

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

НАЗИВ ФАКУЛТЕТА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
У КРАГУЈЕВЦУ

|           |     |              |          |
|-----------|-----|--------------|----------|
| ПРИЈЕМАЊА |     | 15. 01. 2026 |          |
| Орг. јед. |     | П. број      | Бројност |
| 05        | 345 |              |          |

ОЦЕНА МЕНТОРА О ИЗВЕШТАЈУ О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ  
ДИСЕРТАЦИЈЕ ОДНОСНО ДОКТОРСКОГ УМЕТНИЧКОГ ПРОЈЕКТА

|  |   |  |  |
|--|---|--|--|
| НАЗИВ<br>ДИСЕРТАЦИЈЕ   | Ефекти истовремене примене хипербаричне терапије кисеоником и екстракта биљке <i>Filipendula ulmaria (L.) Maxim.</i> у експерименталном моделу термичке повреде коже пацова |  |  |
| Кандидат   | Милош С. Крстић   |  |  |
| Ментор:  | Проф. др Немања Јовичић   |  |  |
| Датум пријема потпуног извештаја о провери оригиналности докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта | 9. 1. 2026.   |  |  |

Потврђујем да је наведена докторска дисертација оригинално ауторско дело, односно да је резултат оригиналног рада докторанда. Истовремено потврђујем да су током израде докторске дисертације поштоване етичке норме, као и академска правила навођења извора односно цитирања коришћене литературе. Подударање рукописа ове докторске дисертације са другим изворима чини 10% текста. Сличност текста које није последица навођења библиографских података о коришћеној литератури, односи се у највећој мери на коришћење истих или сличних методолошких експерименталних процедура.

Извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Милоша С. Крстића, те се стога предвиђени поступак припреме за одбрану може наставити.

Датум

15. 1. 2026.

ПОТПИС МЕНТОР

Ефекти истовремене примене  
хипербаричне терапије кисеоником  
и екстракта биљке *Filipendula ulmaria*  
(L.) Maxim. у експерименталном  
моделу термичке повреде коже

пацова

*Бу Милош Крстић*



<sup>1</sup>  
УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
БРОЈ: IV-03-798/1  
ДАТУМ: 30.12.2025.ГОДИНЕ  
КРАГУЈЕВАЦ

Милош С. Крстић

**Ефекти истовремене примене  
хипербаричне терапије кисеоником и  
екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.)  
*Maxim.* у експерименталном моделу<sup>4</sup>  
термичке повреде коже пацова**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2025.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Miloš S. Krstić

**Efekti istovremene primene hiperbarične  
terapije kiseonikom i ekstrakta biljke  
*Filipendula ulmaria (L.) Maxim.* u  
eksperimentalnom modelu termičke  
povrede kože pacova**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2025.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Miloš S. Krstić

**The effects of <sup>2</sup> simultaneous administration  
of hyperbaric oxygen therapy and the  
*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim extract in  
the experimental model of the thermal skin  
injury in rats**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2025

**Аутор**

Име и презиме: Милош Крстић

Датум и место рођења: 27.10.1992. Ђуприја

Садашње запослење: Општа болница Ђуприја

**Докторска дисертација**

Наслов: Ефекти истовремене примене хипербаричне терапије кисеоником и екстракта биљке *Filipendula ulmaria (L.) Maxim.* у експерименталном моделу термичке повреде коже пацова

Број страница: 106

Број слика: 43 слике, 1 табела

Број библиографских података: 125

Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац

Научна област (УДК): Медицинске науке

**Ментор:** титула, име и презиме, звање, назив факултета/института и универзитета:

др Немања Јовичић, ванредни професор, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу

Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације:

IV-03-468/17, од 25.06.2024.

**Autor**

Ime i prezime: Miloš S. Krstić

Datum i mesto rođenja: 27.10.1992. Čuprija

Sadašnje zaposlenje: Opšta bolnica Čuprija

**Doktorska disertacija**

Naslov: Efekti istovremene primene hiperbarične terapije kiseonikom i ekstrakta biljke *Filipendula ulmaria (L.) Maxim.* u eksperimentalnom modelu termičke povrede kože pacova

Broj stranica: 106

Broj slika: 43 slike, 1 tabela

Broj bibliografskih podataka: 125

Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac

Naučna oblast (UDK): Medicinske nauke

**Mentor:** titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/instituta i univerziteta

dr Nemanja Jovičić, vanredni profesor, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

Broj i datum odluke Veća univerziteta o prihvatanju teme doktorske disertacije:

IV-03-468/17, од 25.06.2024.

| <b>Author</b>   |
|---|
| Name and surname: Miloš S. Krstić   |
| Date and place of birth: 27.10.1992. Čuprija  |
| Current employment: General hospital Čuprija  |
| <b>Doctoral Dissertation</b>  |
| Title: The effects of simultaneous administration of hyperbaric oxygen therapy and the <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim extract in the experimental model of the thermal skin injury in rats |
| No. of pages: 106   |
| No. of images: 43 images, 1 table   |
| No. of bibliographic data: 125  |
| Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac  |
| Scientific area (UDK): Medical sciences   |
| <b>Mentor:</b> title, name and surname, position, name of faculty / institute and university<br>Dr. Nemanja Jovičić, associate professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac   |
| Topic Application Date:<br>12.02.2024.  |
| Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic:<br>IV-03-468/17, од 25.06.2024.  |

## **Захвалница**

*На крају овог дугог и изазовног пута, желим да изразим искрену захвалност свима који су на било који начин допринели настанку ове докторске дисертације.*

*Пре свега, захваљујем свом ментору проф. др Немањи Јовичићу, на великодушној подрици, стручном вођству и драгоценим саветима током целокупног процеса израде дисертације.*

*Огромну захвалност дугујем проф. др Гвоздену Росићу и проф. др Драгици Селаковић на великом ангажовању у експерименталном раду, подрици и научном усмеравању.*

*Такође, захваљујем колегама и пријатељима који су ми пружали подршку, помоћ и мотивацију, као и свима који су, на било који начин допринели реализацији овог рада.*

*Посебну захвалност указујем својим родитељима, мајци Светлани и оцу Славиши, и сестри Марији, на љубави, снази и животној подрици.*

*На самом крају, најдубљу захвалност желим да искажем онима без којих све ово не би имало смисла. Мојој Бојани, највећем ослоњу и неисцрпној подрици, и мом Михаилу, јединој правој покретачкој снази у животу.*

*Ово је наш заједнички успех.*

## САЖЕТАК

**Увод:** Термичке повреде су најчешћи узрок оштећења коже, што потенцијално доводи до озбиљног морбидитета и значајног морталитета. Термичке лезије доводе до појаве локалних промена које су праћене системском реакцијом организма, услед чега долази до поремећаја оксидативног статуса.

**Циљ:** Циљ овог истраживања био је да проценимо ефекте хипербаричне терапије кисеоником и суплементације антиоксидансима екстракта биљке *Filipendula ulmaria*, појединачно и истовремено, у лечењу термичких повреда коже.

**Материјал и методе:** Као експериментални модел термичке лезије коже, користили смо двомесечне мужјаке *Wistar albino* пацова. Термичке повреде су нанете чврстом алуминијумском шипком на константној температури од 75°C током 15 секунди. Третман хипербаричном оксигенацијом је спроведен у специјално конструисаној комори за пацове (НУВ-С 300) током седам узастопних дана (100% O<sub>2</sub> на 2,5 АТА током 60 минута). Суплементација антиоксидансима је спроведена оралном применом екстракта биљке *Filipendula ulmaria* раствореног у води из славине да би се достигла коначна концентрација од 100 mg/kg телесне тежине током седам узастопних дана.

**Резултати:** Истовремена примена хипербаричне оксигенотерапије и суплементације антиоксидансима екстракта биљке *Filipendula ulmaria* значајно је побољшала макроскопске и хистопатолошке карактеристике подручја и зарастања ране. Такође, овај терапијски приступ је смањио локалну експресију гена за проинфламаторне медијаторе и повећао експресију  $\mu$ -опиоидног рецептора и МТ1 и МТ2 рецептора у подручју ране и кичменој мождини, са последичним повећањем времена реакције у тестовима понашања. Анализа параметара оксидативног стреса је показала значајно побољшање вредности у ткиву ране након примене комбиноване терапије.

**Закључак:** У закључку, представљени резултати нашег истраживања пружају доказе о предностима истовремене примене хипербаричне оксигенотерапије и суплементације антиоксидансима у лечењу термичких повреда коже, са посебним освртом на ублажавање болних сензација праћених овом врстом трауме.

**Кључне речи:** термичка повреда коже, ноцицепција, хипербарична оксигенација, оксидативни стрес

## ABSTRACT

**Introduction:** Thermal skin injuries are a prevalent cause of skin damage, potentially leading to severe morbidity and significant mortality. Thermal lesions give rise to local alterations accompanied by a systemic response of the organism, resulting in a disturbance of the oxidative status.

**Aim:** In this study, we intended to evaluate the effects of HBO (hyperbaric oxygen treatment) and antioxidant supplementation with *Filipendula ulmaria* extract, individually and simultaneously, in the treatment of thermal skin injuries.

**Materials and methods:** As a thermal skin injury experimental model, we used two-month-old male Wistar albino rats. Thermal injuries were made with a solid aluminium bar at a constant temperature of 75°C for 15 s. Hyperbaric oxygen treatment was performed in a specially constructed hyperbaric chamber for rats (HYB-C 300) for seven consecutive days (100% O<sub>2</sub> at 2,5 ATA for 60 min). Antioxidant supplementation was performed by oral administration of *Filipendula ulmaria* extract dissolved in tap water to reach a final concentration of 100 mg/kg b.w. for seven consecutive days.

**Results:** Simultaneous administration of hyperbaric oxygen therapy and antioxidant supplementation with *Filipendula ulmaria* extract significantly ameliorated the macroscopic and histopathological characteristics of the wound area and healing. Also, this therapeutic approach decreased local expression of proinflammatory mediator genes and increased the expression of the  $\mu$ -opioid receptor and the MT1 and MT2 receptors in the wound area and spinal cord, with a consequent increase in reaction times in behavioural testing. An examination of oxidative stress indicators revealed a notable enhancement in values within the wound tissue following the use of combination therapy.

**Conclusion:** The results of our study provide evidence for the benefits of using HBO and antioxidant supplements together in treating thermal skin injuries, especially in reducing painful sensations associated with this type of trauma.

**Keywords:** thermal skin injury; nociception; hyperbaric oxygen therapy; oxidative stress

## Contents

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Увод</b> .....                                     | <b>1</b>  |
| <b>1.1. Опекотине</b> .....                              | <b>2</b>  |
| 1.1.1. Дефиниција .....                                  | 2         |
| 1.1.2. Епидемиологија .....                              | 2         |
| 1.1.3. Класификација .....                               | 3         |
| 1.1.4. Процена дубине опекотине .....                    | 3         |
| 1.1.5. Процена површине опекотина .....                  | 5         |
| 1.1.6. Патофизиолошке промене .....                      | 6         |
| 1.1.7. Општа реакција организма .....                    | 7         |
| 1.1.8. Зрастање .....                                    | 8         |
| <b>1.2. Бол</b> .....                                    | <b>10</b> |
| 1.2.1. Дефиниција .....                                  | 10        |
| 1.2.2. Врсте бола .....                                  | 11        |
| 1.2.3. Пuteви преноса бола .....                         | 11        |
| 1.2.4. Аналгезијски систем .....                         | 12        |
| 1.2.5. Опиоидни рецептори .....                          | 12        |
| 1.2.6. Мелатонински рецептори .....                      | 13        |
| 1.2.7. Неуропептид Y .....                               | 13        |
| 1.2.8. Супстанца P .....                                 | 13        |
| <b>1.3. Терапијски приступ</b> .....                     | <b>14</b> |
| 1.3.1. Иницијални третман .....                          | 14        |
| 1.3.2. Прогресија .....                                  | 15        |
| 1.3.3. Инфламација .....                                 | 15        |
| 1.3.4. Ђелијска смрт .....                               | 15        |
| 1.3.5. Оксидативни стрес .....                           | 16        |
| <b>1.4. Хипербарична терапија кисеоником</b> .....       | <b>16</b> |
| 1.4.1. Дефиниција .....                                  | 16        |
| 1.4.2. Механизам дејства, индикације .....               | 16        |
| 1.4.3. Ризици и контраиндикације .....                   | 17        |
| 1.4.4. Утицај хипербаричног кисеоника на организам ..... | 17        |
| <b>1.5. Антиоксиданти</b> .....                          | <b>18</b> |
| 1.5.1. Слободни кисеонични радикали .....                | 18        |
| 1.5.2. Систем антиоксидативне заштите .....              | 19        |
| 1.5.3. Супероксид дизмутаза .....                        | 19        |
| 1.5.4. Каталаза .....                                    | 20        |
| 1.5.5. Глутатион .....                                   | 20        |
| 1.5.6. Класификација антиоксиданата .....                | 20        |
| 1.5.7. Антиоксиданти и опекотине .....                   | 21        |
| <b>1.6. <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim</b> .....  | <b>22</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.6.1. Антиинфламаторна и антиоксидантна активност .....                                  | 23        |
| <b>2. Циљеви и хипотезе .....</b>   | <b>24</b> |
| 2.1. Главни циљеви истраживања .....  | 25        |
| 2.2. Радне хипотезе истраживања .....   | 26        |
| <b>3. Материјал и методе .....</b>  | <b>27</b> |
| 3.1. Врста студије.....   | 28        |
| 3.2. Популација која се истражује.....  | 28        |
| 3.3. Узорковање .....   | 28        |
| 3.4. Варијабле које су мерене у студији.....  | 28        |
| 3.5. Услови за чување животиња током трајања експерименталних<br>протокола.....           | 29        |
| 3.6. Експерименталне групе и третмани .....   | 30        |
| 3.7. Третман .....  | 30        |
| 3.7.1. Експериментални модел термичке повреде коже .....                                  | 30        |
| 3.7.2. Третман хипербаричном оксигенацијом.....   | 32        |
| 3.7.3. Третман екстрактом биљке FU .....  | 33        |
| 3.8. Бихевиорално тестирање .....   | 33        |
| 3.8.1. Тест вруће плоче ( <i>Hot-plate</i> тест).....                                     | 33        |
| 3.8.2. Тест повлачења репа ( <i>Tail-flick</i> тест) .....                                | 34        |
| 3.9. Узимање узорака ткива.....   | 34        |
| 3.10. Хистолошка анализа.....   | 34        |
| 3.10.1. Хистохемијска техника бојења хематоксилином и еозином.....                        | 36        |
| 3.10.2. Селективна хистохемијска техника бојења колагена Picrosirius red<br>методом ..... | 36        |
| 3.11. Изоловање RNA и реверзна транскрипција у комплементарну DNA .....                   | 37        |
| 3.12. PCR анализа у реалном времену .....   | 38        |
| 3.13. Одређивање параметара оксидативног стреса.....                                      | 39        |
| 3.13.1. Одређивање активности каталазе (CAT) у ткиву кичмене мождине .....                | 39        |
| 3.13.2. Колориметријска анализа активности супероксид-дизмутазе (SOD) .....               | 41        |
| 3.13.3. Колориметријска анализа липидне пероксидације .....                               | 42        |
| 3.14. Статистичка анализа.....  | 43        |
| 3.14.1. Снага студије и величина узорка .....   | 43        |
| 3.14.2. Статистичка обрада података.....  | 43        |
| <b>4. Резултати.....</b>  | <b>44</b> |

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| <b>4.1.</b> | <b>Морфолошки и хистолошки параметри околине ране и околине .....</b>   | <b>45</b>  |
| 4.1.1.      | Хистолошки скор за епидермис .....  | 45         |
| 4.1.2.      | Хистолошки скор за дермис .....   | 47         |
| 4.1.3.      | Формирање и таложење колагена .....   | 49         |
| <b>4.2.</b> | <b>Макроскопске промене у области ране .....</b>  | <b>50</b>  |
| <b>4.3.</b> | <b>Релативна експресија гена за проинфламаторне цитокине у подручју ране .....</b>                              | <b>51</b>  |
| <b>4.4.</b> | <b>Релативна експресија гена повезаних са апоптозом у области ране .....</b>                                    | <b>55</b>  |
| <b>4.5.</b> | <b>Релативна експресија гена за факторе раста у подручју ране .....</b>   | <b>58</b>  |
| <b>4.6.</b> | <b>Релативна експресија гена опиоидних и мелатонинских рецептора у подручју ране .....</b>                      | <b>63</b>  |
| <b>4.7.</b> | <b>Релативна експресија гена који кодирају опиоидне и мелатонинске рецепторе на нивоу кичмене мождине .....</b> | <b>69</b>  |
| <b>4.8.</b> | <b>Тестирање понашања .....</b>   | <b>75</b>  |
| <b>4.9.</b> | <b>Анализа параметара оксидативног стреса .....</b>   | <b>77</b>  |
| <b>5.</b>   | <b>Дискусија .....</b>  | <b>81</b>  |
| <b>6.</b>   | <b>Закључак .....</b>   | <b>89</b>  |
| <b>7.</b>   | <b>Литература .....</b>   | <b>91</b>  |
| <b>8.</b>   | <b>Скраћенице .....</b>   | <b>102</b> |

# **1. Увод**

## 1.1. Опекотине

### 1.1.1. Дефиниција

Опекотина представља оштећење коже и локалних ткива које настаје као последица дејства патогене количине топлоте, хемијских супстанци, електричне енергије или разних зрачења на површину тела (1).

Опекотине су повреде које се дешавају свакодневно. Највећи број је лакше природе и лечи се амбулантно. Велике опекотинске повреде, иако мање заступљене, представљају једну од најтежих повреда, јер доводе до изражених системских, хемодинамских и метаболичких поремећаја. Праћене су веома високим морталитетом и остављају последице и након излечења. Поред огромног медицинског значаја, опекотине представљају и велики економски и друштвени проблем с обзиром на дугу хоспитализацију, сложену рехабилитацију и скупо лечење рана и ожиљака (2).

И након опоравка постоји озбиљан проблем, јер су поред физичких оштећења присутне и психолошке последице, као што су трауме и стрес, који су често узроковани дугим периодом боравка у болници, ожиљцима и трајним инвалидитетом (3).

Преживљавање након тешких опекотина значајно је повећано због бољег лечења опекотинског шока, активнијег хируршког приступа, ефикасније контроле инфекције, имунског и метаболичког статуса. Међутим, опекотине су и даље од великог медицинског, научног и економског значаја и могу утицати и погоршати физичко и ментално здравље преживелих и представљати значајне друштвене изазове, посебно за оне пацијенте са екстензивним опекотинама (4).

### 1.1.2. Епидемиологија

Опекотине представљају једну од најчешћих повреда у свету, од којих су више од 86% термичке повреде и настају услед директног излагања пламену, врелим течностима и пари, као и контакту са врелим предметима. Око 4% опекотина је узроковано струјом, 3% хемијским супстанцама, било базама или киселинама, а 7% су друге врсте опекотина (5).

Према подацима Светске здравствене организације (енгл. *World Health Organization*, WHO), термалне опекотине се јављају са учесталошћу од приближно 6,6 милиона људи и одговорне су за више од 300 000 смртних исхода сваке године широм света (6).

