

smatrati za opekotine koje treba hirurški lečiti. Ovakve opekotine bi zahtevale tangencijalnu nekrektomiju i pokrivanje defekata sa kožnim graftovima, što bi omogućilo brže zarastanje, oporavak pacijenta i smanjilo mogućnost za stvaranje hipertrofičnih ožiljaka i kontraktura. Ukoliko se zarastanje ostvari unutar prvih 15 dana, mogućnost stvaranja abnormalnih ožiljaka je minimalna. Ukoliko opekotine zarastaju nakon tri nedelje, mogućnost stvaranja hipertrofičnih ožiljaka je znatno veća. Slične rezultate imali su i drugi istraživači koji su koristili *Flir one* termografiju [10-12]

Prospektivna studija izvedena na 46 adultnih pacijenata od strane Goel-a i saradnika je pokazala da se sa pouzdanošću od 76% mogu utvrditi opekotine koje su zarasle unutar 21.og dana. [10]

Flir one termografija predstavlja neinvazivnu proceduru koja ne zahteva veća materijalna ulaganja. Primena ove infracrvene kamere ne utiče na protokol i ishod lečenja opekotinske rane. Može samo da donese medicinski i ekonomski benefit. Hirurzima koji imaju dilemu o načinu lečenja, pogotovo kod opekotina mešovite dubine *Flir one* termografija bi mogla potencijalno u potpunosti zameniti kliničku evaluaciju zbog brze interpretacije rezultata, lakog korišćenja, male cene i široko raspostranjene primenljivosti. [176].

Termalne kamere se koriste u plastičnoj hirurgiji ne samo kod opekotinske rane već i kod detekcije arterijskih i venskih perforatora prilikom hirurgije slobodnih reznjeva, replantacijonij i transplantacionij hirurgiji i za verifikaciju tromboze, vaskularnih malformacija i drugih vidova patološke vaskularizacije[177].

U našoj studiji korišćena je infracrvena kamera samo prvog postoperativnog dana. Trećeg postoperativnog dana nismo bili u mogućnosti da dobijemo validne rezultate, budući da je prebojenost tkiva bila pojačana u odnosu na zdravu kožu. Naše zapažanje se podudara sa drugim istraživačima koji su koristili infracrvenu kameru [178,179].

I pored zadovoljavajućih rezultata koji se mogu dobiti infracrvenom kamerom i kliničkom evaluacijom koja ima tačnost do 75%, zlatni standard i dalje predstavlja *punch* biopsija, gde se patohistološkom analizom dobijaju precizni rezultati dubine oštećenja tkiva bez mogućnosti subjektivne interpretacije [180,181].

Indocyanid green fluroscentna termografija, koja je po literaturnim podacima dosta zastupljena u kliničkoj praksi, ima svoju prednost u odnosu na FLIR termografiju zbog veće

preciznosti. [180] Ipak, za razliku od *Flir one* termografije ova metoda nije potpuno neinvazivna. Opisana je mogućnost pojavljivanja alergijskih reakcija.

S obzirom na rezultate dobijene ovim i sličnim istraživanjima bi se mogla doneti preporuka za uvođenje *FLIR One* termografije u svakodnevnu kliničku praksu koja bi se koristila zajedno sa kliničkom evaluacijom kao standardna metoda za procenu dubine opekotinskih povreda.[182,183].

Prema našoj studiji topikalno sredstvo koje je pokazalo najbolji rezultat je manuka med. Budući da manuka med nema uticaja na zonu staze, pravac daljeg istraživanja bi mogao da ide u pravcu kombinovanog korišćenja Brufena prva tri dana tokom istraživanja da bi se narednih dana nastavila primena manuka meda u vidu alginata. Izbor nosača aktivne čestice u sastavu pokrivke je takođe jedan od bitnih momenta pri izboru topikalnog modela za lečenje opekotinske rane. Naredne studije bi mogle da idu u pravcu pronalaženja složenog topikalnog sredstva koje bi imale većinu karakteristika idealnog sredstva i omogućile adekvatnu alternativu za lečenje opekotina granične dubine. Ipak kod opekotina pune debljine kože, hiruško lečenje i dalje predstavlja zlatni standard.

6.0 Zaključci

1. Upotreba inhibitora cikloksigenaza (Ibuprofen) statistički značajno je uticala na zonu staze i dovela do smanjivanja dubine dermalne opekotinske rane što je posledično doprinelo bržem zarastanju u odnosu na kontrolnu grupu gde je korišćen standardni preparat antibiotske masti.
2. Upotreba ekstradevičanskog maslinovog ulja statistički značajno je dovela do smanjenja dubine dermalne opekotinske rane zbog uticaja hidroksitirosoila na zonu staze, skraćanja proliferativne faze zarastanja i brže epitelizacije u odnosu na kontrolnu grupu gde je korišćen standardni preparat antibiotske masti.
3. Upotreba manuka meda u alginatu zbog snažnog antimikrobnog i antioksidativnog delovanja, kao i formiranja hidrogela stvorila je značajno bolje uslove za zarastanje opekotinskih rana u odnosu na kontrolnu grupu gde je korišćen standardni preparat antibiotske masti.
4. Formirani ožiljci kod opekotina u grupi tretiranih manuka medom su imali najbolje kozmetske i patohistološke karakteristike u vidu smanjenog organizacionog granulacionog tkiva i tanjeg epiderma, potom grupa sa Ibuprofenom, zatim sa ekstradevičanskim maslinovim uljem, a najgori rezultat je imala kontrolna grupa u kojoj je korišćena antibiotska mast.
5. Najbrže zarastanje (reepitelizacija) je ostvareno kod opekotina tretiranih sa manuka medom zbog višestrukog pozitivnog dejstva na okruženje opekotinske rane, potom grupa sa Ibuprofenom, zatim sa maslinovim uljem, a najsporije kod kontrolne grupe koja je tretirana sa antibiotskom masti.
6. *Forward looking infrared (FLIR) One* termografija koja sa velikom pouzdanošću verifikuje dubinu opekotinske rane može da se koristi kao standardna metoda u kliničkoj praksi.

7.0 Literatura:

1. Wolf ES, Cancio CL, Pruitt AB. Epidemiological, Demographic and Outcome Characteristics of Burn. In Herndon DN (ed). Total burn care. London:Elsevier; 2018 p. 14-9.
2. Jackson DM. The diagnosis of the depth of burning. *Br J Surg.* 1953;40(164):588-596.
3. Shupp JW, Nasabzadeh TJ, Rosenthal DS, et al. A review of the local pathophysiological bases of burn wound progression. *J Burn Care Res.* 2010;31(6):849-873.
4. Hettiaratchy S, Dziewulski P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. *BMJ.* 2004;328(7453):1427-1429.
5. Gatti JE, LaRossa D, Silverman DG, Hartford CE. Evaluation of the burn wound with perfusion fluorometry. *J Trauma.* 1983;23(3):202-206.
6. deCamara DL, Raine TJ, London MD, Robson MC, Hegggers JP. Progression of thermal injury: a morphologic study. *Plast Reconstr Surg.* 1982;69(3):491-499.
7. Egbrownson EG, Gibran NS. Evaluation of the Burn Wound: Management Decisions . In Herndon DN (ed). Total burn care. London:Elsevier; 2018 p. 88-9.
8. Nanney LB, Wenczak BA, Lynch JB. Progressive burn injury documented with vimentin immunostaining. *J Burn Care Rehabil.* 1996;17(3):191-8.
9. Riordan CL, McDonough M, Davidson JM, et al. Noncontact laser Doppler imaging in burn depth analysis of the extremities. *J Burn Care Rehabil.* 2003;24(4):177-86.
10. Goel J, Nizamoglu M, Tan A, Gerrish H, Cranmer K, El-Muttardi N, Barnes D, Dziewulski P. A prospective study comparing the FLIR ONE with laser Doppler imaging in the assessment of burn depth by a tertiary burns unit in the United Kingdom. *Scars Burn Heal.* 2020; 23(6):1-7
11. Xue EY, Chandler LK, Viviano SL, Keith JD. Use of FLIR ONE Smartphone Thermography in Burn Wound Assessment. *Ann Plast Surg.* 2018;80(4):236-8.
12. Ganon, S.; Guédon, A.; Cassier, S.; Atlan, M. (2019). Contribution of thermal imaging in determining the depth of pediatric acute burns. *Burns.* 2020;46(5):1091-9
13. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)* 2005;26:31-7.
14. Mayers I, Johnson D. The nonspecific inflammatory response to injury. *Can J Anaesth*1998;45:871-9
15. LaVan FB, Hunt TK. Oxygen and wound healing. *Clin Plast Surg* 1990;17:463-72.
16. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000;5:40-6.
17. attegay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med (Berl)* 1995;73:333-46.
18. Yataes RA, Nanney LB, Gates RE, et al. Epidermal growth factor and related growth factors. *Int J Dermatol* 1991;30:687– 94.
19. Hernigou P. Ambroise Paré’s life (1510–1590): part I. *Int Orthop.* 2013; 37(3):543-547.
20. Cambiaso-Daniel J, Gallagher J, Norbury BW et al: Treatment of Infection in Burn Patients In Herndon DN (ed). Total burn care. London:Elsevier; 2018 p. 93-102.
21. Sami AN, Mehmood N, Qureshi MA et al.: Honey compared with silver sulfadiazine as burn wound dressing. *Ann. Pak. Inst. Med.Sci.* 2011 ;7: 22-5.
22. Burmolle M, Thomsen TR, Fazli M, et al. Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010;59(3):324-36.
23. Bianchi T, Wolcott RD, Peghetti A, et al. Recommendations for the management of biofilm: a consensus document. *J Wound Care.* 2016;25(6):305-17.
24. Barret JP, Herndon DN. Effects of burn wound excision on bacterial colonization and invasion. *Plast Reconstr Surg.* 2003;111(2):744-50, discussion 751-2.
25. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ ATIS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1250-6.