Иако представљају глобални здравствени проблем, велика већина опекотина јавља се у неразвијеним земљама и земљама у развоју, углавном због недостатка образовања и приступа медицинској нези, али и других фактора попут старости грађевинске инфраструктуре, нижих безбедносних стандарда, одсуства детектора дима, неисправне струје и др. (6).

Јављају се код млађих и старијих особа, жена и мушкараца. Код одраслих, мушкарци најчешће добијају опекотине ван куће, на отвореном и на радном месту, а жене код куће, најчешће током припреме хране. Деца најчешће добијају опекотине код куће, када нису под надзором одраслих. На основу података Америчког удружења за опекотине, опекотине су чешће код мушкараца. Термичке повреде коже представљају проблем од великог значаја за јавно здравље и озбиљну патологију која доводи до значајног морбидитета и морталитета, али има и велики економски утицај. Између 7 и 12 милиона људи који задобију опекотине и којима је потребан медицински третман, дуже време одсуствује из школе или са посла. Учесталост опекотина је већа од учесталости

вируса хумане имунодефицијенције и туберкулозе заједно и близу је учесталости свих малигних неоплазми (7).

### 1.1.3. Класификација

Постоји више класификација опекотина, у односу на бројне факторе, попут механизма и времена настанка и према тежини повреде. Тежина повреде се одређује у односу на дубину и проценат захваћене површине коже, уз одређене специфичности самих пацијената, попут коморбидитета и старости.

Етиолошка подела опекотина обухвата термичке опекотине (изазване дејством повишене температуре), радијационе (узроковане утицајем зрачења на површину коже), електричне (дејство електричне струје или удара грома), и хемијске опекотине (које настају деловањем хемијских супстанци, база или киселина).

Термичке повреде су најчешће и могу бити узроковане: врућим течностима, што је најчешћи тип, чини скоро 70% опекотина код деце, али и код старијих особа; повреде изазване директним дејством пламена или вреле паре; контактне опекотине, изазване додиром врелих предмета (8).

Подела опекотина у односу на извор топлоте:

*Ambustio* – опекотине изазване врелим течностима или врелом паром

*Combustio* – опекотине изазване директним дејством пламена или врелих предмета

*Electrocutio* – извор оштећења ткива је струја

*Fulguratio* – удар грома

*Causoma* – оштећење изазвано хемијским супстанцама

*Radiodermatitis* – повреда настала као последица зрачења

Према времену настанка разликујемо свеже (унутар 48 часова од повреде) и старе опекотине (више од 48 часова од повреде) (8).

### 1.1.4. Процена дубине опекотине

Озбиљност опекотина у великој мери зависи од дубине захваћеног ткива. Према критеријумима Америчког удружења за лечење опекотина (енгл. *American Burn Association*, АВА) важни параметри у процени дубине опекотине су изглед опечене коже, присуство и постојаност еритема (да ли је постојан или се губи на додир), присуство бола и процена сензибилитета (9).

По том основу разликујемо три степена опекотина.

Опекотине првог степена су површне опекотине, захватају само епидермис. Клинички се манифестују еритемом, едемом и умереном болном осетљивошћу. Карактерише их потпун, спонтани опоравак у року од неколико дана.

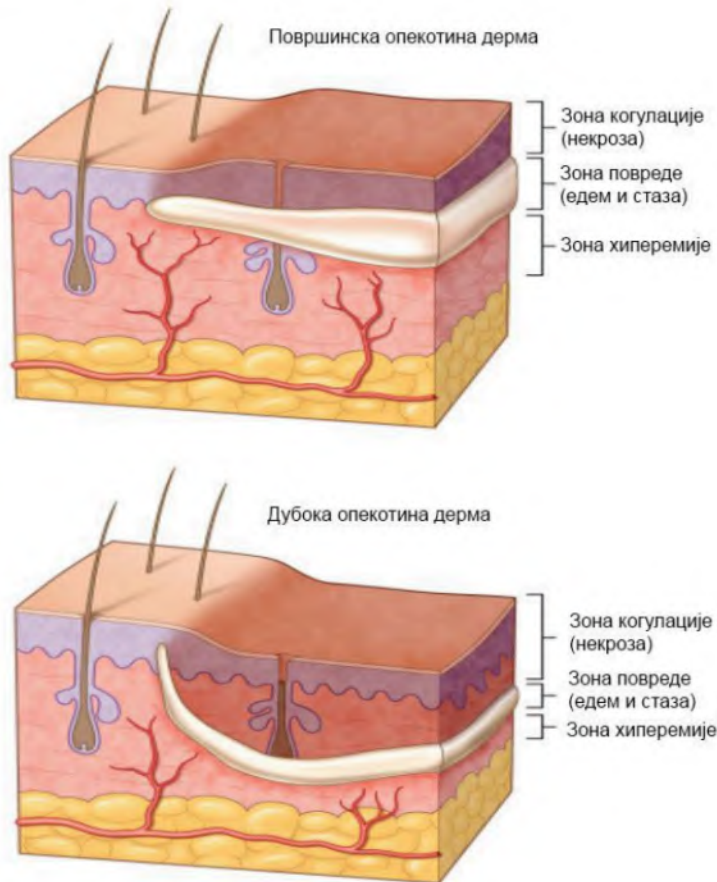
Опекотине другог степена су опекотине делимичне дебљине коже и обухватају два подтипа, IIa и IIb.

IIa степен чине површне опекотине другог степена које поред епидермиса захватају и површни слој дермиса. Упечатљив знак је појава була по опеченој кожи, као и изражен болни осећај. У овом стадијуму је такође могуће спонтано излечење у року од 10-14 дана.

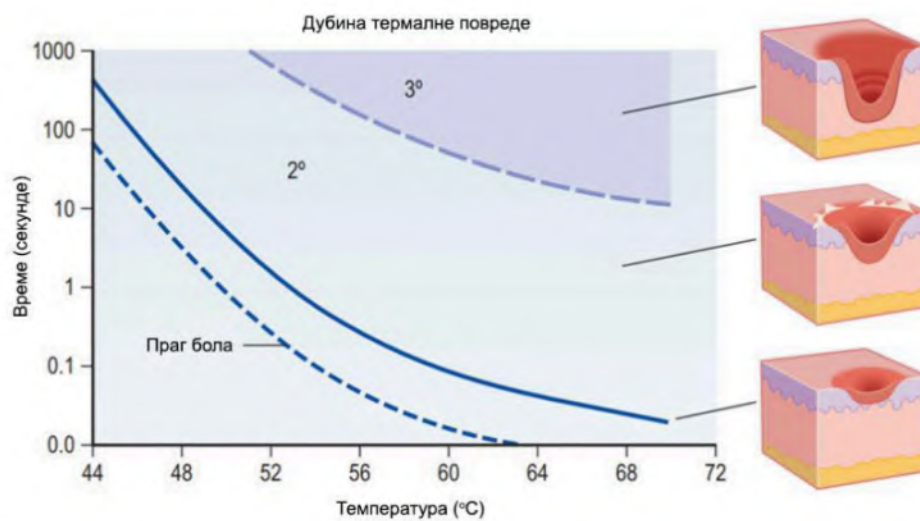
IIb степен, или дубоке опекотине другог степена се шире и на дубље слојеве дермиса. За разлику од претходних, овај стадијум се карактерише смањеним болним сензацијама услед оштећења малих нервних завршетака. Као и у површном другом

степену могућа је појава була по повређеној кожи, која је сивобеличасте боје. Могуће је спонтано излечење, али након дужег периода од 30 до 45 дана. На месту повреде заостаје ожиљак.

Опекотине трећег степена су опекотине пуне дебљине коже. То је најозбиљнији степен опекотина, које се простиру целом дебљином епидермиса и дермиса. Кожа је сува, мраморизована. Присутне су смеђе – жуте крусте (есхаре), безболне на додир. Уништени су кожни аднекси, тако да није могуће спонтано излечење.



Слика 1. Шематски приказ зона термалне повреде коже (модификовано према Neligan, 2017.)



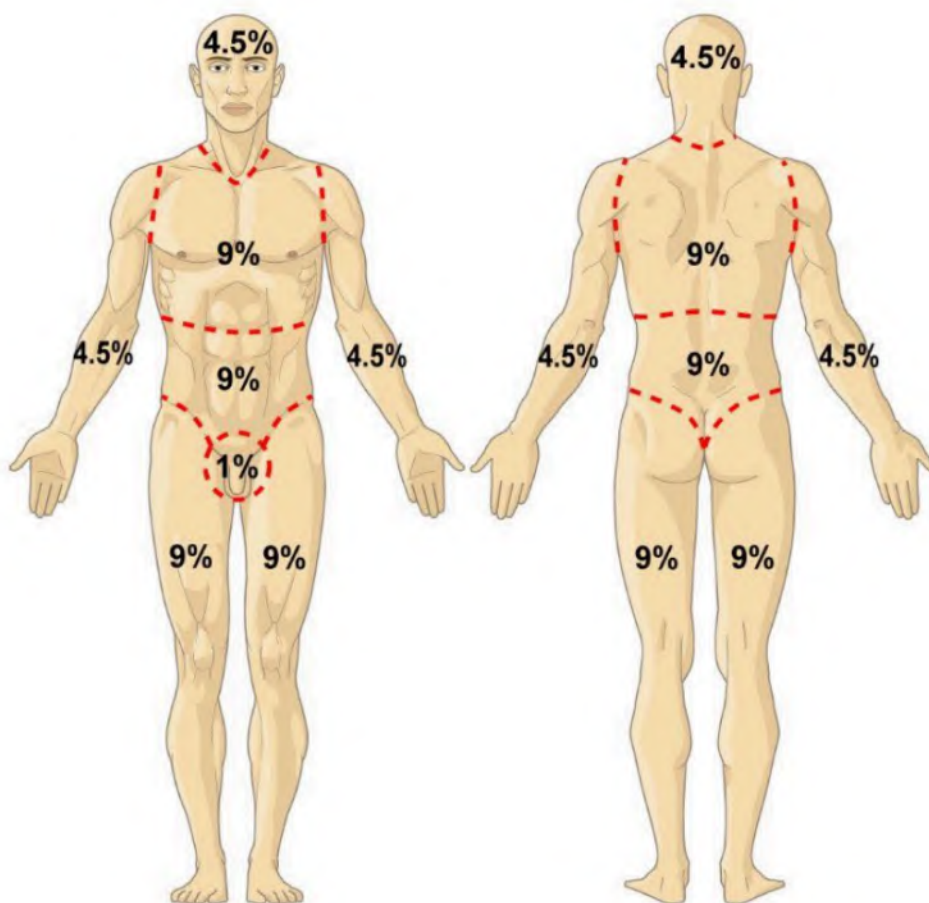
(10)

Слика 2. Значај времена и температуре у детерминацији дубине и тежине повреде (модификовано према Neligan, 2017.)

#### 1.1.5. Процена површине опекотина

Постоји више метода за процену укупне опечене површине тела. Најчешће се примењују Валасово (*Alexander Burns Wallace (1906-1974)*, шкотски пластични хирург) правило деветке и правило длана.

Валасово (*Wallace*) правило деветке заснива се на подели тела одраслих пацијената на 11 региона од којих сваки чини 9% укупне површине тела. Преостали 1% остаје за гениталије и регију перинеума (11).



Слика 3. Валасово правило деветке (модификовано према Grabb & Smith, 2019.)

Правило длана се веома често користи због своје једноставне примене, пре свега у грубој процени укупне опечене површине тела. То је метода по којој длан повређене особе представља 1% укупне површине тела. Рачуна се палмарна страна длана са прстима.

Оба ова правила не могу се применити код деце, због диспропорције у расту појединих делова тела (12).

#### 1.1.6. Патофизиолошке промене

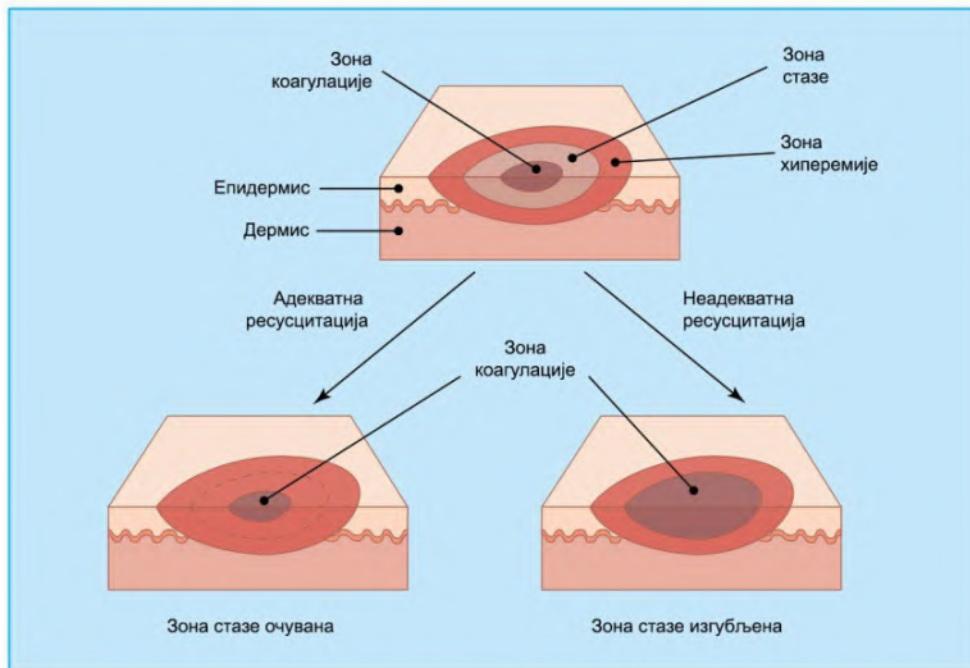
Два су могућа механизма настанка оштећења коже дејством високе температуре: директним дејством топлоте на кожу и индиректно, услед поремећаја микроциркулације на нивоу коже.

Локалне карактеристике опекотина најпрецизније су описане од стране Џексона (*David M Jackson*, амерички хирург) 1947. године, где се издвајају три основне зоне.

То су **зона коагулације** која обухвата централну зону, тачку максималног, неповратног, оштећења коже.

Зона коагулације окружена је другом зоном, **зоном стазе** која садржи реверзибилно измењено ткиво, ткиво које се може спасити и самим тим представља најзначајнији део ткива за терапијски приступ.

Трећа зона се назива **зона хиперемije** и обухвата еритематозно ткиво на периферији повреде. Промене настале у овој зони подлежу потпуном спонтаном опоравку (13).



(12)

Слика 4. Зоне термалне повреде према Џексону и ефекти адекватне и неадекватне ресусцитације (модификовано према Hettiaratchy, 2004.)

#### 1.1.7. Општа реакција организма

Поред директног штетног дејства топлоте на локално ткиво, опекотинска траума утиче и на остале органске системе у телу. Непосредно по повређивању, долази до повећане пропустљивости капилара и знатног смањења волумена плазме. Тешка опекотинска повреда за резултат има знатно оштећење ткива и хиповолемијски шок, који узрокују стварање и ослобађање локалних и системских медијатора (хистамин, серотонин, кинини, слободни кисеонични радикали (енгл. *reactive oxygen species*, ROS) простагландини, тромбоксан, интерлеукини (енгл. *Interleukins*, IL). Медијатори запаљења ослобађају се локално и у удаљеним ткивима (14).

Опекотинска рана може бити извор бројних медијатора запаљења и активације низа каскадних реакција, изазивајући тако системску инфламаторну реакцију. Системска инфламаторна реакција се карактерише наглим порастом концентрације

проинфламаторних цитокина који ремете хомеостазу имунског система. Бројне промене прате почетак овог процеса, попут хемодинамских промена (вазодилатација, повећана пропустљивост, настанак едема), активације коагулационог система, активације система комплемента, миграције леукоцита. Циркулишући медијатори као што су IL6, IL8, TNF $\alpha$  (енгл. *tumor necrosis factor- $\alpha$* , фактор некрозе тумора- $\alpha$ ), ослобађају се из локалног ткива опекотинске ране и доприносе хиперметаболичком и инфламаторном стању (15).

Термичке повреде проузрокују реакцију и активацију многих ћелија имунског система. Ослобођени цитокини из активираних леукоцита могу да утичу на развој имунског одговора у два смера. Повољан исход имунског одговора на опекотинску повреду може убрзати опоравак и преживљавање. Насупрот томе, могућ је неповољан ток који резултира поремећајем и смањењем функције свих органа што се може завршити и леталним исходом. Основни патофизиолошки процес је поремећај микроциркулације који настаје због три основна механизма: тромбоза услед васкуларног оштећења, повећање проинфламаторних фактора и утицај фактора апоптозе. Миграција полиморфонуклеара у повређена ткива стимулише миграцију и активацију других ћелија посредовану бројним проинфламаторним цитокинима, попут TNF $\alpha$ , IL6. Макрофаги се сматрају главним извором проинфламаторних медијатора у овом процесу. Опекотина, сама по себи, повећава продукцију ових медијатора у захваћеном и околном ткиву и изазива хиперметаболичко стање. Хиперметаболизам је повезан са продукцијом проинфламаторних цитокина и са појавом реактивних врста кисеоника, као што су супероксид анјон радикал, хидроксилни радикал, водоник пероксид, азот оксид, азот пероксид. TNF $\alpha$  има знатан утицај на индукцију апоптозе, активира неутрофиле и моноците и индукује секрецију других проинфламаторних медијатора попут IL1, IL6 чија је концентрација константно у порасту у периоду након опекотине. Поред њих, повећана је концентрација и других цитокина, IL4, IL10, TGF $\beta$  (енгл. *Transforming Growth Factor- $\beta$* , трансформишући фактор раста- $\beta$ ), који имају различите улоге у зависности од фазе развоја повреде и опоравка. Фактори удружени са апоптозом показују значајну промену експресије, укључујући Bcl-2 (енгл. *B-cell lymphoma 2*), Bax (енгл. *Bcl-2-associated X protein*, Bcl-2 удружени X протеин) и активност каспазе-3, која резултује повећањем апоптозе ћелија у месту захваћеном опекотинском повредом (16).

#### 1.1.8. Зарастање

Локално зарастање опекотинске повреде не разликује се од зарастања било које друге ране. Ово је један од најкомплекснијих процеса и његов физиолошки ток и повољан исход могу бити угрожени мноштвом фактора, ендогених и екзогених. Зарастање ране је веома динамичан поступак који представља резултат сложене интеракције бројних чинилаца. Велики број мигрирајућих ћелија, пре свега полиморфонуклеара, али и тромбоцита и других елемената има утицаја на зарастање рана. Све ове ћелије и ћелијски елементи служе као извор цитокина и фактора раста.

Зарастање опекотинских рана пролази кроз четири узастопне фазе: хемостаза, инфламација, пролиферација и ремоделовање (17).

##### 1) Фаза хемостазе

Почетна фаза санације ране, која за циљ има заустављање крварења. Започиње вазоконстрикцијом, у трајању 5-10 минута, да би се спречило искрварење. Краткотрајну вазоконстрикцију прате вазодилатација и повећана пропустљивост

капилара услед чега настаје едем ткива. Главни актери ове фазе су крвне плочице, тромбоцити, који доприносе хемостазу и коагулацији. Сам прекид континуитета коже изазива ослобађање вазоактивних фактора који активирају хемостазу и каскаду коагулације. Формира се фибрински угрушак који првенствено служи за зечепљење ране и спречавање крварења.

Тромбоцити поред хемостатске улоге, учествују и у продукцији бројних цитокина и фактора раста, неопходних за одвијање друге фазе зарастања ране. Као најзаступљенији ћелијски елемент током ране репарације, имају важну улогу и у раном спречавању развоја инфекције (18).

## 2) Фаза инфламације

Ову фазу карактерише имунски одговор којим се уклањају патогени микроорганизми и спречава развој инфекције. Покреће се ослобађањем молекулских сигнала који настају у току настанка повреде. Повређено ткиво и некротичне ћелије отпуштају сигналне молекуле који активирају и стимулишу хемотаксу ћелија имунског система (интерлеукин-1 $\beta$ , трансформишући фактор раста - TGF, интерферон гама - IFN $\gamma$ , хемокини). Из оштећених крвних судова, стимулирани хеоматрактантима, у рану након повреде мигрирају неутрофили, моноцити, мастоцити, лимфоцити.

Основна функција мобилисаних неутрофила је дебридман девитализованог ткива и фагоцитоза инфективних агенаса. У те сврхе ствара се велика количина слободних кисеоничних радикала и протеаза. Искоришћене неутрофиле фагоцитују макрофаги. Сматра се да макрофаги играју кључну улогу (проангиогенетску) за успешан одговор и исход репарације ткива кроз синтезу бројних потентних фактора раста, као што су TGF $\beta$ , bFGF (енгл. *Basic fibroblast growth factor*, основни фибробластни фактор раста), PDGF (енгл. *Platelet-derived growth factor*, тромбоцитни фактор раста) и VEGF (енгл. *Vascular endothelial growth factor*, васкуларни ендотелни фактор раста) који промовише реепителизацију, фиброплазију и ангиогенезу (19).

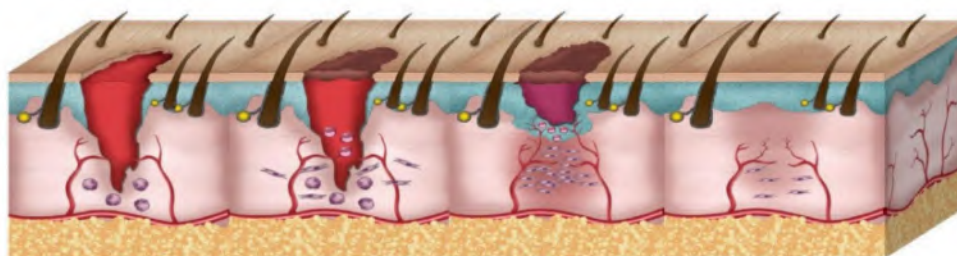
## 3) Фаза пролиферације

Неколико дана након повреде, гранулационо ткиво почиње да се формира кроз приметну пролиферацију фибробласта. Фибробласти представљају главни тип ћелија дермиса и одговорни су за производњу есенцијалних структурних протеина екстрацелуларног матрикса (енгл. *Extracellular matrix*, ECM), као што су гликозаминогликан и колаген. Синтеза екстрацелуларног колагена почиње око трећег дана, континуирано расте око три недеље, након чега успорава и постепено се изједначава са нивоом његове разградње. Колаген је основа везивног ткива. Сматра се да се регулација пролиферације и миграције фибробласта одвија под дејством локалног ослобађања фактора раста (VEGF и bFGF) и цитокина од стране макрофага. Стварање гранулационог ткива захтева и формирање нових крвних судова за његову исхрану. Макрофаги, оштећене епителне и ендотелне ћелије омогућавају ослобађање ангиогених сигнала. Медијатори из екстрацелуларног матрикса мобилишу миграцију и пролиферацију кератиноцита, који су главне ћелијске компоненте епидермиса, што покреће поновну епителизацију ране. Процес епителизације је омогућен митозом епителних ћелија на периферији ране и из базалних ћелија дубљих слојева коже код рана које захватају дубље слојеве коже (20).

#### 4) Фаза ремоделовања

По завршетку епителизације, престају ћелијска пролиферација и неоваскуларизација. Формира се ожиљак и рана улази у фазу ремоделовања која траје неколико месеци. Током ове последње фазе постиже се равнотежа између синтезе нових компоненти матрикса ожиљка и његове разградње посредством протеаза. Сваки поремећај завршава се формирањем хроничне ране. Приликом сазревања ожиљка долази до регресије васкуларних структура, смањења броја леукоцита, трансформације фибробласта и миофибробласта и замене привременог ЕСМ у стални колагени матрикс. Због међусобне адхеренције миофибробласта долази до контракције целокупног гранулационог ткива и сакупљања (контракције) ожиљка. TGF $\beta$ 1 стимулише диференцијацију фибробласта у миофибробласте. Овом контракцијом спајају се ивице ране и омогућава затварање. По завршетку процеса епителизације, миофибробласти подлежу апоптози. Прекомерна активност миофибробласта може резултовати фиброзом и формирањем екстензивног ожиљног ткива.

Реорганизацијом колагених влакана у организоване, зреле форме постиже се повећање тензионе снаге ране. Тип III колагена замењује се типом I и успоставља се однос 4:1. Трајање фазе матурације зависи од генетских фактора домаћина, старости, локализације ране на телу, типа повреде и трајања инфламације. Важно је напоменути да су, током синтезе колагена, неопходни кисеоник и витамин C. Хипоксија и недостатак витамина C могу утицати на дужину трајања повреде и периода опоравка (21, 22).



1. Хемостаза      2. Инфламација      3. Пролиферација      4. Ремоделовање

Слика 5. Четири фазе зарастања термалне повреде коже (модификовано према Mirhajet al, 2022.)

## 1.2. Бол

### 1.2.1. Дефиниција

Бол се може дефинисати као непријатно чулно и емоционално искуство изазвано стварним или потенцијалним оштећењем ткива. Бол је осећај тела и увек је индивидуално искуство. Настао под утицајем разних биолошких, социјалних и психичких фактора, увек се региструје као nelaгодна сензација. Иако окарактерисан као негативан појам, бол може имати и позитивну компоненту јер представља заштитни механизам који указује на потенцијално оштећење ткива. Представља пратећи симптом

многих болести и један је од водећих разлога због кога пацијенти траже медицинску помоћ (23).

### 1.2.2. Врсте бола

Бол може бити класификован у две главне групе: брзи бол и спори бол.

Брзи бол се још назива и акутним или оштрим болом. Осети се за око 0,1 секунду након болног стимулуса. Као пример ове врсте бола наводи се осећај након убода коже иглом.

Спори бол, познат и као дуготрајни или жарећи бол, почиње после једне или неколико секунди од дејства фактора и градицијски се повећава током наредних секунди или чак и минута. Повезује се са разарањем ткива (23).

### 1.2.3. Пuteви преноса бола

Дејством одређене ноксе стимулишу се периферни рецептори за бол, ноцицептори. Ноцицептори су слободни нервни завршеци, широко распрострањени у површним слојевима коже и у појединим унутрашњим органима. Реагују на три врсте стимулуса – механичке, топлотне и хемијске. Механички и топлотни стимулуси могу изазвати брзи бол, док спори бол може бити последица дејства све три врсте стимулуса. Температура при којој топлота почиње да оштећује ткиво је више од 45°C (степен Целзијуса). Хемијске супстанце су посебно важне за изазивање спорог бола, а међу њима се нарочито издвајају простагландини, брадикинин, серотонин, супстанца Р, ацетилхолин.

Додатни узрок бола може бити и исхемија ткива, како због накупљања млечне киселине у хипоксичним ткивима, тако и због продукције појединих хемијских супстанци.

Бол се од периферних рецептора, слободних нервних завршетака, даље преноси неуронима првог реда до дорзалних рогова кичмене мождине. Две врсте влакана учествују у овој фази преноса бола. То су мала, мијелинизована А $\delta$  влакна, којима се преноси добро локализован, брзи, оштар бол и немијелинизована С влакна за пренос лоше локализованог, спорог, дуготрајног бола (24).

Од кичмене мождине сигнали се даље преносе преко спиноталамичког тракта према мозгу. Као важни неуротрансмитери у овој фази издвајају се глутамат и супстанца Р. Глутамат има важан утицај на пут преноса брзог бола, док супстанца Р утиче на пренос дуготрајног, спорог бола. Глутамат се секретује на завршецима А $\delta$  влакана. Његово време деловања је само неколико милисекунди. С влакна на својим завршецима продукују, поред глутамата, и супстанцу Р. Супстанца Р делује много спорије од глутамата и концентрација јој се повећава у наредних неколико секунди, чак и минута (25).

Неурони другог реда полазе од дорзалних рогова кичмене мождине, предњом комисуром прелазе на контралатералну страну и преносе сигнале асцендентним путем до таламуса. Сигнали се крећу кроз два пута – неоспиноталамичким и палеоспиноталамичким путем (26).

Неоспиноталамички тракт је одговоран за пренос брзог бола. А $\delta$  влакна се завршавају углавном у ламини I дорзалних рогова где надражују неуроне другог реда неоспиноталамичког тракта. Предњом комисуром прелазе на контралатералну страну и дугим влакнима путују до таламуса. Мањи део влакана се завршава у ретикуларним областима мозданог стабла, док се највећи део завршава у вентробазалном комплексу. Спори бол се преноси путем палеоспиноталамичког тракта и веома се лоше локализује.

Спора С влакна се завршавају у делу дорзалних рогова који се назива желатиозна супстанца (енгл. *substantia gelatinosa*). Сигнали се потом дугим аксонима преносе према мозгу. Само део ових влакана завршава у таламусу, док већина завршава у једној од три области: у ретикуларним једрима продужене мождине, понса и мезенцефалона; у текталној области мезенцефалона или у периакведукталној сивој маси (27).

#### 1.2.4. Аналгезијски систем

Систем аналгезије представља способност мозга да активацијом система за контролу бола врши супресију болних сигнала. Три главне компоненте овог система су:

1) периакведуктална сива маса и перивентрикуларне области мезенцефалона и горњег дела понса око Силвијусовог акведукта и делови око треће и четврте коморе;

2) *nucleus raphae magnus* и *nucleus reticularis paragigantocellularis*;

3) комплекс за инхибицију бола у дорзалним роговима кичмене мождине (28).

Важну улогу у систему аналгезије имају бројне хемијске супстанце, међу којима се издвајају супстанца Р, енкефалини и серотонин. Влакна која потичу из периакведукталне сиве масе као и *nucleus raphae magnus* стимулишу лучење серотонина. Серотонин делује стимулаторно на групу неурона кичмене мождине да стварају енкефалин. Енкефалин је супстанца за коју се сматра да изазива пресинаптичку и постсинаптичку инхибицију А $\delta$  и С влакана на нивоу дорзалних рогова кичмене мождине, чиме се блокира пренос болних сигнала. Клиничка истраживања су показала да опиоиди, морфин и морфину сличне супстанце, утичу на више нивоа система аналгезије, укључујући и дорзалне рогове кичмене мождине (29).

#### 1.2.5. Опиоидни рецептори

Опиоидни рецептори припадају групи рецептора везаних за G протеин. Широко су распрострањени у централном нервном систему и периферним ткивима. Овако широка дистрибуција је повезана са фундаменталном улогом коју опиоидни систем има, не само у контроли ноцицепције, већ и у регулацији биолошких активности попут емоционалног понашања, учења и памћења, система награђивања. Посредују у деловању већине познатих неуротрансмитера и хормона. Могу се активирати ендогеним путем или екзогено, уносом одређених једињења опијата (30,31).

Ендогени опиоидни систем обухвата четири врсте рецептора и њихове ендogene пептидне лиганде. Рецептори ендогеног опиоидног система су ми (енгл.  $\mu$  *opioid receptors*,  $\mu$ OR), делта (енгл.  $\Delta$  *opioid receptors*,  $\delta$ OR), капа (енгл.  $K$  *opioid receptors*,  $k$ OR) и ноцицептин (енгл. *Nociceptin receptors*, NOPR) рецептори. Пептидни лиганди који учествују у трансмисији сигнала унутар опиоидног ендогеног система су енкефалини и ендорфини који имају склоност везивања за  $\mu$ OR и  $\delta$ OR, динорфини који се првенствено везују за  $k$ OR, ноцицептин који је високо селективан за NOPR. Функцију ових пептидних лиганада могу да опонашају поједини опиоидни лекови, попут морфина, деривата морфина, фентанила, оксикодона. Значајна нуспојава примене ових лекова је изазивање зависности и респираторне депресије, због чега је њихова употреба значајно ограничена (32).

Студије су показале да  $\mu$ OR и  $k$ OR, поред антиноцицептивне активности, учествују и у антиинфламаторним и неуропротективним механизмима и да су експримирани у широком спектру ткива, укључујући централни нервни систем, васкулатуру, кератиноците коже и имунске ћелије (33).

Опиодини рецептори изражени у кожи играју значајну улогу у зарастању рана и саставни су део нормалне хомеостазе коже (34).

#### 1.2.6. Мелатонински рецептори

Мелатонински рецептори се налазе у различитим областима мозга, мрежњачи, хипофизи и неким периферним органима. Рецептор мелатонина 1 (енгл. *melatonin receptor 1*, MT1) и рецептор мелатонина 2 (енгл. *Melatonin receptor 2*, MT2) играју важну улогу у антиноцицептивним механизмима у мозгу и кичменој мождини.

Мелатонин је хормон чија је основна улога регулисање репродуктивне функције тела, али поред тога учествује и у другим важним процесима у организму, попут регулације имунитета, контроле циркардијалног ритма и регулисања сна, превенције карцинома. Продукује га претежно епифиза, излучује се ноћу. У мањој мери се може синтетисати и у другим органима, попут ока, тимуса, гастроинтестиналног тракта, коже (35). Од посебног значаја је ефикасност мелатонина у третману различитих болних синдрома. Аналгетски ефекат мелатонин остварује преко два рецептора, MT1 и MT2. Ови рецептори су распрострањени у различитим областима централног нервног система и у неким периферним ткивима. Представљају део и асцендентног ноцицептивног пута, али и десцендентног антиноцицептивног пута. Локализовани су у специфичним подручјима мозга и кичмене мождине, ретикуларним и вентромедијалним језгрима таламуса (асцендентни пут), периакведукталној сивој маси (десцендентни пут) (36, 37).

И MT1 и MT2 рецептори су идентификовани у пределу дорзалних рогова кичмене мождине, посебно концентрисани у пределу ламина I-V, што представља главне регионе за трансмисију болних сигнала (35).

#### 1.2.7. Неуропептид Y

Неуропептид Y (енгл. *neuropeptide Y*, NPY) је супстанца која учествује у модулирању различитих физиолошких процеса, укључујући и соматосензацију. Високе концентрације овог пептида присутне су у централном и периферном нервном систему свих сисара. Своју функцију може да оствари везивањем за 5 различитих врста рецептора. Посебно се издвајају Y1 и Y2 рецептори који су у великој мери експримирали на нивоу дорзалних рогова кичмене мождине (38). Досадашња научна истраживања говоре у прилог томе да неуропептид Y преко својих рецептора Y1 и Y2 учествује у модулирању и акутног и хроничног бола механичког и термичког порекла. Из досадашњих података може се закључити да Y2 рецептори учествују првенствено у супримирању акутног бола, док се стимулацијом Y1 рецептора доминантно ублажава неуропатски бол. Активацијом Y2 рецептора инхибира се ослобађање екситаторних неуротрансмитера на нивоу примарних аферентних неурона желатинозне супстанце. Y1 рецептори се налазе на кључним местима преноса бола. Њиховом активацијом остварује се ефекат сличан оном који се постиже активацијом  $\mu$ OR, супресијом инхибиторних синаптичких сигнала на нивоу дорзалних рогова кичмене мождине, посебно у површним ламинама I-II. Аналгетски ефекат се остварује преко инхибиције GABA и ослобађања глицина из желатинозне супстанце (39).

#### 1.2.8. Супстанца P

Супстанца P је неуропептид из породице тахикинина, присутан у централном и периферном нервном систему и у ћелијама имунског система. Регулише различите физиолошке процесе и укључена је у многа патолошка стања. Своју функцију остварује

везивањем за неурокинин-1 рецептор (енгл. *neurokinin-1 receptor*, NK1R).

Улога супстанце P која привлачи највише пажње је њена улога у перцепцији бола. Део је примарних аферентних путева за пренос ноцицептивних сигнала. Највећа концентрација супстанце P налази се у дорзалним роговима кичмене мождине, супстанцији нигри и амигдали. У пределу пресинаптичких аксона C (спорих) влакана дорзалних рогова кичмене мождине налазе се везикуле које продукују супстанцу P и глутамат. Доказано је да супстанца P има значајну улогу у сензибилизацији постсинаптичких неурона на глутамат, помажући тако у преношењу сигнала бола ка мозгу.

У пределу оштећеног ткива, сензорни неурони ослобађају своје продукте, међу којима се налазе и супстанца P и пептид повезан са геном калцитонина (енгл. *calcitonin gene-related peptide*, CGRP). Активација ових продуката доводи до дегранулације мастоцита, вазодилатације и хемотаксе хелија имунског система. Супстанца P доприноси активацији медијатора запаљења на месту оштећења ткива. Укључена је у одговор неутрофила и има стимулаторни ефекат на експресију интерлеукина 8, такође укљученог у регрутацију неутрофила. Оваква интеракција нервног и имунског система назива се неурогена инфламација и укључена је у патогенезу многих патолошких стања. Овај молекул има такође и јак вазодилаторни ефекат (40).

### 1.3. Терапијски приступ

Због своје огромне учесталости, као и бројних потенцијалних, озбиљних компликација, трошкова и дужине лечења, опекотинске ране представљају велики изазов у терапијском приступу.

Тешке опекотинске повреде су праћене локалном деструкцијом ткива, али и системским реакцијама насталим као последица екстремног, нерегулисаног имунског и инфламаторног одговора, што може довести до стања шока, поремећаја функције различитих органских система, и леталног исхода (41).

#### 1.3.1. Иницијални третман

Третман пацијената са опекотинама веома је комплексан и подразумева пружање прве помоћи и опште медицинске помоћи, обраду ране и спровођење мера ресусцитације, као и транспорт до одговарајуће здравствене установе. Мере прве помоћи се састоје од удаљавања повређеног од агенса који је изазвао опекотину, уклањања одеће и обуће која је захваћена током повређивања, испирања повређене регије, покривања чистим чаршавом или газом, утопљавања, елевације главе и екстремитета.

Општа медицинска помоћ, поред већ наведених поступака обухвата и одређивање тежине опекотинске повреде и тријажу повређених, оксигенотерапију, отварање венских линија и започињање надокнаде течности, пласирање уринарног катетера и назогастричне сонде, антитетанусну заштиту, и напослетку транспорт до болничке установе (42). Хируршко лечење се одвија у специјализованим установама у којима постоје неопходни услови за пружање адекватне медицинске помоћи.

Лечење пацијената са опекотинама захтева мултидисциплинаран приступ, где у одређеним фазама лечења учествују специјалисти различитих области медицине. Пацијенти са малим и лаким опекотинама могу се лечити амбулантно, док је пацијенте са великом опекотинском повредом неопходно хоспитализовати.