26. Cotter JL, Fader RC, Lilley C, Herndon DN. Chemical parameters, antimicrobial activities, and tissue toxicity of 0.1 and 0.5% sodium hypochlorite solutions. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28(1):118-22.
27. Gelmetti C. Local antibiotics in dermatology. *Dermatol Ther.* 2008;21(3):187-95.
28. Nagoba BS, Selkar SP, Wadher BJ, Gandhi RC. Acetic acid treatment of pseudomonal wound infections—a review. *J Infect Public Health.* 2013;6(6):410-5.
29. Duc Q, Breetveld M, Middelkoop E, et al. A cytotoxic analysis of anti-septic medication on skin substitutes and autograft. *Br J Dermatol.* 2007;157(1):33-40.
30. Tepedelen BE, Soya E, Korkmaz M. Boric Acid Reduces the Formation of DNA Double Strand Breaks and Accelerates Wound Healing Process. *Biological trace element research.* 2016;174(2):309–18
31. Duran N, Duran M, de Jesus MB, et al. Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine (Lond).* 2016;12(3):789-99
32. Aziz Z, Abu SF, Chong NJ. A systematic review of silver-containing dressings and topical silver agents (used with dressings) for burn wounds. *Burns.* 2012;38(3):307-318.
33. Barret JP, Dziewulski P, Ramzy PI, et al.: Biobrane versus 1% silver sulfadiazine in second degree pediatric burns. *Plast Reconstr Surg.* 2000 :105(1):62-5.
34. Greenhalgh DG. Topical antimicrobial agents for burn wounds. *Clin Plast Surg.* 2009;36(4):597-606.
35. Atwal A, Cousin GC. Bismuth toxicity in patients treated with bismuth iodoform paraffin packs. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2016;54(1): 111-112.
36. Ovaska H, Wood DM, House I, et al. Severe iatrogenic bismuth poisoning with bismuth iodoform paraffin paste treated with DMPS chelation. *Clin Toxicol (Phila).* 2008;46(9):855-857.
37. Mendelson JA. Topical mafenide hydrochloride aqueous spray in initial management of massive contaminated wounds with devitalized tissue. *Prehosp Disaster Med.* 2001;16(3):172-174.
38. Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol.* 2014;68(1):1-12.
39. Choi YM, et al.: Antibiotic ointment versus a silver based dressing for children with extremity burns: A randomized controlled study. *J Pediatr Surg.* 2019 Jul;54(7):1391-1396.
40. Toussaint et al.: Topical antibiotic ointment versus silver-containing foam dressing for second-degree burns in swine. *Acad Emerg Med.* 2015 Aug;22(8):927-33
41. Cartotto R: Topical antimicrobial agents for pediatric burns. *Burn and Trauma, Volume 5.* 2017.
42. Barret JP, Ramzy PI, Hegggers JP, et al. Topical nystatin powder in severe burns: a new treatment for angioinvasive fungal infections refractory to other topical and systemic agents. *Burns.* 1999;25(6):505-508.
43. Dennis, E.A. Phospholipase A2 in eicosanoid generation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000;161:32–5.
44. Shimizu, T. Lipid mediators in health and disease: Enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2009;49:123–50
45. Esser-von Bieren, J. Immune-regulation and -functions of eicosanoid lipid mediators. *Biol. Chem.* 2017, 398, 1177–119
46. López, D.E.; Ballaz, S.J. The Role of Brain Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Beyond Neuroinflammation: Neuronal Homeostasis in Memory and Anxiety. *Mol. Neurobiol.* 2020, 57, 5167–5176
47. Mitchell, J.A.; Kirkby, N.S. Eicosanoids, prostacyclin and cyclooxygenase in the cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.* 2019, 176, 1038–105
48. Dennis, E.A.; Norris, P.C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2015;15:511–23.
49. Thomas, D.W.; Mannon, R.B.; Mannon, P.J.; Latour, A.; Oliver, J.A.; Hoffman, M.; Smithies, O.; Koller, B.H.; Coffman, T.M. Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A2. *J. Clin. Investig.* 1998;102:1994–2001.

50. Lau, C.S.; Khan, F.; McLaren, M.; Bancroft, A.; Walker, M.; Belch, J.J.F. The effects of thromboxane receptor blockade on platelet aggregation and digital skin blood flow in patients with secondary Raynaud's syndrome. *Rheumatol. Int.* 1991, *11*, 163–168.
51. Leslie, M. Beyond Clotting: The Powers of Platelets. *Science* 2010, *328*, 562–564.
52. Mekaj, Y.H. The roles of platelets in inflammation, immunity, wound healing and malignancy. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2016, *9*, 5347–5358
53. Yasukawa K, Okuno T, Yokomizo T.; Eicosanoids in Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2020 ;10;21(22):8435
54. Wurzer P, Culnan D, Cancio LC, Kramer GC.: Pathophysiology of Burn Shock and Burn Edema. In Herndon DN (ed). *Total burn care.* London:Elsevier; 2018 p. 67-71.
55. Huang YS, Li A, Yang ZC: Roles of thromboxane and its inhibitor anisodamine in burn shock. *Burns.* 1990 *16*(4): 249-53.
56. Hegggers JP, Loy GL, Robson MC, et al.: Histological demonstration of prostaglandins and thromboxanes in burn tissue. *J Surg Res.* 1980 ;28(2):110-117.
57. Hegggers JP, Robson MC, Zachary LS: Thromboxane inhibitors for prevention of progressive dermal ischemia due to thermal injury. *J Burn Care Rehabil.* 1985 ;6(6):466-68.
58. LaLonde C, Knox J, Daryani R, et al.: Topical flurbiprofen decreases burn wound-induced hypermetabolism and systemic lipid peroxidation. *Surgery.* 1991 ;109(5): 645-51.
59. Daniel, T.O.; Liu, H.; Morrow, J.D.; Crews, B.C.; Marnett, L.J. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res.* 1999, *59*, 4574–4577
60. Nie, D.; Lamberti, M.; Zacharek, A.; Li, L.; Szekeres, K.; Tang, K.; Chen, Y.; Honn, K.V. Thromboxane A2 Regulation of Endothelial Cell Migration, Angiogenesis, and Tumor Metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, *267*, 245–251
61. Tanioka, T.; Nakatani, Y.; Semmyo, N.; Murakami, M.; Kudo, I. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 2000, *275*, 32775–32782
62. Sakai, Y.; Fujita, K.; Sakai, H.; Mizuno, K. Prostaglandin E2 regulates the expression of basic fibroblast growth factor messenger RNA in normal human fibroblasts. *Kobe J. Med. Sci.* 2001, *47*, 35–45
63. Fairweather, M.; Heit, Y.I.; Buie, J.; Rosenberg, L.M.; Briggs, A.; Orgill, D.P.; Bertagnolli, M.M. Celecoxib inhibits early cutaneous wound healing. *J. Surg. Res.* 2015, *194*, 717–724
64. Ganesh, K.; Das, A.; Dickerson, R.; Khanna, S.; Parinandi, N.L.; Gordillo, G.M.; Sen, C.K.; Roy, S. Prostaglandin E(2) induces oncostatin M expression in human chronic wound macrophages through Axl receptor tyrosine kinase pathway. *J. Immunol.* 2012, *189*, 2563–2573.
65. Wang, P.H.; Huang, B.S.; Horng, H.C.; Yeh, C.C.; Chen, Y.J. Wound healing. *J. Chin. Med. Assoc.* 2018, *81*, 94–101.
66. Jackson, W.F.; König, A.; Dambacher, T.; Busse, R. Prostacyclin-induced vasodilation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Am. J. Physiol.* 1993, *264*, 238–43
67. Hatane, T.; Yoshida, E.; Kawano, J.; Sugiki, M.; Onitsuka, T.; Maruyama, M. Prostaglandin I2 analog enhances the expression of urokinase-type plasminogen activator and wound healing in cultured human fibroblast. *Biochim. Biophys. Acta* 1998, *1403*, 189–198.
68. He, T.; Lu, T.; d'Uscio, L.V.; Lam, C.F.; Lee, H.C.; Katusic, Z.S. Angiogenic function of prostacyclin biosynthesis in human endothelial progenitor cells. *Circ. Res.* 2008, *103*, 80–88
69. Brogliato, A.R.; Moor, A.N.; Kessler, S.L.; Guilherme, R.F.; Georgii, J.L.; Peters-Golden, M.; Canetti, C.; Gould, L.J.; Benjamim, C.F. Critical role of 5-lipoxygenase and heme oxygenase-1 in wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 2014, *134*, 1436–1445.
70. uimaraes, F.R.; Sales-Campos, H.; Nardini, V.; da Costa, T.A.; Fonseca, M.T.C.; Junior, V.R.; Sorgi, C.A.; da Silva, J.S.; Chica, J.E.L.; Faccioli, L.H.; et al. The inhibition of 5-Lipoxygenase (5-LO) products leukotriene B4 (LTB4) and cysteinyl leukotrienes (cysLTs) modulates the inflammatory response and improves cutaneous wound healing. *Clin. Immunol.* 2018, *190*, 74–83.