Опште терапијске мере усмерене су на превенцију и лечење поремећаја који настају непосредно након саме повреде и у њеном даљем току. Карактеристично за опекотинску повреду је да рана постоји дуго времена, да су патофизиолошки поремећаји

веома изражени и да се могу развијати данима након повреде.

Крајњи циљ у лечењу опекотина је затварање опекотинске ране. Од раног затварања ране зависи успех целокупне терапије. Затварање опекотинске ране постиже се спонтаном епителизацијом или трансплантацијом коже.

У зарастању опекотинске ране огромну улогу има инфламаторни процес, који подразумева мобилисање и активацију великог броја медијатора запаљења, бројних цитокина, хемокина, фракције комплемента и различитих фактора раста (43).

Пожељне су методе лечења које омогућавају брже зарастање рана и смањују козметичке недостатке и стварање бујног гранулационог ткива.

### 1.3.2. Прогресија

Прогресија опекотинске ране узрокована је различитим механизмима, попут вазоконстрикције/вазодилатације, оксидативног стреса, хипоперфузије и микротромбоза, који активирају запаљенске каскаде и апоптозу или некрозу. Ишемија, оксидативни стрес, инфламација, ћелијска смрт (било апоптоза или некроза) су фактори који доприносе прогресији опекотинске ране. Нарочито је осетљиво ткиво у пределу зоне стазе. Прогресију опекотинске ране прати низ патохистолошких промена попут истањивања епидермиса, отицања дермиса и промена у колагену, као и инфилтрација медијатора запаљења (43).

### 1.3.3. Инфламација

Као физиолошки одговор на стрес ткива после опекотина настају локални и системски запаљенски одговор. Продужени запаљенски одговор, посредован разним медијаторима инфламације, активацијом система комплемента, продукцијом слободних кисеоничних радикала, апоптозом и миграцијом проинфламаторних ћелија, доприноси развоју опекотинске ране. Прве ћелије које стижу на место повреде су полиморфонуклеарни леукоцити (енгл. *Polymorphonuclear leukocytes*, PMNs), који доприносе даљем оштећењу ткива и активирају системски инфламаторни одговор. Следи конзистентно повећање нивоа проинфламаторних цитокина (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6). Као смерница у третману опекотина намеће се смањење овог запаљенског процеса, пре свега утицајем на смањење миграције PMNs и концентрације проинфламаторних цитокина (44).

### 1.3.4. Ћелијска смрт

Ћелијска смрт заузима важно место у раном развоју опекотина. Претходне студије су сугерисале да су и некроза и апоптоза укључене у патогенезу опекотинске ране. Директна термичка траума, првенствено у зони коагулације, узрокује примарно некрозу. Некроза је у мањој мери присутна и у ткиву зоне стазе. Апоптоза, која се може дефинисати као програмирана ћелијска смрт, представља важнији процес у почетној фази опекотина и доминантан је узрок умирања ћелија у зони стазе. Константна апоптоза у зони стазе доприноси губитку ткива и пропадању структура, па се решавање овог процеса намеће као један од главних циљева. Један од најосетљивијих маркера апоптозе су каспазе. Активирана каспазна каскада узрокује морфолошке и биохемијске промене карактеристичне за апоптозу у ткивима кроз протеолитичко цепање циљних протеина (45).

### 1.3.5. Оксидативни стрес

Термичке повреде доводе до оштећења физичке баријере коже која нормално учествује у заштити тела од микроорганизама и других утицаја из спољне средине и изазива имунокомпромитовано стање које пацијенте са опекотинама чини веома осетљивим на инфекцију, сепсу и развој мултиорганске дисфункције (енгл. *multiple organ failure*, MOF) (46).

Локална ткивна хипоксија и активација каскадних система као реакција на термичку трауму ткива, уз велику производњу високореактивних слободних кисеоничних радикала, резултују поремећајем оксидативног статуса (47).

Поред локалног оштећења ткива, трауматско стање изазвано термичком повредом доводи и до системских промена. Долази до поремећаја равнотеже између слободних радикала и природних чистача организма, првенствено због повећане активности слободних радикала и липидне пероксидације (48).

Трауматско стање изазвано термичком повредом мења равнотежу између слободних радикала и молекула који имају улогу природних чистача, првенствено тако што ствара интензивно повећање концентрације високо реактивних кисеоничних радикала (46).

Ово указује на значај терапијског приступа који за циљ има редукцију оксидативног стреса, у лечењу опекотина (49).

## 1.4. Хипербарична терапија кисеоником

### 1.4.1. Дефиниција

Хипербарична терапија кисеоником (енгл. *Hyperbaric oxygen therapy*, ХБОТ) је неинвазивна метода која укључује третман чистим кисеоником (100%) у посебно дизајнираним коморама, под притиском који је виши од нормалног атмосферског притиска (1 апсолутна атмосфера). Према спецификацијама удружења за подморску и хипербаричну медицину (енгл. *The Undersea and Hyperbaric Medical Society*, УНМС) (50), овај притисак може бити једнак или већи од 1,4 атмосфере. Препорука је, међутим, да се третман за све тренутно одобрене индикације спроводи под притиском од најмање 2, а највише 3 атмосфере. Захваљујући претходним истраживањима, успостављени су сигурносни критеријуми, по којима је дозвољено удисање чистог кисеоника под притиском до три атмосфере у трајању од око 1 сата. Прекорачење притиска или трајања третмана може резултовати појавом конвулзија (51).

### 1.4.2. Механизам дејства, индикације

Механизми деловања хипербаричне терапије кисеоником заснивају се на повећању и парцијалног притиска удахнутог кисеоника и хидростатског притиска, што има утицај на различите патофизиолошке поремећаје (52).

Терапија хипербаричном оксигенацијом побољшава снабдевање периферних ткива кисеоником, делује антиинфламаторно, имуносупресивно, антибактеријски, аналгетски. Повољно утиче на санацију рана, стимулацијом пролиферације и диференцијације фибробласта и стварањем колагена. Стимулише се неоваскуларизација и повећава енергетски метаболизам периферних ћелија. Настаје периферна вазоконстрикција која

доводи до смањења локалног едема. Познат је и ефекат хипербаричне оксигенације код тровања гасовима и токсинима.

Нека од медицинских стања у чијем лечењу се често примењује терапија хипербаричном оксигенацијом су анемија, хроничне ране, опекотине, краш повреде, гангрена, инфекције (53).

#### 1.4.3. Ризици и контраиндикације

Терапија хипербаричном оксигенацијом представља безбедну процедуру, уопштено говорећи. Компликације су ретке, али одређени ризици ипак постоје. Потенцијални ризици укључују:

- повреде средњег ува и пуцање бубне опне услед превеликог притиска;
- миопија, изазвана привременим променама на очном сочиву;
- баротраума - колапс плућа изазван променама ваздушног притиска;
- напади настали услед дејства превелике количине кисеоника у централном нервном систему;
- хипогликемија код дијабетичара на инсулину;
- пожар – због окружења богатог кисеоником.

Једина апсолутна контраиндикација за примену терапије хипербаричном оксигенацијом је нетретирани пнеумоторакс. Зато се саветује адекватна дијагностика у виду радиолошке дијагностике плућа и грудног коша пре започињања третмана.

Релативне контраиндикације су бројније. Наведене су неке од најчешћих.

- хипертензија – због могућег пораста притиска током третмана;
- дијабетес мелитус са вредностима гликемије преко 30 или испод 10;
- конгестивна срчана инсуфицијенција са ејекционом фракцијом мањом од 35%;
- активна инфекција горњег респираторног тракта (може изазвати баротрауму);
- грозница;
- присуство пејсмејкера или неког другог имплантираног апарата (могућ поремећај у раду услед повишених вредности притиска);
- хронична опструктивна болест плућа или астма;
- нетретирани канцер;
- позитивна анамнеза на неку врсту неуролошких напада (54).

#### 1.4.4. Утицај хипербаричног кисеоника на организам

За нормално функционисање, ткивима у организму је неопходна адекватна количина кисеоника. Кисеоник се транспортује до ћелија на два начина. Везивањем за хемоглобин који се налази у еритроцитима и, у знатно мањој мери, физички растворен у плазми. Уколико је циркулација крви поремећена услед неке трауме или патолошког процеса, у ткивима долази до хипоксије, тј. недостатка кисеоника. Хипербарична терапија кисеоником повећава количину кисеоника коју крв може да носи. Количина кисеоника у свим ткивима се повећава јер је плазма обогаћена великом количином раствореног кисеоника.

Познато је да, под утицајем кисеоника, настају промене у активности појединих ћелија, смањена адхезија леукоцита и вазоконстрикција у нормалним крвним судовима. Такође, његова концентрација стимулише и продукцију и активност фибробласта и стварање колагена. Високе концентрације кисеоника у периферним ткивима директно су бактерицидне за већи број бактерија, посебно анаеробних (гасна гангрена). У мањим дозама, кисеоник има и бактериостатски ефекат, спречава њихову деобу, доприносећи на тај начин олакшавању фагоцитозе и активности леукоцита.

Главни процеси у зарастању рана, контракција и епителизација, одвијају се пропорционално са количином кисеоника која је доступна. Кисеоник може да директно стимулише зарастање рана. Синтеза колагена, ангиогенеза, епителизација су процеси који се одвијају посредством ензима за чију активност је неопходан ниво кисеоника у плазми већи од 25 mmHg (55).

Механизми којима ХБО подстиче ангиогенезу и фиброплазију код исхемичних рана, одвијају се преко фактора ангиогене активности, који су присутни у тромбоцитима и макрофагима. Процес ангиогенезе стимулисан је градијентом кисеоника, који се разликује у рани и њеној околини. Стимулише се стварање ангиогених фактора раста (енгл. *Angiogenic growth factors*, AGF) и фактора раста макрофага (енгл. *Macrophage-Derived Growth Factor*, MDGF) који доводе до гранања капилара, синтезе колагена, и тако изазивају васкуларну пролиферацију и зарастање рана. Истовремено, ангиогенеза је стимулисана активирањем ендотелних ћелија, које повећавају експресију фактора раста (VEGF, FGF и PDGF) који доводе до миграције глатких мишићних ћелија и њихове пролиферације.

Бројни ефекти повећаног снабдевања кисеоником попут ангиогенезе, повећане пролиферације фибробласта и смањења едема указују на потенцијални значај који хипербарична терапија може имати у зарастању рана. Повећањем снабдевања кисеоником, хипоксично ткиво које окружује место опекотине постепено враћа припадајуће физиолошке функције на хомеостатски ниво. Истраживања о лечењу опекотина код животиња применом ХБОТ су показала да примена терапије смањује едем кроз вазоконстрикцију и стимулише дистрибуцију кисеоника директним осмотским деловањем (56).

Студије су, поред претходно доказаних ефеката ХБОТ, као што су побољшано зарастање рана, смањење едема и позитиван утицај на инфекцију, показале и позитивне ефекте ХБО у смањењу бола након трауме (57).

## 1.5. Антиоксиданти

Антиоксиданти су биолошки активни молекули који спречавају стварање слободних радикала у телу и истовремено неутралишу постојеће и на тај начин учествују у одржавању оксидативног статуса на жељеном нивоу (48).

Оксидативни статус представља однос између концентрације прооксиданата и антиоксиданата. Нарушавање оксидативног статуса у корист прооксиданата назива се оксидативни стрес (58).

### 1.5.1. Слободни кисеонични радикали

Слободни кисеонични радикали су молекули који садрже бар један атом кисеоника и један или више неспарених електрона у последњој молекулској или атомској орбитали. Веома су реактивни и ступају у интеракције са свим типовима молекула из окружења што резултује свеукупним оштећењем ћелијске функције. У физиолошким условима, током одређених процеса попут аеробног дисања и инфламације, ствара се мала количина слободних радикала, првенствено у макрофагима и хепатоцитима. Физиолошко стање организма карактерише се балансирањем између стварања и уклањања реактивних кисеоничних врста. Повећана продукција ROS може се јавити код појединих патолошких процеса.

Услед присуства неспареног електрона, ROS се понашају као јаки оксидациони агенси. У реакцији са донором електрона, тј. супстратом, редукују се и губе карактер слободних радикала. Истовремено, супстрат се оксидује и постаје слободни радикал друге генерације, тј. секундарни слободни радикал.

Од бројних ROS који настају током оксидативног процеса, најзначајнији су супероксид анјон радикал  $O_2^{\bullet-}$ , водоник пероксид  $H_2O_2$ , хидроксил радикал  $HO^{\bullet}$ , хидроксипероксил  $HO_2^{\bullet}$ , и др. (59).

### 1.5.2. Систем антиоксидативне заштите

У циљу заштите од штетних ефеката оксидативног стреса, активирају се бројне методе антиоксидативне заштите. Систем антиоксидативне заштите обухвата два механизма одбране.

Основну одбрану организма од слободних радикала чини група ензима задужених за њихову неутрализацију, међу којима су најзначајнији супероксид дизмутаза (енгл. *superoxide dismutase*, SOD), каталаза (енгл. *catalase*, CAT), глутатион пероксидаза (енгл. *glutathione peroxidase*, GPx) и глутатион редуктаза (енгл. *glutathione reductase*, GR). Поред њих, важну улогу имају и неензимски антиоксиданси, као што су глутатион, витамин С, β-каротен и α-токоферол.

Секундарни систем антиоксидативне заштите обухвата ензиме задужене за поправку или уклањање већ оштећених молекула. У ову групу спадају различите оксидоредуктазе, као што су тиол-трансферазе, протеин-ADP-рибозилтрансферазе и АТФ- и  $Ca^{2+}$ -независне трансферазе. Поред тога, улогу имају и одређени пигменти, попут мелатонина, као и поједини стабилни липидни молекули, на пример LDL (60).

### 1.5.3. Супероксид дизмутаза

Супероксид дисмутаза је металопроtein који драматично убрзава, чак до 10.000 пута, процес дизмутације супероксид анјон-радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) у водоник-пероксид ( $H_2O_2$ ). Реакција коју катализује изгледа овако:



У односу на врсту метала који има улогу кофактора, постоји више врста SOD:

- Cu,Zn-SOD, за чију је активност неопходно присуство бакра и цинка, и која се налази у интермембранском простору митохондрија и цитоплазми ћелија;
- Mn-SOD, митохондријска форма супероксид дисмутаза са манганом у активном центру, смештена у митохондријском матриксу;
- EC-SOD, екстрацелуларна варијанта SOD која делује ван ћелије; и

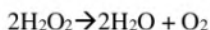
- Fe-SOD, облик који садржи гвожђе и јавља се углавном у хлоропластима биљних ћелија.

Сви наведени облици могу да катализују претходно наведену реакцију (61).

#### 1.5.4. Каталаза

Каталазе су ензими који се налазе претежно у пероксизомима сисара. Заједно са пероксидазама спадају у хидропероксидазе. То су широко заступљене оксидоредуктазе које омогућавају хетеролитичко цепање везе између два атома кисеоника у молекулу водоник-пероксида ( $H_2O_2$ ), као и у различитим мањим органским пероксидима.

Каталитичка реакција се одвија тако што два молекула  $H_2O_2$  бивају разложена, при чему се формирају два молекула воде и један молекул кисеоника:

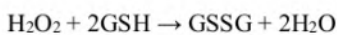


- Каталазе се могу сврстати у неколико категорија — две од њих обухватају хем-садржеће ензиме, односно типичне, „монофункционалне“ каталазе, као и каталаза-пероксидазе.
- Поред тога, постоје и каталазе које као кофактор садрже манган уместо хема. За разлику од хем-садржећих каталаза које се јављају и у прокариотским и у еукариотским ћелијама, манганске каталазе су присутне искључиво у прокариотима (62).

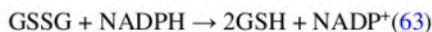
#### 1.5.5. Глутатион

Редуковани облик глутатиона (енгл. *glutathione*, GSH) је есенцијални неензимски антиоксиданс. Може деловати директно, неутралишући слободне радикале и прооксиданте, али и као кофактор за ензиме попут глутатион пероксидазе, глутатион с-трансферазе и глиоксалазе.

• GPx су ензими који у свом активном месту садрже селен и учествују у редукцији  $H_2O_2$  и липидних хидропероксида, претварајући их у воду и липидне алкоhole. У овој реакцији редукциони косупстрат је редуковани глутатион (GSH). Процес се може приказати једначином:



• Као резултат ове реакције формира се оксидовани глутатион (глутатион-дисулфид, GSSG), састављен од два молекула GSH повезана дисулфидном везом. Он се затим поново преводи у редуковани облик деловањем ензима глутатион редуктазе (GR):



#### 1.5.6. Класификација антиоксиданата

Постоји неколико начина за класификацију антиоксиданата. Главне поделе су засноване на њиховом механизму деловања, пореклу, начину на који се примењују, хемијској природи молекула и растворљивости. На основу порекла и хемијских

својстава, антиоксиданси се деле на природне и синтетичке. Природни антиоксиданси су једињења добијена из биљака и других живих организама са јаким потенцијалом да инхибирају оксидативни стрес контролисањем стварања слободних радикала, уклањањем слободних радикала, прекидањем ланчаних реакција посредованих слободним радикалима и спречавањем процеса липидне пероксидације. Природни антиоксиданси који се често цитирају у литератури која се односи на исхрану и зарастање рана укључују: витамин Е, алфа-липоичну киселину, витамин С, екстракт грожђа, коензим Q10, глутатион и лутеин, који подстичу развој новог ткива у ранама смањењем концентрације слободних радикала (64).

Витамин Е је један од најчешћих антиоксиданата растворљивих у липидима који се користе у борби против штетних ефеката слободних радикала на кожи. Витамин Е има повећану ефикасност у зарастању рана због своје природне способности да веома лако продире у кожу (65).

Неколико студија је пратило ниво малондиалдехида (енгл. *malondialdehyde*, MDA), који је један од крајњих производа пероксидације полинезасићених масних киселина и маркер оксидативног стреса, након примене природних антиоксиданата. Рандомизована студија спроведена на 32 деце примљене у јединицу за опекотине показала је значајно смањење нивоа MDA код пацијената којима су додавани витамин Е, С и цинк сулфат (66). Студија спроведена на 35 пацијената са тешким опекотинама такође је показала смањење маркера липидне пероксидације код 18 пацијената који су примали витамин Е (67).

#### 1.5.7. Антиоксиданти и опекотине

Бројне студије указују на значајну улогу антиоксиданата у процесима зарастања рана, пре свега кроз редуцију оксидативног стреса, модулацију упалног одговора и подстицање ангиогенезе и синтезе колагена. Делујући путем инхибиције проинфламаторних медијатора и активације регенеративних сигналних путева, антиоксиданти убрзавају регенерацију оштећеног ткива и доприносе унапређењу клиничког исхода (68).

Смањење концентрације реактивних врста кисеоника и азота представља кључни механизам којим се постиже стабилизација ћелијске мембране, инхибиција продукције проинфламаторних цитокина и побољшање метаболичке хомеостазе. Ови ефекти доводе до редуције инфламаторног и хиперметаболичког одговора, што је посебно значајно у лечењу хроничних и тешких рана, као и код пацијената са термалним повредама, где се често јављају компликације као што су инфекције и продужење хоспитализације (69).

Употреба антиоксиданата као адјувантне терапије у лечењу акутних и хроничних рана добија све већу пажњу у научној и клиничкој заједници. Савремена истраживања усмерена су на испитивање различитих класа антиоксиданата, њихове биорасположивости, оптималних доза и специфичних механизма деловања у контексту ткивне регенерације и побољшања укупних терапијских исхода (70).

Антиоксиданти такође повољно утичу на имунску функцију организма, стабилизујући функцију имунских ћелија, модулишући цитокински одговор и побољшавајући баријерну функцију коже. Ово је од посебне важности код опекотина, где је повећана склоност ка секундарним инфекцијама и продуженом зарастању.

Клиничке студије потврђују да примена антиоксиданата може смањити учесталост инфекција, убрзати зарастање и смањити ризик од компликација (46).

Имајући у виду да су термичке повреде повезане са изразитим оксидативним стресом и метаболичким поремећајима, циљање ових патофизиолошких механизма представља рационалан приступ у савременој терапији опекотина. Већина студија показује да употреба антиоксиданата доводи до смањења времена зарастања, скраћеног боравка у болници и редукције учесталости инфекција (71).

Једна од већих студија, која је обухватила 180 пацијената различитог узраста и степена термалних повреда, показала је значајне користи од примене природних антиоксиданата као што су витамини С и Е, цинк сулфат, алопуринол, мелатонин и N-ацетилцистеин. Посебно се истакао цинк сулфат, чија примена је довела до смањења морталитета и убрзаног зарастања рана. Ове резултате потврђују и мање студије, попут оне коју су спровели *Al-Kaisy* и сарадници, које указују на сличан терапијски потенцијал (72).

Поред својих антиоксидативних својстава, поменути једињења показују и различите адјувантне ефекте који утичу на различите фазе зарастања рана, укључујући модулацију ћелијске сигнализације, побољшање хомеостазе и регулацију имунолошког одговора (77). Њихова примена омогућава повољан физиолошки одговор у условима поремећеног редокс баланса, какви се често јављају код тешких повреда.

Историјски гледано, употреба природних биљних производа у лечењу различитих болести присутна је хиљадама година, често и без прецизног разумевања њихових активних молекула. Данас је познато да многи од ових природних препарата поседују антиоксидативна својства која могу значајно допринети нормалном току зарастања, спречавајући дегенерацију гранулационог ткива и делујући у свим фазама регенеративног процеса. Њихова безбедност и минимални нежељени ефекти додатно их препоручују као вредну компоненту савремених терапијских протокола (73, 74).

## 1.6. ***Filipendula ulmaria* (L.) Maxim**

*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim (FU) је зељаста, четиригодишња биљка из породице ружа (Rosaceae). У народу је позната и као медуника. Може се наћи у влажним регијама, у близини бара и мочвара, као и на ободима шума. Распрострањена је у Европи и Азији (75).

Традиционално се користи у лечењу различитих запаљења, за ублажавање стомачних тегоба, у лечењу реуматизма и неуралгија. У лечењу се користе сви делови биљке. Позната је примена чаја од медунике у лечењу уринарних тегоба, као и у лечењу дијареје код деце. Од великог значаја је и стимулаторни утицај ове биљке на зарастање рана (76).

Истраживања су показала да су лековити делови биљке богати фенолним једињењима. Три главне класе фенолних једињења су: фенолна киселина и њени деривати (салицилска киселина, метил салицилат, салицилалдехид, елагинска киселина, гална киселина), флавоноиди и флавоноидни гликозиди (кверцетин, кетехинферол, рутозид, хиперозид, кверцирин, апигенин, астрагалин, епикатехин) и танини (телимаграндин I и II, ругозин А, В1, В2, D, Е1 и Е2). Овакав хемијски састав погодује бројним фармаколошким дејствима, укључујући антиоксидативно, антиинфламаторно,

аналгетско, антипиретичко, антиреуматско, гастропротективно, диуретско (77).

#### 1.6.1. Антиинфламаторна и антиоксидантна активност

Показало се да богат садржај фенола, пре свега флавоноида и танина, у великој мери детерминише горе наведене фармаколошке особине (78).

Сматра се да је јака антиинфламаторна активност цветова и листова ове биљке продукт пре свега високог садржаја салицилне киселине и њених деривата. Важан механизам супресије инфламаторног процеса је инхибиција синтезе простагландина из арахидонске киселина. Ово се може постићи инхибицијом ензима циклооксигеназе.

Веома важан антиинфламаторни механизам је инхибиција синтезе простагландина из арахидонске киселине инхибицијом ензима који генеришу простагландин – циклооксигеназе и липооксигеназе. Доказано је да кверцетин и рутин имају инхибиторно дејство на липооксигеназу, док кверцетин зауставља и дејство циклооксигеназе (75).

Изражен антиоксидативни потенцијал последица је високе концентрације фенола, пре свега у цветовима и плодовима медунике. Феноли различитим механизмима утичу на регулисање оксидативног статуса, директним реаговањем са слободним кисеоничним радикалима и активацијом антиоксидативних ензима (79).

Према подацима из литературе, кверцетин и рутин, два најпроученија флавоноида, главне су компоненте снажне антиоксидативне способности. И кверцетин и рутин анулирају дејство супероксид анјон радикала у реакцијама липидне пероксидације, чиме се испољава антиоксидантна активност. Кверцетин може да утиче и на одлагање почетка липидне пероксидације, смањењем цитотоксичности и оксидације липопротеина мале густине што за резултат има очување нивоа  $\alpha$ -токоферола (80).

Имајући у виду све претходно наведено, јасно је да коришћење екстракта FU у третману пост-термичких повреда може довести до вишеструких предности.

## **2. Циљеви и хипотезе**

## 2.1. Главни циљеви истраживања

1. Утврђивање ефеката термичке лезије коже према критеријумима:

- локалних хистоморфолошких промена
- промена експресије рецептора (опиоидни –  $\mu$  и  $\kappa$ , MT1 и MT2)
- промена параметара оксидативног стреса (индекс липидне пероксидације – TBARS, активност антиоксидантних ензима – SOD, CAT) на нивоу одговарајућих сегмената кичмене мождине
- промена одговора на термичку драж у тестовима *tail flick* и *hot plate*

2. Утврђивање ефеката примене хипербаричне оксигенације код термичке лезије коже према критеријумима:

- локалних хистоморфолошких промена
- промена експресије рецептора (опиоидни –  $\mu$  и  $\kappa$ , MT1 и MT2)
- промена параметара оксидативног стреса (индекс липидне пероксидације – TBARS, активност антиоксидантних ензима – SOD, CAT) на нивоу одговарајућих сегмената кичмене мождине
- промена одговора на термичку драж у тестовима *tail flick* и *hot plate*

3. Утврђивање ефеката примене антиоксидантне суплементације екстрактом биљке FU код термичке лезије коже према критеријумима:

- локалних хистоморфолошких промена
- промена експресије рецептора (опиоидни –  $\mu$  и  $\kappa$ , MT1 и MT2)
- промена параметара оксидативног стреса (индекс липидне пероксидације – TBARS, активност антиоксидантних ензима – SOD, CAT) на нивоу одговарајућих сегмената кичмене мождине
- промена одговора на термичку драж у тестовима *tail flick* и *hot plate*

4. Утврђивање ефеката симултане примене хипербаричне оксигенације и антиоксидантне суплементације екстрактом биљке FU код термичке лезије коже према критеријумима:

- локалних хистоморфолошких промена
- промена експресије рецептора (опиоидни –  $\mu$  и  $\kappa$ , MT1 и MT2)
- промена параметара оксидативног стреса (индекс липидне пероксидације – TBARS, активност антиоксидантних ензима – SOD, CAT) на нивоу одговарајућих сегмената кичмене мождине
- промена маркера апоптотске активности (Bax, caspase-3, Bcl-2) на нивоу одговарајућих сегмената кичмене мождине
- промена одговора на термичку драж у тестовима *tail flick* и *hot plate*

## **2.2. Радне хипотезе истраживања**

1. Термичке лезије утичу на експресију опиоидних и мелатонинских рецептора и промене параметара оксидативног стреса на месту лезије и у одговарајућим сегментима кичмене мождине;
2. Примена хипербаричне оксигенације утиче на експресију опиоидних и мелатонинских рецептора и промене параметара оксидативног стреса на месту лезије и у одговарајућим сегментима кичмене мождине, у експерименталном моделу термичке лезије;
3. Примена антиоксидантне суплементације екстрактом биљке FU утиче на експресију опиоидних и мелатонинских рецептора и промене параметара оксидативног стреса на месту лезије и у одговарајућим сегментима кичмене мождине, у експерименталном моделу термичке лезије;
4. Симултана примена хипербаричне оксигенације и антиоксидантне суплементације екстрактом биљке FU утиче на експресију опиоидних и мелатонинских рецептора и промене параметара оксидативног стреса на месту лезије и у одговарајућим сегментима кичмене мождине, у експерименталном моделу термичке лезије;

### **3. Материјал и методе**

### 3.1. Врста студије

Експериментална студија на животињама *in vivo* и на материјалу анималног порекла *ex vivo*.

### 3.2. Популација која се истражује

Планирано истраживање обухватило је укупно 56 мужјака пацова Wistar albino соја, старих 10–12 недеља и просечне телесне масе 250–300 g. Животиње су смештене по четири у кавезу, у контролисаним условима средине (температура  $23 \pm 1$  °C, светло/мрак режим 12/12 h), уз слободан приступ храни и води током целокупног двонедељног периода третмана. Све експерименталне процедуре изведене су у складу са релевантним прописима (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) и ARRIVE упутству.

### 3.3 Узorkовање

Експерименталне животиње су подељене у <sup>4</sup>седам (7) експерименталних група (8 животиња у групи):

1. контролна група – интактне животиње;
2. група са термичком лезијом – примена електричног грејача (кружница дијаметра 10 mm, дебљине 0.5 mm, 75 °C током 15 s) на кожу у висини средњег дела леђа;
3. група са термичком лезијом и применом ХБО – примена електричног грејача уз накнадни седмодневни третман у хипербаричној комори (2.5 atm, 60 минута дневно);
4. група са термичком лезијом и применом екстракта биљке FU – примена електричног грејача уз накнадни седмодневни третман екстрактом биљке FU (100 mg/kg, орално, свакодневно);
5. група са термичком лезијом и симултаном седмодневном применом ХБО (2.5 atm, 60 минута дневно) и екстракта биљке FU (100 mg/kg, орално, свакодневно);
6. група са применом ХБО – седмодневни третман у хипербаричној комори (2.5 atm, 60 минута дневно);
7. група са применом екстракта биљке FU – седмодневни третман екстрактом биљке FU (100 mg/kg, орално, свакодневно).

### 3.4. Варијабле које су мерене у студији

Тестирање понашања:

Тестирање понашања је обављено 24 часа након завршетка протокола. Процена ноцицепције извршена је *hot plate* тестом и *tail flick* тестом под одговарајућим условима.

Узорковање биолошког материјала:

После завршеног тестирања, животиње су, након анестезије (интраперитонеално примењена комбинација кетамина – 10 mg/kg телесне масе и ксилазина – 5 mg/kg телесне масе), жртвоване декапитацијом на гиљотини. Локалне хистоморфолошке промене су анализиране из узорака коже (20x20x5 mm) узетих на месту лезије, одговарајућом методологијом.

Узорци кичмене мождине су узимани у циљу одређивања промена експресије елемената укључених у систем алгезије на нивоу кичмене мождине, оксидативног статуса и апоптозе изазваних наведеним третманима.

Параметри за (патохистолошке методе и „*real-time PCR*“ метод) квантификацију статуса елемената укључених у систем алгезије на нивоу кичмене мождине: рецептори: опиоидни –  $\mu$  и  $\kappa$ , MT1 и MT2;

Параметри за (спектрофотометријску) квантификацију оксидативног статуса у кичменој мождини:

1. Активност каталазе (U/mg протеина)
2. Активност супероксид дисмутазе (U/mg протеина)
3. Индекс липидне пероксидације (изражен као TBARS, nmol/mg протеина)

Параметри за процену апоптотске активности („*real-time PCR*“ метод)

1. релативна експресија проапоптотских гена – Bax, caspase-3
2. релативна експресија антиапоптотских гена – Bcl-2

### 3.5.Услови за чување животиња током трајања експерименталних протокола

Истраживање је обухватило 56 пацова, *Wistar albino* соја, добијених са Одељења за узгој лабораторијских и експерименталних животиња, Војномедицинска академија Београд. Све животиње су биле мушког пола, старости 10-12 недеља, тежине 250-300г. Животиње су биле смештене у стандардне провидне кавезе од плексигласа, у групама од по четири животиње у сваком кавезу. Током читавог експерименталног поступка животиње су чуване у виваријуму Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, у строго контролисаним условима околине. Температура просторије је константно одржавана на  $23\pm 1$  °C, циклус светлост/мрак је био подешен на 12 сати (светла фаза је трајала од 8h до 20h, интензитет светла је био 120 лукса). Влажност ваздуха је одржавана на  $55\pm 5$  %. Током трајања експеримента пацовима је био омогућен неограничен приступ (*ad libitum*) води и храни. Током боравка у виваријуму било је обезбеђено одсуство свих неповољних сензација (механичких, звучних и светлосних) које би могле да утичу на понашање пацова. Кавези су чишћени два пута недељно, уз минималне манипулације животињама. Сви третмани извођени су током светле фазе.

Све експерименталне процедуре су спроведене у складу са прописаним актима (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes*

86/609/EEC) и ARRIVE упутству.

Истраживање је одобрено од стране Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

### 3.6. Експерименталне групе и третмани

Након једнонедељног периода навикавања, 56 пацова је насумично подељено у седам једнаких група (8 животиња по групи):

1. Контролна група – интактне животиње
2. Група са термичком лезијом – примена електричног грејача (кружница дијаметра 5 mm, дебљине 0.5 mm, 75°C током 15 s) на кожу у висини средњег дела леђа
3. Група са термичком лезијом и применом ХБО – примена електричног грејача уз накнадни седмодневни третман у хипербаричној комори (2.5 atm, 60 минута дневно)
4. Група са термичком лезијом и применом екстракта биљке FU – примена електричног грејача уз накнадни седмодневни третман екстрактом биљке FU (100 mg/kg, орално, свакодневно)
5. Група са термичком лезијом и симултаном применом ХБО и екстракта биљке FU – примена електричног грејача уз накнадну седмодневну примену ХБО (2.5 atm, 60 минута дневно) и екстракта биљке FU (100 mg/kg, орално, свакодневно)
6. Група са применом ХБО – седмодневни третман у хипербаричној комори (2.5 atm, 60 минута дневно)
7. Група са применом екстракта биљке FU – седмодневни третман екстрактом биљке FU (100 mg/kg, орално, свакодневно)

### 3.7. Третман

#### 3.7.1. Експериментални модел термичке повреде коже

Термичка лезија је изазвана код укупно 32 животиње које су потом насумице подељене у четири групе, по осам животиња у свакој групи (група са термичком лезијом, група са термичком лезијом и применом ХБО, група са термичком лезијом и применом екстракта биљке FU, као и група са термичком лезијом и симултаном применом ХБО и екстракта биљке FU). Све животиње су најпре измерене и анестезиране кетамином (10 mg/kg, i.p.) и ксилазином (5 mg /kg, i.p.). Затим је на леђима, на приближно истом нивоу код свих животиња, учињена трихотомија површине апроксимативно 3 cm<sup>2</sup> (1% поливинилпиролидон јод је локално примењен као антисепса). Термичка повреда је изазвана применом електричног грејача. На површину коже је прислоњена чврста алуминијумска шипка, кружног врха, дијаметра око 5mm, дебљине око 0,5mm, која је била електрични погон за одржавање константе температуре од 75°C (81).

Шипка је одржавана у контакту са животињском кожом у висини средњег дела леђа у трајању од 15 секунди. Након изазивања опекотине, све животиње, подељене по групама, су враћене у виваријум где је настављено са планираним протоколом.



Слика 6. Експериментални модел термичке повреде коже



Слика 7. Експериментални модел термичке повреде коженепосредно након изазивања повреде

### 3.7.2. Третман хипербаричном оксигенацијом

Примена хипербаричне оксигенације је спроведена у специјално конструисаној комори за пацове (НІВ-С 300). Експерименталне животиње су третиране током седам узастопних дана, у трајању од 60 минута при притиску од 2,5 АТА (82). По сесији, у комори су боравиле три животиње. Сесије су спровођене у периоду између 13.00 и 20.00. часова, почев од дана

након индукције термичке повреде. Третман је обухватио три групе животиња (група са термичком лезијом и применом ХБО, група са термичком лезијом и симултаном применом ХБО и екстракта биљке FU, као и контролну групу животиња третираних са ХБО али без термичке лезије).

### 3.7.3. Третман екстрактом биљке FU

Почевши од дана након индукције термичке повреде, суплементација антиоксидансима је спроведена применом екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (75) као што је претходно описано (83). Екстракт биљке растворен је у води из славине да би се постигла коначна концентрација од 100 mg/kg. Третман је спроведен током седам узастопних дана у групама са термичком лезијом и применом екстракта биљке FU, групи са термичком лезијом и симултаном применом ХБО и екстракта биљке FU, као и контролној групи са применом екстракта биљке FU, али без термичке лезије.

## 3.8. Бихевиорално тестирање

Тестирање понашања је обављено 24h након завршетка протокола. У 8 сати ујутру, пацови су смештени у просторију за тестирање и остављени су да се аклиматизују на услове боравка 1 сат пре почетка бихевиоралног тестирања. У складу са уобичајеним протоколима за очување мотивационог статуса неопходног за извођење бихевиоралних тестова, животињама је храна привремено укинута 12 сати пре почетка тестирања (од 20:00 часова претходног дана) (84). Процена ноцицепције је урађена тестом вруће плоче (*hot-plate test*) и тестом повлачења репа (*tail flick test*) у одговарајућим условима (85). Да би се уклонили потенцијални ометајући мириси, апарати за оба теста су очишћени водом и етанолом (70%) за сваку животињу. Тестирање је документовано дигиталном видео-камером, а снимљени материјал накнадно је анализиран уз помоћ специјализованог софтвера (*Ethovision software [version XT 10 base] Noldus Information Technology, the Netherlands*), како би се добили нумерички параметри неопходни за квантификацију бихевиоралних манифестација.

### 3.8.1. Тест вруће плоче (*Hot-plate test*)

Тест вруће плоче примењује се за процену времена реакције животиње на термални стимулус. Спроведен је према алгоритму који је претходно дефинисан у Лабораторији за бихевиорална истраживања Факултета медицинских наука у Крагујевцу (86). Апарат се састојао од квадратне металне плоче димензија 43 × 43 cm и стаклених зидова од 30 cm, којима се спречава да животиња побегне, а дозвољава посматрање понашања током тестирања. Свака животиња је стављена у централни део плоче и температура је одржавана на  $51,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Трајање теста је било индивидуално и дефинисано појавом специфичне реакције на термички стимулус у виду лизања задње шапе, трешења задње шапе или одскакивања од тла са сва 4 екстремитета истовремено. Да би се спречиле опекотине, време тестирања је ограничено на 180 секунди. Параметар који се прати у овом тесту је време реакције изражено у секундама. Скраћење времена до реакције експерименталне животиње на термални стимулус карактерисано је као хипералгезијски ефекат, док се продужетак времена до реакције карактерише као хипоалгезија. Непосредно након уочене реакције, животиње су уклањане са плоче и враћане у кавез. Након сваког тестирања апарат је детаљно

очишћен водом и алкохолем, да би се елиминисао мирис претходно тестиране животиње и евентуални утицај на резултате истраживања.