71. Nasopoulou C., Karantonis H.C., Detopoulou M., Demopoulos C.A., Zabetakis I. Exploiting the anti-inflammatory properties of olive (*Olea europaea*) in the sustainable production of functional food and nutraceuticals. *Phytochem. Rev.* 2014;13:445–458
72. Donato-Trancoso A., Monte-Alto-Costa A., Romana-Souza B. Olive oil-induced reduction of oxidative damage and inflammation promotes wound healing of pressure ulcers in mice. *J. Dermatol. Sci.* 2016;83:60
73. Lin T K, Zhong L, Santiago J L Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(1): 70
74. Zahmatkesh M., Manesh M.J., Babashahabi R. Effect of Olea ointment and Acetate Mafenide on burn wounds—A randomized clinical trial. *Iran. J. Nurs. Midwifery Res.* 2015;20:599–603.
75. Nazzaro F, Fratianni F, Cozzolino R, Martignetti A et al.: Antibacterial Activity of three extra virgin olive oils of the Campania Regions, Southern Italy, Related to their Polyphenol Content and Composition. *Microorganisms* 2019 ;7(9):321.
76. Beuchamp GK, RSJ K, Morel D, Lin J Pika J, Han Q, Lee CH, Smit AB, Breslin PA.: Phytochemistry: Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature.* 2005 ;437:45-6.
77. Gonzales-Correa JA et al.: Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid: *G J Nutr.* 2009 ;101(8) 1157-64.
78. Petroni A et al.: Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res.* 1995 ;15:78(2):151-60.
79. Beuchamp GK, RSJ K, Morel D, Lin J Pika J, Han Q, Lee CH, Smit AB, Breslin PA.: Phytochemistry: Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature.* 2005 ;437:45-6.
80. Schnauel F A et al.: Olive oil promotes wound healing of mice pressure injuries through NOS-2 and Nrf2. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2019 Nov;44(11):1199-1208.
81. Lucas L., Russell A., Keast R. Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Curr. Pharm. Des.* 2011;17:754–768.
82. Abe R., Beckett J., Nixon A., Rochier A., Yamashita N., Sumpio B. Olive oil polyphenol oleuropein inhibits smooth muscle cell proliferation. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2011;41:814–820
83. Sami AN, Mehmood N, Qureshi MA et al.: Honey compared with silver sulfadiazine as burn wound dressing. *Ann. Pak. Inst. Med.Sci.*, 7: 22-5, 2011.
84. Kramer A, Daeschlein G, Kammerlander G et al.: Consensus recommendation for the choice of antiseptic agent in wound care (Konsensusempfehlung zur Auswahl von Wirkstoffen für die Wundantiseptik). *Hyg Med*, 5: 147-57, 2004.
85. Sami AN, Mehmood N, Qureshi MA et al.: Honey compared with silver sulfadiazine as burn wound dressing. *Ann. Pak. Inst. Med.Sci.*, 7: 22-5, 2011.
86. Green AE: Wound healing properties of honey. *Br J Surg*, 75:1278, 1988.
87. Bang L, Bunting C, Molan P, et al. The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. *J Altern Complement Med.* 2003;9:267–73
88. Molan PC, et al. A brief review of honey as a clinical dressing. *Primary Intention.* 1998;6:148–58.
89. Molan PC. Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *Am J Clin Dermatol.* 2001;1:13–9.
90. Deng J., Liu R., Lu Q., Hao P., Xu A., Zhang J., Tan J. Biochemical properties, antibacterial and cellular antioxidant activities of buckwheat honey in comparison to manuka honey. *Food Chem.* 2018;252:243–249.
91. Mirzaei B., Etemadian S., Goli H., Bahonar S., Gholami S., Karami P., Farhadi M., Tavakoli R. Construction and analysis of alginate-based honey hydrogel as an ointment to heal of rat burn wound related infections. *Int. J. Burn Trauma.* 2018;8:88–97.