### 3.8.2. Тест повлачења репа (*Tail-flick* тест)

Тест повлачења репа (*tail-flick* test, TFT) је тест ноцицепције у којем се топлотни стимулус високог интензитета усмерава на реп пацова у складу са процедуром коју су описали *Bannon* и сарадници (87). Животиње су постављене на подигнуту решетку и прекривене провидном цеви која је била одговарајуће величине да онемогући кретање. Након постизања температуре од 75°C, у средину репа, са доње стране решетке, је постављен топлотни стимулус и праћена је реакција експерименталне животиње. Неопходан је био довољно јак надражај да се изазове очекивана реакција животиње – махање репом. Мерењем времена од иницирања болног стимулуса до испољеног облика очекиване реакције, резултати овог теста су квантификовани и изражени у секундама. Краће време потребно за реакцију експерименталне животиње на термални стимулус означавало је хипералгезијски ефекат, док је продужено време указивало на хипоалгезију. Одмах по примећеној реакцији, животиње су уклањане са решетке и враћане у кавез. Након сваког тестирања поље је детаљно очишћено водом и алкохолем, да би се елиминисао мирис претходно тестиране животиње и евентуални утицај на резултате истраживања.

### 3.9. Узимање узорка ткива

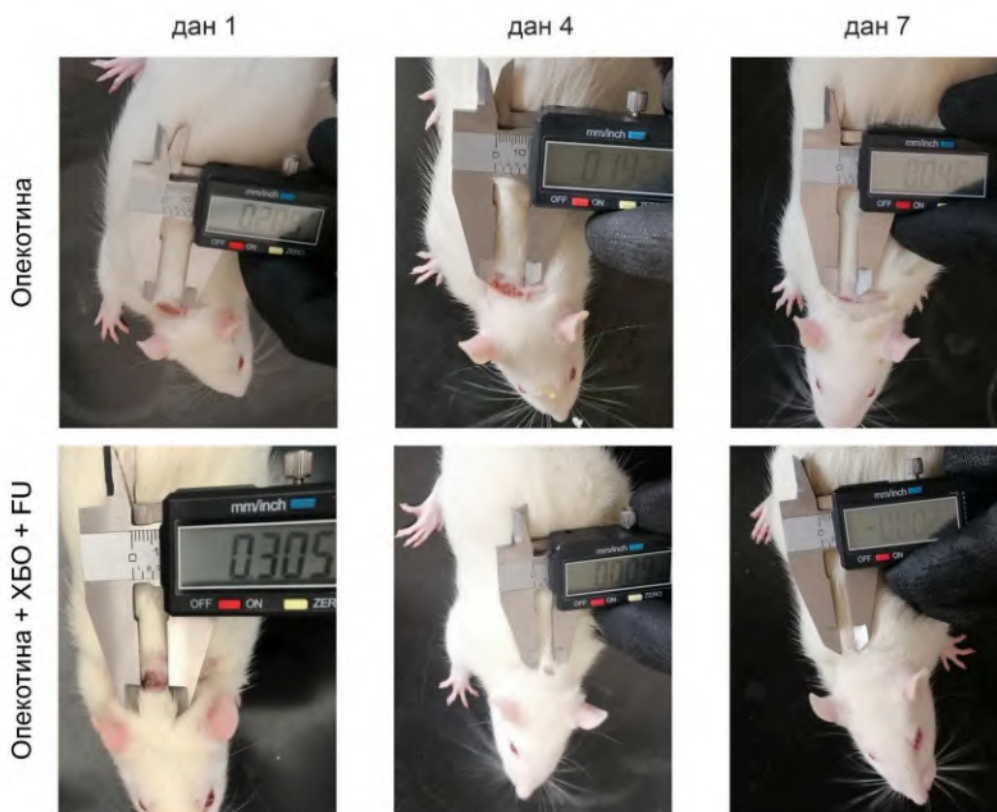
Након завршеног тестирања понашања, животиње су жртвоване ради узимања узорка кичмене мождине и можданог ткива у циљу одређивања промена експресије елемената укључених у систем алгезије на нивоу кичмене мождине, оксидативног статуса и апоптозе. Ради анализирања локалних хистоморфолошких промена неопходно је било изоловати узорке коже опечене регије.

Пацови су најпре анестезирани интраперитонеалном инфилтрацијом комбинације кетамина (10 mg/kg) и ксилазина (5 mg/kg), а потом декапитирани помоћу гиљотине. Кичмена мождина и мозак су пажљиво изоловани и региони од интереса су сецирани. Ране свих животиња су изрезане, остављајући 5 mm маргине нормалне коже око ивица ране и конзервиране у раствору формалина, осим дела узорка који је предвиђен за RTPCR испитивање и анализу параметара оксидативног статуса. Након тога, ови узорци ткива су брзо замрзнати на -80°C ради даље анализе.

### 3.10. Хистолошка анализа

Ране свих животиња су изрезане, остављајући 5 mm маргине нормалне коже око ивица ране, и фиксирани у 10% раствору формалина за хистолошки преглед у трајању од 48 сати. Након обраде ткива, вертикални пресеци сваког узорка су исечени и даље обрађени. Поступак дехидратације узорка је изведен коришћењем ткивног процесора, у серији етанола опадајуће концентрације и ксилола. Узорци су затим укалупљени у парафин. Парафински блокови су исечени на 5-7  $\mu$ m дебљине помоћу микротоме, а затим нанесени на предметна стакла. Узорци ткива су затим третирани и обојени хематоксилин-еозин техником и *Microsirius red* техником за селективно бојење колагених влакана. Након бојења, препарати су анализирани и израђене су фотомикрографије за даљу анализу помоћу

светлосног микроскопа (*Leica DM2500, Wetzlar, Germany*) опремљеног дигиталном камером. За квантитативну анализу колагена, фотомикрографије светлих поља *Picrosirius red* обојених пресека су снимљене при увећању од 20 пута и мерене су позитивно обојене области помоћу софтвера *ImageJ (NIH, Bethesda, MD, SAD)*. Анализа је обављена у ткиву дермиса на 5 видних поља која се не преклапају по пресеку, искључујући крвне судове и фоликуле длаке. Бодовање и хистолошку анализу су извршила два независна посматрача по принципима слепе анализе. Резултати су представљени као средња вредност процента површине или као хистолошки скор, као што је претходно описано (88). Овај систем скорa обухвата најрелевантније хистолошке параметре. Скор епидермиса се односи на карактеристике епидермиса, присуство епителизације и присуство и структурне карактеристике епидермалних папила. Хистолошка оцена за дермис укључује анализу масних ћелија, инфламаторних ћелија и фибробласта, таложење колагена и формирање фоликула длаке. Стопа контракције ране изражена је као процентуална промена првобитне површине ране коришћењем формуле:  $\text{стопа контракције ране} = (\text{првобитна површина ране} - \text{површина ране 9. дана}) / \text{почетна површина ране} \times 100\%$  (88).



Слика 8. Контракција ране у току експерименталног протокола

### 3.10.1. Хистохемијска техника бојења хематоксилином и еозином

Парафински исечци су претходно загрејани у трајању од 45 минута у термостату на +56°C, а затим је обављена депарафинизација потапањем у ксилол. Рехидратација ткива извршена коришћењем опадајућих концентрација етил алкохола по следећем редоследу: 2 пута по 5 минута у апсолутном етил алкохолу, потом 5 минута у 96% етил алкохолу, 5 минута у 90% етил алкохолу, 5 минута у 70% етил алкохолу. Препарати су затим испрани у дестилованој води у трајању од 5 минута.

Препарати су након рехидратације обојени хематоксилином по Mayer-у (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) у трајању од 10 минута, затим испрани дестилованом, а након тога и текућом водом у трајању од 5 минута. Потом су препарати бојени алкохолним раствором еозина (*Sigma Aldrich*) у трајању од 2 минута. По завршетку бојења извршена је дехидратација ткива и просветљење у ксилолу. Процес дехидратације изведен је коришћењем растућих концентрација алкохола и то: 5 минута у 70% етил алкохолу, затим 5 минута у 90% етил алкохолу, 5 минута у 96% етил алкохолу и на крају 2 пута по 5 минута у апсолутном етил алкохолу. По окончању бојења и дехидратације, препарати су просветљени потапањем у мешавини ксилола и апсолутног етил алкохола у односу 1:1 у трајању од 60 секунди, а након тога 2 пута по 60 секунди у чистом ксилолу. Ткивни исечци су прекривени неутралним медијумом D.P.X. (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) и покровним стаклима. Препарати су, након сушења у трајању од 24 сата, анализирани и фотографисани помоћу светлосног микроскопа (*Leica DM2500, Wetzlar, Germany*), опремљеног дигиталном камером.

### 3.10.2. Селективна хистохемијска техника бојења колагена Picrosirius red методом

*Picrosirius red* техника се најчешће користи за селективно бојење и визуелизацију колагена. У микроскопији светлог поља обојени колаген је видљив у облику снопова ружичасто-црвених влакана која могу бити поремећена услед различитих патолошких стања.

*Picrosirius red* метода се користи за бојење колагена I и III. На парафинским исечцима ткива коже урађен је поступак депарафинизације и пратеће рехидратације ткива, испирањем у дестилованој води. Затим се приступило бојењу модификованом техником, без примене Weigert-овог хематоксилина у трајању од 8 минута. Овај приступ је коришћен ради повећања прецизности планиране анализе помоћу рачунарског програма *ImageJ* и добијања релевантнијих резултата. Након рехидратације ткива, исечци су потопљени у раствор *Directred 80* боје у пикринској киселини, где су остављени укупно 60 минута, а потом потопљени у 1% раствор сирћетне киселине. По завршетку ових корака, препарати су испирани раствором 70% етанола, дехидрирани, очишћени и просветљени ксилолом. Резултат бојења су црвено пребојена колагена влакна. Након сушења препарати су анализирани на светлосном микроскопу (*Leica DM2500, Wetzlar, Germany*), опремљеним дигиталном камером. Фотомикрографије светлих поља *Picrosirius red* обојених пресека су снимљене при увећању од 20 пута и мерен је проценат позитивно обојене области коришћењем софтвера *ImageJ*. Анализа је обављена у дермису на 5 поља која се не преклапају по пресеку, искључујући крвне судове и фоликуле длаке. Бодовање и хистолошку анализу су извршила два независна посматрача на слеп начин. Резултати су

представљени као средња вредност процента површине, као што је претходно описано (89.90.91).

### 3.11. Изоловање RNA и реверзна транскрипција у комплементарну DNA

Узорци ткива су изоловани, након чега су замрзнути у течном азоту пре поступка хомогенизације. Укупна RNA (енгл. *Ribonucleic acid*, рибонуклеинска киселина) из узорака је екстрахована коришћењем *TRIzol* реагенса (*Invitrogen, Valtham, MA, USA*) који представља раствор фенола и гуанидин изотиоцианата.

Добијени хомогенат издвојен је у чисте епрувете (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) и инкубиран у трајању од 5 минута, на собној температури. Након тога хомогенат је центрифугиран на температури од +4°C у трајању од 10 минута на 12000 rpm. Укупно 100µl бромхлорпропана (енгл. *1-Bromo-3-chloropropane*, ВСР, *Sigma Aldrich*) додато је супернатанту, после чега су промешани узорци инкубирани на собној температури 15 минута, а потом центрифугирани на температури +4°C у трајању од 20 минута на 12000 rpm. Завршетак центрифугирања праћен је раздвајањем три слоја, а RNA је изолована из горњег, транспарентног слоја.

Садржај овог слоја је пребачен у нове епрувете да би се извршила преципитација RNA уз додаток 500 µl расхлађеног изопропил алкохола. Благо промешани узорци су инкубирани на собној температури 15 минута и потом центрифугирани на +4°C у трајању од 8 минута на 12000 rpm. Затим је учињено двоструко испирање талоба из епрувета са по 1 ml расхлађеног 70% етил алкохола, након чега је сушен на собној температури у трајању од 2 до 5 минута. Вода која садржи нуклеазе (енгл. *Nuclease free water, Applied Biosystems*) употребљена је за разблаживање осушеног талоба. Спектрофотометријским мерењем апсорбанци на 260/280 nm одређена је концентрација и пречишћеност RNA. Мерење је извршено помоћу апарата *Eppendorf® Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany)*.

Реверзна транскрипција је процедура превођења једноланчане RNA у молекул комплементарне DNA (енгл. *Complementary DNA, cDNA*). За процедуру реверзне транскрипције коришћен је *iScript Reverse Transcription Mastermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)*.

Сви кораци у току изолације RNA, а затим и процедура транскрипције у cDNA изведени су на л1ду, осим уколико у протоколима произвођача није другачије наведено.

Реверзна транскрипција је изведена по следећој процедури: 10 µl узорка који садржи 2 µg укупне RNA изоловане из ткива инкубиран је са 10 µl главне мешавине (енгл. *Master mix*).

Главна мешавина сачињена је од: 2 µl пуфера (*RT Buffer*), 0,8 µl dNTP Mix-a, 2 µl хексамера (*Random Hexamer Primer*), 1 µl реверзне транскриптазе (*Multi Scribe™ Reverse Transcriptase*) и 3,2 µl воде слободне нуклеазе (*Nuclease-free H2O*). *Master mix* је додат раствореном узорку RNA, садржај је лагано промешан и затим инкубиран 10 минута на 25°C, а потом још 120 минута на 37°C. Загревањем 5 минута на 85°C заустављена је реакција, а узорци су затим охлађени на +4°C (*Mastercycler® ep realplex, Eppendorf, Hamburg, Germany*). cDNA добијена овим путем, искоришћена је за квантификацију релативне експресије гена.

### 3.12. PCR анализа у реалном времену

За мерење релативне експресије гена од интереса користили смо методу квантитативне ланчане реакције полимеразе (енгл. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR) <sup>1</sup>

Смеша коришћена за реакцију, волумена од 20  $\mu$ l по комори, састојала се од: 2  $\mu$ l узорка cDNA, 10  $\mu$ l главне мешавине (*Power SYBR Green PCR Master Mix (2x)*, Applied Biosystems), 2  $\mu$ l смеше парова прајмера за ген од интереса („forward“ и „reverse“) и 6  $\mu$ l воде која не садржи нуклеазе. Плоче су, најпре, прелепљене оптичком адхезивном фолијом (*Masterclear real-time PCR Film*, Eppendorf), а затим центрифугиране на 3000 rpm у трајању од 60 секунди. По завршеном центрифугирању смештене су у qRT-PCR апарат (*Mastercycler® ep realplex*). За извођење реакције qRT-PCR примењен је протокол: 4 минута на 95°C, потом 50 серија на 95°C у трајању од 15 секунди по серији, а затим на 62°C у трајању од 60 секунди. Неопходно је било подесити услове за извођење криве топљења, да би се одредила специфичност PCR продукта по следећој шеми: 15 секунди на 95°C, 15 секунди на 60°C, 20 минута температурног раста и потом 95°C.

PCR у реалном времену је спроведен коришћењем *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad, SAD)* и прајмера специфичних за mRNA за IL-1b, IL-6, TNF-a, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, Bax, Bcl-2, каспаза-3, фактор раста кератиноцита (енгл. *keratinocyte growth factor*, KGF), епидермални фактор раста (енгл. *epidermal growth factor*, EGF), васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF), фактор раста фибробласта 1 (FGF1), фактор раста фибробласта 2 (FGF2),  $\mu$  опиоидни рецептор (MOR),  $\delta$  опиоидни рецептор (DOR),  $\kappa$  опиоидни рецептор (KOR), рецептори за мелатонин (MT1, MT2), неуропептид Y (NPY) и  $\beta$ -актин као универзални (*housekeeping*) ген (*Invitrogen, Valtham, MA, SAD*). Квантитативне RT-PCR реакције су изведене у *Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Valtham, MA, USA)* и након анализе података израчуната је релативна експресија гена према Livak-у и Schmittgen-у (92).

Сви истраживачки поступци су спроведени у складу са Европском директивом за добробит лабораторијских животиња бр. 86/609/ЕЕС, Принципима добре лабораторијске праксе и смерницама ARRIVE. Све експерименте одобрила је Етичка комисија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Србија.

|                | Forward                      | Reverse                     |
|----------------|------------------------------|-----------------------------|
| $\beta$ -actin | AAGATCCTGACCGAGCGTGG         | CAGCACTGTGTTGGCATAGAGG      |
| Bcl-2          | TGTGGATGACTGACTACCTGAACC     | CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG    |
| Bax            | CGGCGAATTGGAGATGAACTGG       | CTAGCAAAGTAGAAGAGGGCAACC    |
| Caspase-3      | GTGGAAGTACGATGATATGGC        | CGCAAAGTACTGGATGAACC        |
| VEGF           | GATGACGACGACGAAGAC           | CGATGATGCTGACCACAT          |
| FGF1           | ATGGCCGAAGGGGAGATCACAACC     | TTAGTCAGAAGATACCGGGAGGGG    |
| FGF-2          | ACTGCCTCGAGCGCCTGGAGATCA     | CTGGTGCTAACATCAAATACGGCA    |
| EGF            | GGGAGGCTACAAGTGC             | GCAGCTTCCACCAACG            |
| KGF            | CAATCTAGAATTACAGATAGGAGGAGGC | AGAATTCCAAGTCCACAGTCATGATTC |
| TGF- $\beta$ 1 | TGGACCGCAACAACGCCATCTA       | AGGCTCAAATGTAGGGGCAGG       |
| TGF- $\beta$ 3 | TGCCCAACCCAGCTCTAAGCG        | GCCTTTGAATTTGATTTCCA        |
| IL-1 $\beta$   | CACCTCTCAAGCAGAGCACAG        | GGGTTCATGGTGAAGTCAAC        |
| IL-6           | TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC      | TTGGATGGTCTTGGTCTTAGCC      |
| TNF- $\alpha$  | AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC     | TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC     |

|     |                          |                          |
|-----|--------------------------|--------------------------|
| MOR | CATATTCACCCTCTGCAC       | TTACAGGCAGACCGATG        |
| DOR | TTACAGGCAGACCGATG        | ATGTTTGGAAATCGTCCGGTACA  |
| KOR | TCTAGCTATTACTTCTGCATTG   | TGTGTTTCTAACTCTGTTTGT    |
| MT1 | GCCACAGTCTCAAGTATGATAGG  | GGTGACAAAGTTCCTGAAGTC    |
| MT2 | CCTCTACATCAGCCTCATCTGGCT | CTGCGAACATGGTTAGGAAACTGC |
| NPY | TCTGCCTGTCCACCAATG       | CAACGACAACAAGGGAAATGG    |

Табела 1. Листа прајмера корићених у RT-PCR анализи

### 3.13. Одређивање параметара оксидативног стреса

Узорци ткива из подручја опекотинске ране добијени пажљивом дисекцијом су хомогенизовани у раствору фосфатног пуфера (PBS – *Phosphate Buffered Saline*, 10 mM фосфатни пуфер, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH = 7.4), уз претходно дефинисање величине узорка (запремина у ml). Извршено је центрифугирање хомогената на температури од 4°C, у трајању од 15 минута на 4000 обртаја у минути. Добијени супернатанти су употребљени за одређивање параметара оксидативног стреса: активност каталазе (U/mg протеина), активност супероксид-дисмутазе (U/mg протеина) и индекса липидне пероксидације (изражен као концентрација MDA, nmol/mg ткива),

#### 3.13.1. Одређивање активности каталазе (CAT) у ткиву кичмене мождине

Ензим каталаза (CAT) посредује у реакцији разградње токсичног водоник пероксида према следећој једначини:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ .

Мерење активности CAT вршено је колориметријском методом, користећи *Catalase Activity Assay Kit (ab83464, BioVision, Abcam)*. Пре почетка поступка, кит је складиштен на -20°C, у условима без светлости. Припрема реагенса започета је краткотрајним центрифугирањем на малој брзини, по упутству.

Пре употребе, неразблажени пуфер за анализу/пуфер за тестирање активности каталазе су изједначени са собном температуром. Поступком пипетирања, позитивна контрола каталазе, разређена у 500 µL пуфера за анализу/пуфера за тест каталазе, добро је промешана и добијени раствор је подељен на једнаке делове за потребе даљег тока експеримента. Раствор водоник пероксида II/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Standard, неразблажен, подељен је на једнаке делове и држан на леду током употребе. Након тога, пипетирањем је промешана пероксидаза рена (*horseradish peroxidase – HRP*), растворена у 220 µL пуфера за анализу/пуфера за тест каталазе и добијени раствор је издељен на подједнаке сегменте. Неразблажен OxiRed тест/OxiRed тест у диметил сулфоксиду (DMSO) загрејан је на температури од 37°C, у трајању од 1-5 минута ради одмрзавања раствора DMSO-а пре употребе. Неразблажени пуфер за заустављање III/пуфер за заустављање подељени су на једнаке сегменте. Потом смо приступили припремању стандарда, 5 µL приложеног раствора водоник пероксида II/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Standard (0,88 M раствор) разређено је са 215 µL ddH<sub>2</sub>O за укупну количину 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Standard-а. Такође је припремљено и 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Standard-а реконституисањем укупно 50 µL 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Standard-а са 950 µL дупло дестиловане воде (ddH<sub>2</sub>O). Према упутству произвођача, у микротитарској плочи припремљена је стандардна крива разређивања, где је употребљено 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Standard-а. Довољно стандарда је било доступно да се за свако разблаживање спроведу дупла читавања (2 x 90 µL). Сваком делу са стандардном је придодато 10 µL пуфера за заустављање III/пуфера за заустављање. Ткиво кичмене мождине намењено за ове анализе, најпре је испрано у расхлађеном PBS-у. Након

тога додато је 200  $\mu\text{L}$  залеђеног пуфера за анализу. Ручним хомогенизатором ткиво је хомогенизовано, а потом центрифугирано у трајању од 15 минута на температури од  $4^{\circ}\text{C}$  ( $10000 \times g$ ;  $\approx 881,7 \text{ grm}$ ) са циљем уклањања нерастворљивих материјала. Преципитат је издвојен у чисту епрувету и конзервиран на леду. Сви материјали и добијени реагенси су, по инструкцијама произвођача, изједначени са собном температуром. Тестирани су и стандарди, контроле и узорци у дупликату. Одвојеним деловима стандарда придодато је 100  $\mu\text{L}$  реконституваних стандарда (90  $\mu\text{L}$  Standard + 10  $\mu\text{L}$  пуфер за заустављање III/пуфер за заустављање). Узорци су имали 2-78  $\mu\text{L}$  (прилагођени обим на 78  $\mu\text{L}$ /поље пуфером за анализу III/пуфером за тестирање активности каталазе). Узорци *High Control* (НС) такође су имали 2-78  $\mu\text{L}$  (прилагођени обим на 78  $\mu\text{L}$ /поље са пуфером за анализу III/пуфером за тестирање активности каталазе). Позитивна контрола имала је 1-5  $\mu\text{L}$  (прилагођен је обим на 78  $\mu\text{L}$ /поље са пуфером за анализу III/пуфером за тестирање активности каталазе), док је позитивна контрола *High Control* (НС) имала исто 1-5  $\mu\text{L}$  позитивне контроле (обим је прилагођен на 78  $\mu\text{L}$ /поље са пуфером за анализу III/пуфером за тестирање активности каталазе). Укупно 10  $\mu\text{L}$  пуфера за заустављање III/пуфера за заустављање додато је у сваки базен са узорком НС и позитивног контролног НС. Раствор је прво промешан, а потом инкубиран у трајању од 5 минута на температури од  $25^{\circ}\text{C}$ . Циљ инкубације је инхибиција активности каталазе у узорцима НС. Свим узорцима и контролним узорцима додато је још 12  $\mu\text{L}$  свежег раствора 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , што је потом инкубирано у трајању од 30 минута на температури од  $25^{\circ}\text{C}$ . Затим је у свако поље додато још 10  $\mu\text{L}$  пуфера за заустављање III/пуфера за заустављање. Свим узорцима и контролним узорцима додато је 50  $\mu\text{L}$  развојне мешавине, промешано и инкубирано 10 минута на температури од  $25^{\circ}\text{C}$ , без присуства светлости. Потом је, на читачу микротитарске плоче, измерен резултат на таласној дужини OD 570 nm. Вредности добијених сигнала обрнуто су пропорционалне активности каталазе у узорку. Узорци са сигнаlima већим од највишег стандарда, карактеришу се ниским нивоима каталазе, док ниске вредности узорака подразумевају високе количине каталазе. Узорци са високим количинама каталазе били су разблаживани да би се читавања одржала у границама стандардних опсега. За сваки стандард и узорак прочитан је просек дупликата. Најпре је, захваљујући софтверу за читач микротитарске плоче, формирана стандардна крива, а потом је на основу добијених података, одређена једначина тренда. Од свих читавања одузимала се средња вредност апсорпције (Standard #1), што је означено као коригована апсорпција (OD).

1 Израчунавање  $\Delta\text{OD}$  сигнала у узорку је вршено на следећи начин:

$$\Delta\text{OD} = A_{\text{НС}} - A_{\text{Sample}}$$

1 де "НС" означава читавање High Control узорка, а „Sample“ самог испитиваног узорка). Како би била добијена количина (nmol)  $\text{H}_2\text{O}_2$  разложе од стране каталазе током 30-минутне реакције примењен је  $\Delta\text{OD}$  на  $\text{H}_2\text{O}_2$  стандардну. Активност каталазе (nmol/min/mL или mU/mL) у тестним узорцима се израчунавала као:

$$\text{Активност каталазе} = \left( \frac{B}{30 \times V} \right) \times D$$

B = количина  $\text{H}_2\text{O}_2$  у узорку израчуната из стандардне криве (nmol);  
30 = време реакције каталазе изражено у минутима;

V = запремина претретираног узорка додата у реакционо поље (mL);

D = фактор разблажења узорка ако је био додатно разблажен како би се уклопио у читавање стандардне криве).

Једна јединица (1 Unit) активности каталазе представља количину каталазе која ће разложити 1,0  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  у минути при pH 4,5 на 25°C.

### 3.13.2. Колориметријска анализа активности супероксид-дизмутазе (SOD)

Супероксид дисмутаза (SOD) је ензим који убрзава реакцију дизмутације супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) у водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ):



За колориметријско одређивање активности супероксид-дизмутазе користили смо *Superoxide Dismutase Activity Assay Kit (ab65354, BioVision, Abcam)*. Пре почетка поступка, кит је складиштен на -20°C, у условима без светлости.

На самом почетку, бочице су кратко центрифугиране на малој брзини, према упутству произвођача. Најпре се приступило одмрзавању на собној температури и припремању радног раствора хидросолубилног тетразолијума (*Water-soluble tetrazolium - WST*). Радни раствор WST је припремљен разблаживањем WST реагенса II/WST раствора у односу 1:20 са пуфером за тестирање активности SOD. Укупно коришћена количина за целу плочу за испитивање је обухватила 1ml WST реагенса II и 19 ml пуфера за тестирање активности SOD-е. Супероксид-дизмутаза лиофилизован ензим је растворен са 110 $\mu\text{l}$  душло дестиловане воде (ddH<sub>2</sub>O). Такав раствор је издељен у подједнаке делове. Пуфери за SOD тестирање и разређивање су, по изједначавању са собном температуром, издељени у складу са даљим током експеримента. Пре започињања експеримента, узорци ткива коже, који су по изоловању складиштени на -80°C, одмрзнути на леду. Ради уклањања свих еритроцита, количина ткива издвојена за анализу је перфузирана са фосфатно пуферисани физиолошким раствором (*Phosphate-buffered saline - PBS*). По процесу хомогенизације у леденом раствору 0,1M Tris/HCl, pH 7,4, који садржи 0,5% Triton X-100, 5 mM  $\beta$ -ME, 0,1 mg/ml PMSF, ткиво је центрифугирано на 14000 x g ( $\approx$  412,6 gm), на температури од +4°C, у трајању од 5 минута. По завршетку овог процеса сакупљен је преципитат који садржи укупну активност SOD-а из ензима пореклом из цитосола и митохондрија. Сакупљени преципитат је издвојен и пребачен у чисту епрувету и одржаван на леду. Затим је припремљен раствор ензима разређивањем реконституисаног раствора SOD ензима у односу 1:20, коришћењем пуфера за разређивање SOD. Укупно 20  $\mu\text{l}$  радног раствора ензима је припремљено за сваки узорак, као и за Blank 1 реакцију. Уравнотежени су остали материјали и припремљени реагенси на собној температури и промешани. Тестирани су сви стандарди, контроле и узорци у дупликату. Једна јединица дефинисана је као количина SOD-а која, у датим условима тестирања, инхибира активност ксантин оксидазе (енгл. *xanthin oxidase*, XO) за 50%. Потом је додато 200  $\mu\text{l}$  WST-а у сваки базен, 20  $\mu\text{L}$  пуфера за разређивање у Blank 2 и Blank 3, 20  $\mu\text{L}$  радног раствора ензима у сваки базен са узорком и Blank 1, а затим је све промешано и инкубирано током 20 минута на температури од 37°C. По завршетку инкубације, на читачу микротитарске плоче, измерен је резултат (оптичка густина - *Optical Density* - OD440 nm). Узорци са сигнаlima већим од највишег стандарда, додатно су разређени у одговарајућем пуферу и изнова анализирани. На крају је пронађена

концентрација помножена са одговарајућим фактором разблажења. Тестиране су две реплике сваког узорка, из статистичких разлога. Активност ензима супероксид-дизмутазе израчуната је преко следеће једначине:

$$\text{SOD активност (степен инхибиције, \%)} = \frac{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank2}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}}) \times 100}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})}$$

A = апсорпција (OD) од 440nm

### 3.13.3. Колориметријска анализа липидне пероксидације

За извођење ове процедуре коришћен је *Lipid Peroxidation (MDA) Assay kit (ab118970, BioVision, Abcam)*. Пре почетка поступка, кит је складиштен на  $-20^{\circ}\text{C}$ , у условима без светлости, по упуству произвођача.

Материјали неопходни за започињање овог експеримента обухватају пуфер за лизу MDA, раствор фосфоволфрамове киселине и раствор бутил хидрокситолуена (енгл. *butylated hydroxytoluene*, BHT)/BHT (100X). По препоруци произвођача, све супстанце су најпре изједначене са собном температуром, а потом издељене на једнаке делове за даље потребе експеримента.

Developer VII/раствора тиобарбитурне киселине (енгл. *thiobarbituric acid*, TBA) укупне количине 250 mg (једна бочица) растворен је у 7,5 mL глацијалне сирћетне киселине, а коначна запремина је подешена на 25 mL уз помоћ дупло дестиловане воде (ddH<sub>2</sub>O). Да би се све у потпуности растворило, неопходно је било да се раствор детаљно промешати, у условима собне температуре. MDA Standard/MDA Standard (4.17M) је испоручен спреман за употребу, па је са њим подељен на делове у складу са даљим током огледа.

Разблаживањем 10  $\mu\text{L}$  4,17 M MDA стандарда у 107  $\mu\text{L}$  дупло дестиловане воде (ddH<sub>2</sub>O), припремљен је 0,1 M MDA стандард. А затим је разблаживањем 10  $\mu\text{L}$  0,1 M MDA standard-а у 490  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O добијено 2 mM MDA стандарда. Користећи 2 mM MDA стандард, припремљена је стандардна крива разблаживања према табели микротитарске плоче.

Узорци ткива су најпре испрани у хладном PBS-у, а потом хомогенизовани у 30  $\mu\text{L}$  претходно припремљеног раствора лизе (пуфер + BHT). Хомогенизација је обављена ручним хомогенизатором на леду, након чега је извршено центрифугирање узорака на 13000 x g, 10 минута, са циљем уклањања нерастворљивог материјала. По завршетку ове процедуре, сакупљен је преципитат. У дубликату су тестирани сви стандарди, контроле и узорци.

Потом је у базен са 200  $\mu\text{L}$  стандарда и 200  $\mu\text{L}$  узорка, додато је 600  $\mu\text{L}$  реагенса Developer VII/TBA. Извршена је инкубација у трајању од 60 минута, на температури од  $95^{\circ}\text{C}$ , а затим је током 10 минута хлађено у леденој купки, до изједначавања са собном температуром. У даљем току експеримента 200  $\mu\text{L}$  реакционе смесе која је садржала MDA-TBA адукта, подељено је у микротитарску плочу од 96 поља, где је одмах мерен апсорпција (на читачу микротитарске плоче, OD 532 nm). Узорци са сигнаlima већим од највишег стандарда, додатно су разређени у одговарајућем пуферу и изнова анализирани. На крају је пронађена концентрација помножена са одговарајућим фактором разблажења.

Израчуната је просечна вредност дубликата за сваки стандард и узорак, а одузета је слепа вредност стандарда #1 од свих стандардних читавања и читавања узорка (коригована апсорпција).

На основу добијених података, по конструисању криве уз помоћ софтвера за читач микротитарске плоче, приступило се одређивању једначине тренда. Очитавање OD узорка

кориговано је у односу на стандардну криву са циљем добијања количине <sup>1</sup>MDA у узорцима.

Концентрација MDA у узорцима се рачунала уз помоћ једначине:

$$\text{MDA концентрација} = \left( \frac{A}{mg} \right) \times 4^* \times D = \frac{\text{nmol}}{\text{mg}}$$

A = Количина MDA у узорку израчуната из стандардне криве (nmol);

mg = Почетна количина ткива која је коришћена;

4\* = Корекција за коришћење 200  $\mu$ L од 800  $\mu$ L реакционе смесе;

D = Фактор разблажења узорка, ако је узорак био разблажен, да би се уклопио у опсег стандардне криве.

### 3.14. Статистичка анализа

#### 3.14.1 Снага студије и величина узорка

Пројекција узорка је изведена на основу претходно публикованих резултата из сличног истраживања у коме су испитивани ефекти ХБО на апоптозу габаергичких неурона у кичменој мождини након повреде (93). Средња вредност величине овог параметра након повреде је била  $45 \pm 2\%$ , док је у групи са ХБО третманом након повреде била знатно мања  $19 \pm 3\%$  од укупног броја габаергичких неурона. На основу тога, претпоставља се да ће у овој студији применом ХБО доћи до смањења овог параметра у експерименталним групама за најмање око 60%. Коришћењем програма G\*Power 3 (94) за t-тест два независна узорка ( $\alpha = 0,05$ , снага 0,8, однос узорака 1:1) израчунато је да је за сваку групу потребно по 4 животиње. Наведени број животиња је повећан на 8 по експерименталној групи сходно методолошким препорукама за корекцију претпостављене непараметарске дистрибуције података (95), такође узимајући у обзир могући губитак животиња током третмана, које неће бити обухваћене завршном анализом. Имајући у виду да ће у истраживању бити обухваћено седам група, укупан узорак је утврђен на 56 експерименталних животиња.

#### 3.14.2 Статистичка обрада података

Статистичка анализа је извршена помоћу статистичког пакета SPSS верзије 20.0 (IBM SPSS Statistics 20). Резултати су изражени као средње вредности  $\pm$  стандардне грешке средње вредности (S.E.M.). Параметри су првобитно подвргнути Levene-овом тесту за хомогеност варијансе и Shapiro–Wilk-овом тесту нормалности. Једносмерна ANOVA, праћена Bonferroni тестом, коришћена је за поређење између група. Значајност је одређена на  $p < 0,05$  за све тестове. За анализу односа између добијених параметара коришћена је једноставна линеарна регресија и Pearson-ов коефицијент корелације.

## **4. Резултати**

#### 4.1. Морфолошки и хистолошки параметри околине ране и околине

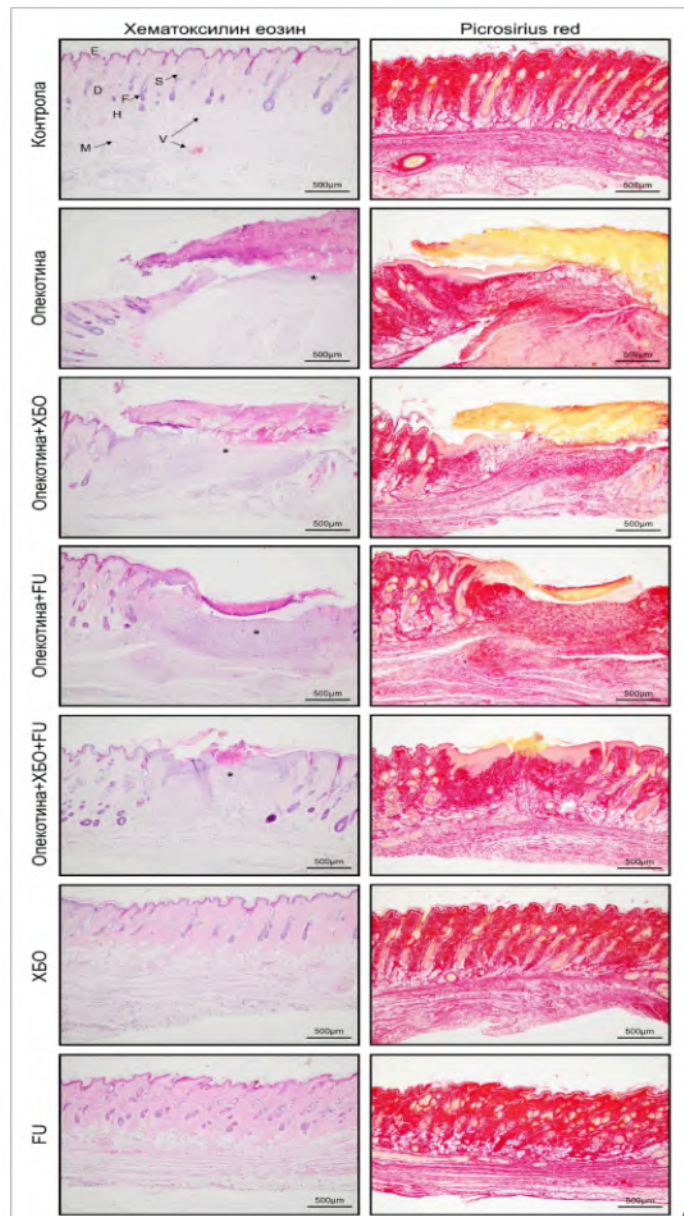
Осам дана након извршене термичке повреде коже анализирали смо морфолошке и хистолошке параметре подручја ране.