92. Neres Santos AM, Duarte Moreira AP, Piler Carvalho CW, et al. Physically cross-linked gels of PVA with natural polymers as matrices for Manuka honey release in wound-care applications. *Materials (Basel)* 2019;12(4):E559.
93. Tonks A, Cooper RA, Price AJ et al.: Stimulation of TNF-alpha release in monocytes by honey. *Cytokine*, 14: 240-2, 2001.
94. Tonks AJ, Cooper RA, Jones KP et al.: Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine*, 21:242 -7, 2003.
95. Zbuche A, Up-to-dat use of honey for burns treatment. *Ann Burns Fire Disasters*. 2014 Mar 31;27(1):22-30
96. Lu J, Carter DA, Turnbull L, et al. The Effect of New Zealand Kanuka, Manuka and Clover Honeys on Bacterial Growth Dynamics and Cellular Morphology Varies According to the Species. *PLoS ONE*. 2013;8:55898.
97. Molan PC. Honey as a topical antibacterial agent for treatment of infected wounds. *World Wide Wounds*. 2001 ISSN 1369-2607.
98. George NM, Cutting KF. Antibacterial honey (Medihoney™): Invitro activity against clinical isolates of MRSA, VRE, and other multiresistant gram-negative organisms including *Pseudomonas aeruginosa*. *Wounds*. 2007;19:231–6.
99. Molan PC. The evidence and the rationale for the use of honey as a wound dressing. *Wound Practice and Research*. 2011;19:204–20
100. Cooper RA, Jenkins L, Henriques AFM, et al. Absence of bacterial resistance to medical-grade manuka honey. *Eur J Microbiol Infect Dis*. 2010;29:1237–41
101. Alandejani T, Marsan J, Ferris W, et al. Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;141:114–8.
102. Maddocks SE, Lopez MS, Rowlands RS, et al. Manuka honey inhibits the development of *Streptococcus pyogenes* biofilms and causes reduced expression of two fibronectin binding proteins. *Microbiology*. 2012;158:781–90.
103. Hill KE, Malic S, McKee R. An in vitro model of chronic wound biofilms to test wound dressings and assess antimicrobial susceptibilities. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:1195–206
104. Ndayisaba G, Bazira L, Habonimana E et al.: Clinical and bacteriological results in wounds treated with honey. *J Orthop Surg*, 7:202-4, 1993.
105. Molan PC: Debridement of wounds with honey. *Journal of Wound Technology*, 5: 12-7, 2009.
106. Gethin G, Cowman S: Manuka honey vs hydrogel – a prospective, open label, multicentre, randomised controlled trial to compare de-sloughing efficacy and healing outcomes in venous ulcers. *J Clin Nurs*, 18: 466–74, 2009.
107. Rejzek A, Weyer F, Eichberger R, Gebhart W. Physical changes of amniotic membranes through glycerolization for the use as an epi-dermal substitute. Light and electron microscopic studies. *Cell Tissue Bank*. 2001;2(2):95-102.
108. Kesting MR, Wolff KD, Hohlweg-Majert B, Steintraesser L. The role of allogenic amniotic membrane in burn treatment. *J Burn Care Res*. 2008;29(6):907-916.
109. Maral T, Borman H, Arslan H, et al. Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. *Burns*. 1999;25(7):625-635.
110. Bukovcan P, Koller J. Treatment of partial-thickness scalds by skin xenografts—a retrospective study of 109 cases in a three-year period. *Acta Chir Plast*. 2010;52(1):7-12.
111. Burkey B, Davis W 3rd, Glat PM. Porcine xenograft treatment of superficial partial-thickness burns in paediatric patients. *J Wound Care*. 2016;25(2):S10-S15.
112. Salisbury RE, et al. Biological dressings for skin graft donor sites. *Arch Surg*. 1973;106(5):705-706.
113. Vloemans AF, et al. Optimal treatment of partial thickness burns in children: a systematic review. *Burns*. 2014;40(2):177-190.

114. Lou RB, Hickerson WL. The use of skin substitutes in hand burns. *Hand Clin.* 2009;25(4):497-509.
115. Lazic T, Falanga V. Bioengineered skin constructs and their use in wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127(suppl 1):75S-90S.
116. Tang H, et al. An open, parallel, randomized, comparative, multi-center investigation evaluating the efficacy and tolerability of Mepilex Ag versus silver sulfadiazine in the treatment of deep partial-thickness burn injuries. *J Trauma Acute Care Surg.* 2015;78(5):1000-1007.
117. Gee Kee EL, et al. Randomized controlled trial of three burns dressings for partial thickness burns in children. *Burns.* 2015;41(5):946-955
118. Vanstraelen P. Comparison of calcium sodium alginate (KALTOSTAT) and porcine xenograft (E-Z DERM) in the healing of split-thickness skin graft donor sites. *Burns.* 1992;18(2):145-148.
119. Blome-Eberwein S, et al. Hydrofiber dressing with silver for the management of split-thickness donor sites: a randomized evaluation of two protocols of care. *Burns.* 2010;36(5):665-672.
120. Brenner M, et al. Management of pediatric skin-graft donor sites: a randomized controlled trial of three wound care products. *J Burn Care Res.* 2015;36(1):159-166.
121. Betz, P., Nerlich, A., Wilske, J., Töbel, J., Penning, R., & Eisenmengen, W. *The time-dependent localization of Ki 67 antigen-positive cells in human skin wounds. International Journal of Legal Medicine* 1993;106(1):35-40.
122. Prabhu, V., Rao, B.S.S., Rao, A.C.K. *et al.* Photobiomodulation invigorating collagen deposition, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 expression during dermal wound repair in mice. *Lasers Med Sci* 2022;37:171-80
123. Patel, Girish K; Wilson, Catherine H; Harding, Keith G; Finlay, Andrew Y; Bowden, Paul E .*Numerous Keratinocyte Subtypes Involved in Wound Re-Epithelialization. Journal of Investigative Dermatology.* 2006;126(2):497-502.
124. Hassanshahi, A.; Moradzad, M.; Ghalamkari, S.; Fadaei, M.; Cowin, A.J.; Hassanshahi, M. Macrophage-Mediated Inflammation in Skin Wound Healing. *Cells.* 2022;11:2953.
125. Oka T, Ohta K, Kanazawa T, Nakamura K I. Interaction between Macrophages and Fibroblasts during Wound Healing of Burn Injuries in Rats. *Kurume Medical Journal.* 2015; 62:59-66
126. Eming SA, Krieg T, Davidson JM, Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanism. *Journal of Investigative Dermatology.* 2007;127(3):514-25
127. Li S, Hu M, Lorenz HP. Treatment of Full-Thickness Skin Wounds with Blood-Derived CD34⁺ Precursor Cells Enhances Healing with Hair Follicle Regeneration. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2020;9(5):264-276
128. Zhu B, Nahmias Y, Yarmush ML, Murthy SK. Microfluidic isolation of CD34-positive skin cells enables regeneration of hair and sebaceous glands in vivo. *Stem Cells Transl Med* 2014;3:1354-1362
129. Sivan-Loukianova E, Awad OA, Stepanovic V, Bickenbach J, Schatteman GC. CD34⁺ blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds. *J Vasc Res* 2003;40:368-377
130. Konop M, Rybka M, Drapała A. Keratin Biomaterials in Skin Wound Healing, an Old Player in Modern Medicine: A Mini Review. *Pharmaceutics.* 2021;13(12):2029
131. Watanabe S, Osumi M, Ohnishi T, Ichikawa E, Takahashi H. Changes in cytokeratin expression in epidermal keratinocytes during wound healing. *Histochem Cell Biol.* 1995 Jun;103(6):425-33.
132. Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen* 2001;9:66-76.
133. Meyer W, Schwarz R, Neurand K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. *Curr Probl Dermatol* 1978;7:39-52.

134. A Wardhana A, Lumbuun R F M Kurniasari D. How to create burn porcine models: a systematic review. *Ann Burns Fire Disaster*. 2018 Mar 31;31(1):65-72.
135. Branski LK, Rainer M, Jeschke MG. A porcine model of full thickness burn, excision and skin autografting. *Burns*. 2008 Dec;34(8): 1119-1127
136. Zhu KQ, Engrav LH, Gibran NS, Cole JK, Matsumura H, Piepkorn M et al. The female, red Duroc pig as an animal model of hypertrophic scarring and the potential role of the cones of skin. *Burns* 2003;29: 649
137. Cuttle L, Kempf M, Phillips G, Mill J et al. A porcine deep dermal partial thickness burn model with hypertrophic scarring. *Burns* 2006;32:806–20
138. Papp A, Kiraly K, Harma M, Lahtinen T, Uusaro A, Alhava E. The progression of burn depth in experimental burns: a histological and methodological study. *Burns* 2004;30:684–90
139. Katz A, Ryan P, Lalonde C, West K, Demling R. Topical ibuprofen decreases thromboxane release from the endotoxin-stimulated burn wound. *J Trauma*. 1986;26(2):157-62.
140. Huang LG, Song J, , Corona KK, BS, Wermine K et al., 735 Early Treatment with NSAIDs Improves Blood Clotting Function in Severely Burned Patients. *Journal of Burn Care & Research* 2022;42(1):173-4
141. Lichtenberger LM, Ono, K, Phan T, Fang D, Poindexter BJ, Bick RJ. and Dial EJ. Use of PC-NSAIDs to treat 2nd degree burn injury in rodent models. *The FASEB Journal*,2017;31:812
142. Shah JM, Omar E, Pai DR, Sood S. Cellular events and biomarkers of wound healing. *Indian J Plast Surg*. 2012 May;45(2):220-8.
143. Sim SL, Kumari S, Kaur S, Khosrotehrani K. Macrophages in Skin Wounds: Functions and Therapeutic Potential. *Biomolecules* 2022;12:1659.
144. Konop M, Rybka M, Drapała A. Keratin Biomaterials in Skin Wound Healing, an Old Player in Modern Medicine: A Mini Review. *Pharmaceutics*. 2021;13(12):2029
145. Woodley D.T. Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis: Implications for Wound Healing. *Dermatol. Clin*. 2017;35:95–100.
146. Roy D.C., Tomblin S., Isaac K.M., Kowalczewski C.J., Burmeister D.M., Burnett L.R., Christy R.J. Ciprofloxacin-loaded keratin hydrogels reduce infection and support healing in a porcine partial-thickness thermal burn. *Wound Repair Regen*. 2016;24:657–66
147. Patel A, Bell M, O’Connor C, Inchley A, Wibawa J, Lane ME. Delivery of ibuprofen to the skin. *Int J Pharm*. 2013;457(1):9-13
148. Fogh K, Andersen MB, Bischoff-Mikkelsen M, et al. Clinically relevant pain relief with an ibuprofen-releasing foam dressing: results from a randomized, controlled, double-blind clinical trial in exuding, painful venous leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2012;20(6):815-821
149. Lee JH, Choi BG, Lee JH, Kim JW. Pain Relief Efficacy of Ibuprofen Releasing Foam Dressing (Biatain Ibu®) on Outpatient Patient with Partial Thickness Burn Wound. *J Korean Burn Soc*. 2019;22:15-19.
150. Ambler, Jonathan J.S. et al. The effect of topical non-steroidal anti-inflammatory cream on the incidence and severity of cutaneous burns following external DC cardioversion. *Resuscitation* 2005; 65(2):173-8
151. Katz A, Ryan P, Lalonde C, West K, Demling R. Topical ibuprofen decreases thromboxane release from the endotoxin-stimulated burn wound. *J Trauma*. 1986 Feb;26(2):157-62.
152. Lee JH, Choi BG, Lee JH, Kim JW. Pain Relief Efficacy of Ibuprofen Releasing Foam Dressing (Biatain Ibu®) on Outpatient Patient with Partial Thickness Burn Wound. *J Korean Burn Soc*. 2019;22:15-19
153. Steffansen B, Herping SPK. Novel wound models for characterizing ibuprofen release from foam dressings. *Int J Pharm*. 2008;364(1):150-5.
154. Kapoor N, Yadav R. Manuka honey: A promising wound dressing material for the chronic nonhealing discharging wounds: A retrospective study. *Natl J Maxillofac Surg*. 2021;12(2):233-7.

155. Nakajima Y, Mukai K, Nasruddin, Komatsu E et al. *Evaluation of the Effects of Honey on Acute-Phase Deep Burn Wounds. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013;1–20.*
156. Nisbet OH, Nisbet C, Yarim M, Guler A, Ozak A . Effects of three types of honey on cutaneous wound healing. *Wounds. 2010;22(11):275–83.*
157. Ranzato E, Martinotti S, Burlando B. Honey exposure stimulates wound repair of human dermal fibroblasts. *Burns Trauma. 2013;1(1):32-8*
158. Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol. 2008;40:1334–47*
159. Majtan J, Kumar P, Majtan T, Walls AF, Klaudiny J. Effect of honey and its major royal jelly protein 1 on cytokine and MMP-9 mRNA transcripts in human keratinocytes. *Exp Dermatol. 2010;19:e73–9.*
160. Ranzato E, Martinotti S, Burlando B. Epithelial mesenchymal transition traits in honey-driven keratinocyte wound healing: Comparison among different honeys. *Wound Repair Regen. 2012;20:778.*
161. Budak Ö, Çakıroğlu H. Examination the effects of chestnut and Manuka Honey for wound healing on mice experimental model. *Medical Science and Discovery 2022;9(3):170–4.*
162. Jubri Z., Rahim N.B., Aan G.J. Manuka honey protects middle-aged rats from oxidative damage. *Clinics. 2013;68:1446–54.*
163. Alvarez-Suarez JM, Gasparrini M, Forbes-Hernández TY, Mazzoni L, Giampieri F. The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods. 2014;3(3):420-32*
164. Najmi M, Vahdat Shariatpanahi Z, Tolouei M, Amiri Z. Effect of oral olive oil on healing of 10-20% total body surface area burn wounds in hospitalized patients. *Burns. 2015;41(3):493-6.*
165. Rahman I, Qureshi MN, Ahmad S. Comparative study of fatty acid components in oils of different olive varieties grown in different regions of Pakistan by gas chromatography mass spectrometry. *J Chinese Chem Soc 2012;59:46-50.*
166. Burd A, Huang L. Hypertrophic response and keloid diathesis: two very different forms of scar. *Plast Reconstr Surg. 2005;116(7): 150e-7e.*
167. Niessen FB, Schalkwijk J, Vos H, et al. Hypertrophic scar formation is associated with an increased number of epidermal Langerhans cells. *J Pathol. 2004;202(1):121-9.*
168. Xue H, McCauley RL, Zhang W, et al. Altered interleukin-6 expression in fibroblasts from hypertrophic burn scars. *J Burn Care Rehabil. 2000;21(2):142-6.*
169. Dasu MR, Hawkins HK, Barrow RE, et al. Gene expression profiles from hypertrophic scar fibroblasts before and after IL-6 stimulation. *J Pathol. 2004;202(4):476-85.*
170. Zhu KQ, Carrougher GJ, Couture OP, et al. Expression of collagen genes in the cones of skin in the Duroc/Yorkshire porcine model of fibroproliferative scarring. *J Burn Care Res. 2008;29(5):815-27.*
171. Rorison P, Thomlinson A, Hassan Z, et al. Longitudinal changes in plasma transforming growth factor beta-1 and post-burn scarring in children. *Burns. 2010;36(1):89-96.*
172. Hakkinen L, Koivisto L, Gardner H, et al. Increased expression of beta6-integrin in skin leads to spontaneous development of chronic wounds. *Am J Pathol. 2004;164(1):229-42.*
173. Andriessen MP, Niessen FB, Van de Kerkhof PC, et al. Hypertrophic scarring is associated with epidermal abnormalities: an immunohistochemical study. *J Pathol. 1998;186(2):192-200.*
174. Boccara D, Chaouat M. Uzan C, Lachere A, Mimoun M. Retrospective analysis of photographic evaluation of burn depth. *Burns 2011;37(1):69-73.*
175. Carrière, M.E.; Haas, L.E.M.; Pijpe, A.; Meij-de Vries, A.; Gardien, K.L.M.; Zuijlen, P.P.M.; Jaspers, M.E.H. Validity of thermography for measuring burn wound healing potential. *Wound Repair Regen. 2020;28: 347–54.*
176. Saxena, A.K., Willital, G.H. Infrared thermography: Experience from a decade of pediatric imaging. *Eur J Pediatr 2008:757–64.*

177. Cole, R.P.; Shakespeare, P.G.; Chissell, H.G.; Jones, S.G. Thermographic assessment of burns using a nonpermeable membrane as wound covering. *Burns* 1991;17:117–22
178. Wearn, C.; Lee, K.C.; Hardwicke, J.; Allouni, A.; Bamford, A.; Nightingale, P.; Moiemien, N. Prospective comparative evaluation study of Laser Doppler Imaging and thermal imaging in the assessment of burn depth. *Burns* 2018;44:124–33.
179. Ye, H.; De, S. Thermal injury of skin and subcutaneous tissues: A review of experimental approaches and numerical models. *Burns* 2017;43:909–32.
180. McUmber, H.; Dabek, R.J.; Bojovic, B.; Driscoll, D.N. Burn Depth Analysis Using Indocyanine Green Fluorescence: A Review. *J. Burn Care Res.* 2019;40:513–6.
181. Jaspers, M.E.H.; Carrière, M.E.; Meij-de Vries, A.; Klaessens, J.H.G.M.; van Zuijlen, P.P.M. The FLIR ONE thermal imager for the assessment of burn wounds: Reliability and validity study. *Burns* 2017;43: 1516–23.
182. Langemo, D.K.; Spahn, J.G. A reliability study using a long-wave infrared thermography device to identify relative tissue temperature variations of the body surface and underlying tissue. *Adv. Skin Wound Care* 2017;30:109–19.

Прилог:



Република Србија
МИНИСТАРСТВО ПОЉОПРИВРЕДЕ,
ШУМАРСТВА И ВОДОПРИВРЕДЕ
-УПРАВА ЗА ВЕТЕРИНУ-
Број: 323-07-04449/2021-05
Датум: 31.05.2021. године
Београд

Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије-Управа за ветерину, на основу члана 34. Закона о добробити животиња ("Службени гласник РС" бр. 41/09), члана 136. Закона о општем управном поступку („Службени гласник РС“ број 26/2018 и 95/18 - аутентично тумачење), члана 23. став 2. Закона о државној управи („Службени гласник РС“ број 79/05 и 101/07, 95/2010 и 99/2014, 47/18 и 30/18 и други закон) и Решења о овлашћењу министра пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије бр. 119-01-4/11/2020-09 од 28.10.2020. године, решавајући о захтеву Института за сточарство, ул. Ауто пут 6, Београд за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, Емина Милакара, в.д. директор доноси:

РЕШЕЊЕ

УСВАЈА СЕ захтев Института за сточарство, ул. Ауто пут 6, Земун, Београд и издаје се Решење о одобрењу спровођења огледа на животињама под називом:

"Примена инхибитора тромбосана у иницијалном лечењу опекотинске ране - свињски модел".

Образложење

Институт за сточарство, ул. Ауто пут 6, Земун, Београд, обратио се овом министарству дана 27.04.2021. године, захтевом за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама под називом: "Примена инхибитора тромбосана у иницијалном лечењу опекотинске ране - свињски модел".

Подносилац пријаве је Министарству, уз захтев, доставио документацију прописану Законом о добробити животиња ("Службени гласник РС" бр. 41/09) и Правилником о условима за упис у регистар за огледе на животињама и садржини и начину вођења тог Регистра, програму обуке о добробити огледних животиња обрасцу захтева за одобрење спровођења огледа на животињама, начину неге, поступања и лишавању живота огледних животиња, као и садржини и начину вођења евиденције о држању, репродукцији, промету, односно спровођењу огледа на животињама ("Службени гласник РС", бр. 39/10) и то: податке о називу и седишту правог лица, попуњен захтев за издавање решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, стручно мишљење Етичке комисије о спровођењу предметног огледа, Решење о упису у Регистар за огледе на животињама.

Предметни оглед је предат на мишљење Етичком савету за добробит животиња, који је на састанку, одржаном дана 28.05.2021. године донео позитивно мишљење за обављање предметног огледа.

Приликом решавања по захтеву, на основу увида у приложену документацију, утврђено је да су се стекли услови за доношење решења као у диспозитиву, сходно одредбама члана 136. Закона о општем управном поступку.

Поука о правном средству: Ово решење је коначно у управном поступку. Против овог решења се може покренути управни спор подношењем тужбе Управном суду Србије у року од 30 дана од дана пријема решења.



Доставити:

1. Институт за сточарство, Ауто пут 6, 11080 Земун, Београд
2. Реп. ветеринарска инспекција, Велислава Вуловића 1а/4, 11000 Београд
3. Евиденција,
4. Архива

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Примена инхибитора тромбосана и манука меда у лечењу опекотинске ране – свињски модел
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
a) Институт за сточарство Земун – Београд b) Завод за хистологију и ембриологију, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске студије, Клиничка истраживања, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду
1. Опис података
<i>1.1 Врста студије</i> <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> Ова студија је спроведена као проспективна, експериментална студија на Научном Институту за Сточарство-Земун. Обухватила је укупно 72 опечене површине на 9 животиња, које су подељене у три експерименталне групе (Бруфен маст, Манука мед, екстрадевичанско маслиново уље) и једну контролну групу (комбинација антибиотских масти). За анимални модел је изабрана свиња племените расе Ландрас због својих хистолошких и физиолишких сличности са људском кожом. 1.2 Врсте података a) квантитативни b) квалитативни 1.3. Начин прикупљања података a) анкете, упитници, тестови b) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту _____ г) административни подаци: навести врсту _____ д) узорци ткива: коже ђ) снимци, фотографије: макрофотографије, микрофотографије хистолошких препарата бојених стандардним и имунохистохемијским методама бојења. e) текст, литературни наводи ж) мапа, навести врсту _____ з) остало: описати _____ 1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- a) Excel фајл, датотека **.xlsx**
- b) SPSS фајл, датотека **.sav**
- c) PDF фајл, датотека **.pdf**
- d) Текст фајл, датотека **.doc, .docx**
- e) JPG фајл, датотека **.jpg**
- f) Остало, датотека **.psd**

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- a) број варијабли: **Велики број варијабли**
- b) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) **9 Екперименталних животиња, 72 опечене регије**

1.3.3. Поновљена мерења

- a) да
- b) не**

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- a) временски размак између поновљених мера је _____
- b) варијабле које се више пута мере односе се на _____
- v) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

- a) Да**
- b) Не**

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- a) експеримент, **Експериментално истраживање спроведено на лабораторијским животињама, хистолошка и имунохистохемијска анализа узоркованих ткива.**
- b) корелационо истраживање, навести тип _____
- c) **анализа текста, Прикупљање података анализом доступне литературе.**
- d) остало, навести шта _____

2.1.2 *Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).*

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података контролисан је применом различитих статистичких метода и поређењем са литературним подацима.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Упоређењем добијених података са литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у у репозиторијуму Универзитета у Новом Саду

3.1.2. URL адреса

3.1.3. DOI

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- а) **Да**
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____
- в) **Не**

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.
Образложење

3.2. Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен?

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?
Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности

(https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање **Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије - Управа са ветерину на основу члана 34. Закона о добробити животиња дала решење број: 323-07-04449/2021-05 о одобрењу спровођења огледа на животињама, према предходно позитивном мишљењу(28.05.2021) Етичког савета за добробит животиња.**

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.
Ауторство – некомерцијално - без прераде

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Борис Привродски ; borisprivrodski@yahoo.com

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Борис Привродски ; borisprivrodski@yahoo.com

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Борис Привродски ; borisprivrodski@yahoo.com