##### 4.1.1. Хистолошки скор за епидермис

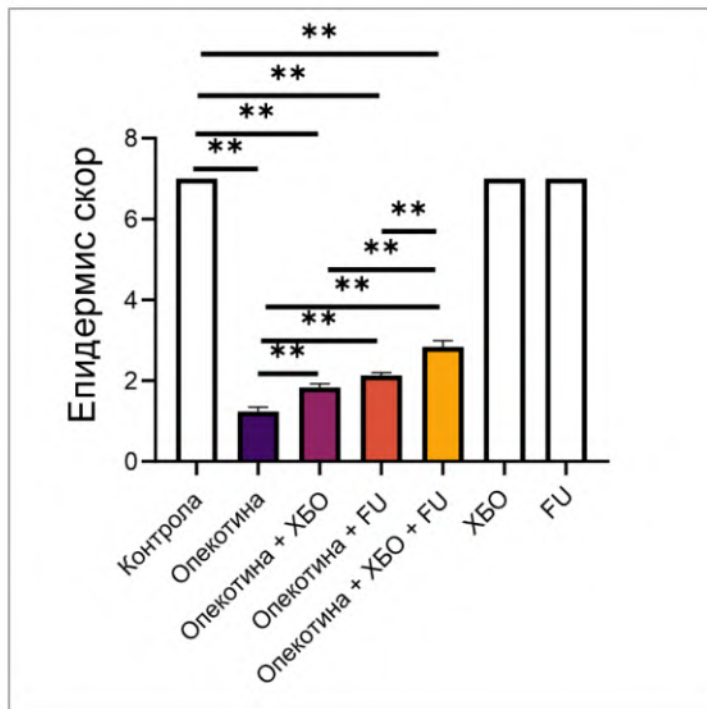
Хистолошки скор за епидермис представља хистолошку оцену зарастања епидермиса. Формира се на основу карактеристика крусти које могу бити од лабаво прикачених до потпуно одсутних, присуства епителизације која може бити у потпуности одсутна па све до потпуно комплетираног процеса и присуства и структурних карактеристика епидермалних папила. Хистолошки епидермис скор означен је бројевима од 0 до 7.

Скор 0 се карактерише лабаво причвршћеним крустама, потпуним одсуством епителизације и одсуством епидермалних папила. Чврсто причвршћене крусте, минимална епителизација, уз одсуство епидермалних папила означавају скор 1. Следећа два стадијума, скор 2 и 3, од претходног се разликују само по степену епителизације, где у скору 2 имамо благу, а у скору 3 умерену епителизацију, док су крусте у оба стадијума чврсто причвршћене, а епидермалне папиле одсутне. Разлика је нешто приметнија у скору 4, у коме нема крусти, епителизација је такође умерена, а епидермалне папиле одсутне. Скор 5 се од скор 4 разликује по значајнијем степену процеса епителизације, док су крусте и епидермалне папиле и на овом нивоу одсутни. Једнаки параметри карактеришу и скор 6, с тим што је овде процес епителизације комплетан. Скор 7, уједно и крајњи стадијум зарастања епидермиса, одликује се одсуством крусти, комплетираним процесом епителизације и, за разлику од свих других стадијума, присуством епидермалних папила.

Резултати нашег истраживања показали су значајно нижи хистолошки скор епидермиса у свим експерименталним групама у поређењу са контролном (Слика 9-10,  $F = 103,558$ ). Добијене вредности у групи третираној ХБО биле су значајно веће у односу на групу са опекотинама. Такође вредности у групи третираној екстрактом биљке FU показале су значајну разлику у односу на вредности групе са опекотинама. Група са опекотинама је имала значајно ниже вредности хистолошког епидермис скор 7 и у поређењу са групом третираном комбинацијом ХБО и екстракта биљке FU. Код третираних група, треба нагласити да је третман са екстрактом FU у комбинацији са ХБО показао значајно већу стопу реепителизације у односу на само FU или ХБО (Слика 9-10).



Слика 9. Морфологија ткива коже након експерименталног протокола. Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака обојених ХЕ (хематоксилин-еозин) техником (леви панел) и исечака обојених Picosirius red техником (панел десно) (увеличање x20, размера=500µm).



Слика 10. Епидермис скор (средња вредност ± SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

#### 4.1.2. Хистолошки скор за дермис

Хистолошко градирање процеса зарастања дермиса процењено је на основу више параметара укључених у процес зацељивања. Скор је формиран у односу на присуство запаљенских ћелија, фибробласта, адипозних ћелија, стање депозиције колагена и формирања фоликула длаке. Као и код хистолошког скор за епидермис, скор дермиса оцењен је од 0 до 7.

Скор 0 карактерише се присуством велике количине адипозних ћелија и неколико запаљенских ћелија, уз одсуство фибробласта, депозиције колагена и без формирања фоликула длаке.

Скор 1 има средњу количину адипозних и инфламаторних ћелија и неколико фибробластних ћелија. Нема депозиције колагена, као ни фоликула длаке.

Скор 2 се разликује по нешто мањој количини адипозних ћелија, којих има неколико, као и фибробласта. Инфламаторне ћелије су, као и у претходном скору, присутне у средњој количини, док депозиције колагена и формирања фоликула длаке још увек нема.

У скору 3 повећана је количина запаљенских ћелија, којих има у великом броју. Остали параметри су непромењени у односу на скор 2.

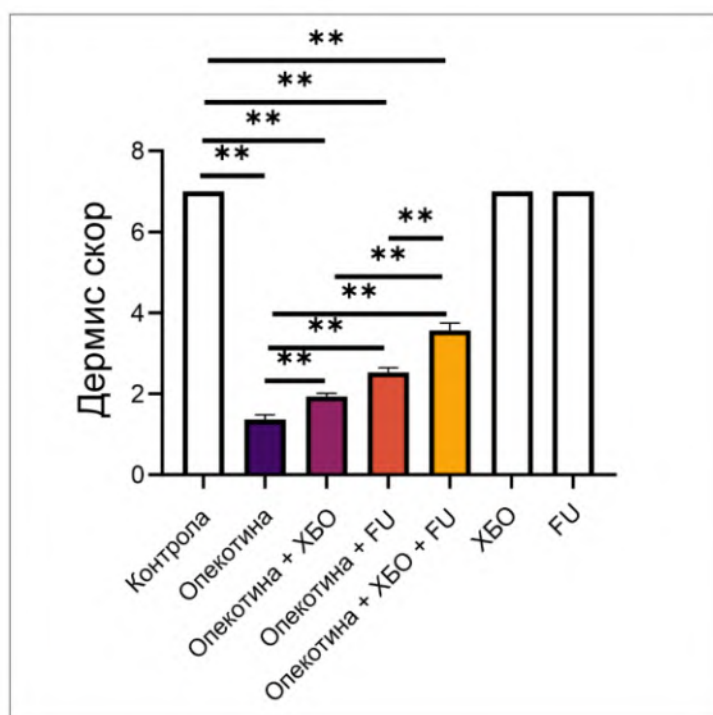
Блага депозиција колагена појављује се у скору 4, уз велики број инфламаторних

ћелија, средњу количину фибробласта и неколико адипозних ћелија. Фоликул длаке није формиран.

Скор 5 се одликује одсуством адипозних ћелија, средњом количином ћелија инфламације, великом концентрацијом фибробласта, умереном депозицијом колагена, без формирања фоликула длаке.

Прогресијом ка следећем стадијуму, 6. по реду, смањује се број запаљенских ћелија, док остали параметри остају непромењени.

Последњи ниво у градирању зарастања дермиса, скор 7, одликује се одсуством адипозних ћелија, присуством тек неколико инфламаторних ћелија, средње концентрације фибробласта и значајном депозицијом колагена. За разлику од свих претходних оцена, могу се приметити и незрели фоликули длаке (96).



Слика 11. Хистолошки скор за дермис (средња вредност ± SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Анализирањем зарастања дермиса, добијени резултати показали су значајно веће вредности у групи третираној ХБО у односу на групу са опекотинама (Слика 11,  $F = 699,146$ ). И у групи третираној екстрактом биљке FU показана је статистички значајна разлика у односу на групу са опекотинама. Најизраженији ефекат је постигнут комбинованим протоколом лечења FU и ХБО. Вредности хистолошког скорa дермиса биле су значајно веће у групи са комбинованим протоколом лечења у поређењу са групом са опекотинама. Такође, примећена је значајна разлика у вредности резултата у групи третираној симултаном применом ХБО и екстрактом биљке у односу на групе третиране само екстрактом FU или ХБО (Слика 11).

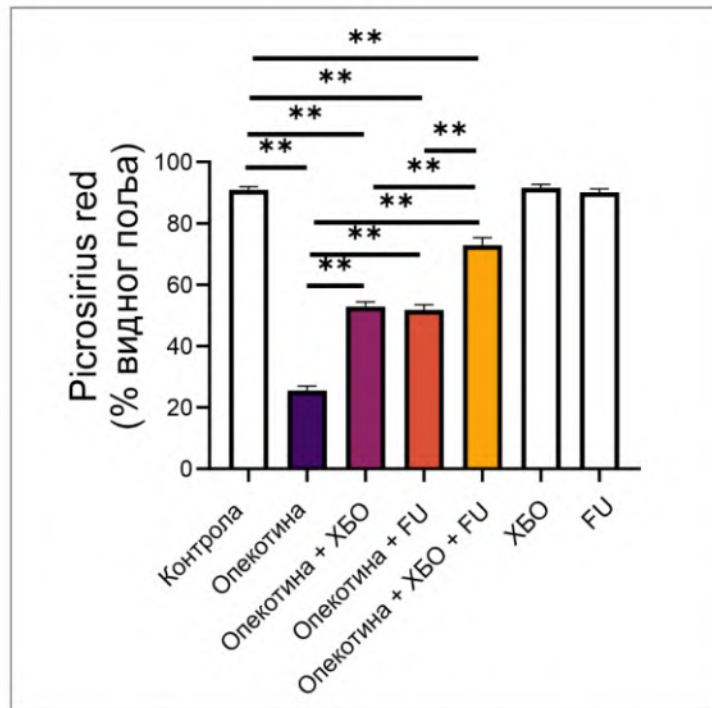
#### 4.1.3. Формирање и таложeње колагена

Један од главних параметара поновног успостављања дермалне архитектуре је формирање и таложeње колагених влакана, као и њихов распоред и архитектура.

Фибробласти, ћелије које имају изузетно важну улогу у процесу зарастања рана, потичу из недиференцираних мезенхимских ћелија, из околног везивног ткива. Обично се појављују око трећег, четвртог дана након повреде, под утицајем цитокина које ослобађају тромбоцити и макрофаги. Фибробласти продукују фибронектин и протеогликane и таложe нови колаген. Зрели колаген типа I замењује рани колаген типа III. Како се садржај колагена у рани повећава, рана јача и зацељује (97).

Процес формирања колагена, испитан је коришћењем селективне хистохемијске технике Picosirius red, методе којом се омогућава визуализација укупног колагена, као и диференцијација различитих типова колагена и процена његове расподеле у ткивима.

Добијени резултати су показали да, слично скору дермиса, садржај колагена је био значајно већи у свим третираним групама у поређењу са групом са опекотинама (Слика 9, слика 12,  $F = 270,531$ ). Даље, садржај колагена био је значајно мањи у групи третираној само ХБО у односу на групу третирану комбинацијом екстракта FU и ХБО. Исто тако, група третирана само применом екстракта FU показала је сигнификантно нижи садржај колагена у поређењу са групом третираном и ХБО и екстрактом FU (Слика 12). У анализираним хистолошким параметрима нису уочене значајне разлике између група третираних само екстрактом FU или ХБО протоколом.



Слика 12. **1** аализа фотомикрографија препарата обојених Picrosirius red селективном хистохемијском техником (средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

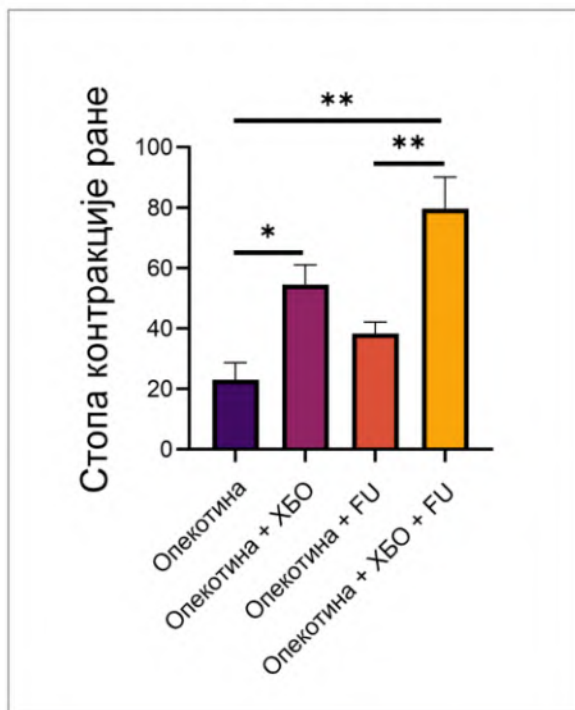
#### 4.2. Макроскопске промене у области ране

Макроскопске промене у области ране су представљене као стопа контракције ране (Слика 13,  $F = 11,943$ ).

Контракција је процес којим се смањује промер ране померањем дермиса и епидермиса центрипетално, што настаје због контракције миофибробласта у гранулатионом ткиву. Пропорција ране која зараста контракцијом варира у зависности од својстава околне коже. Контракција ране је већа на деловима где је кожа опуштена у односу на оне делове где је кожа чврсто затегнута.

Стопа контракције ране изражена је као процентуална промена првобитне површине ране користећи следећу формулу: стопа контракције ране =  $(\text{првобитна површина ране} - \text{површина ране 9. дана}) / \text{почетна површина ране} \times 100\%$  (97).

Анализа овог параметра показала је значајну разлику код групе третиране комбинованим третманом са екстрактом FU и ХБО у поређењу са групом са опекотинама. Могло се уочити и да примена само ХБО показује позитивне ефекте, посматрајући групу са опекотинама. Насупрот томе, није примећена значајна разлика у FU групи у поређењу са групом са опекотинама (Слика 13). Стопа контракције ране била је значајно већа у комбинованој групи за лечење FU и ХБО у поређењу са FU групом. Значајних разлика у комбинованој групи за лечење FU и ХБО у поређењу са групом ХБО није било (Слика 13).



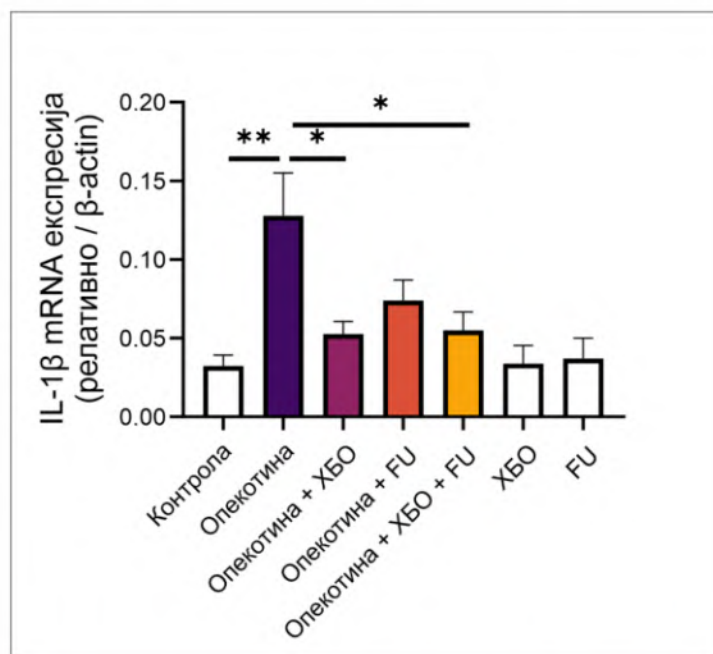
Слика 13. Стопа контракције ране (средња вредност ± SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

#### 4.3. Релативна експресија гена за проинфламаторне цитокине у подручју ране

Анализирана је релативна експресија гена за проинфламаторне цитокине у подручју ране. Улога проинфламаторних цитокина је од изузетног значаја како због регулисања самог процеса инфламације, тако и у процесу зарастања.

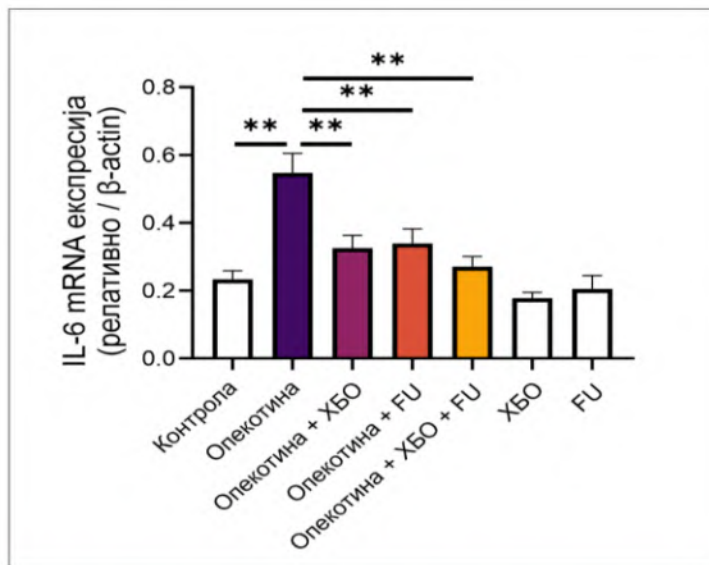
Почетни инфламаторни одговор је неопходан за адекватно зарастање ране. Улога PMNs у одбрани од микороорганизама, привлачење медијатора који учествују у фагоцитози фибрина и фибринских остатака, умногоме доприноси овом процесу. Међутим, дуготрајност упалног процеса резултује контраефектом и инхибиторно делује на процесе зарастања. Иако је почетни упални одговор неопходан за започињање фазе репарације, дуготрајна инфламаторна реакција са упорним укључивањем PMNs може довести до деструкције ћелија и измењеног састава екстрацелуларног матрикса, што може резултовати неуспешном епителизацијом.

Анализом добијених резултата показано је да је релативна експресија IL-1 $\beta$  гена била значајно већа у групи са опекотинама у поређењу са контролном групом. Такође, релативна експресија овог гена била је у значајно већој мери испољена у групи са опекотинама у односу на групу третирану ХБО. У поређењу групе са опекотинама и групе третиране екстрактом биљке FU, међутим, није запажена сигнификантна разлика у релативној експресији гена за IL-1 $\beta$ . Значајно мања релативна експресија поменутог гена, регистрована је у групи са комбинованим третманом ХБО и FU у односу на групу са опекотинама. (Слика 14, F = 5477).

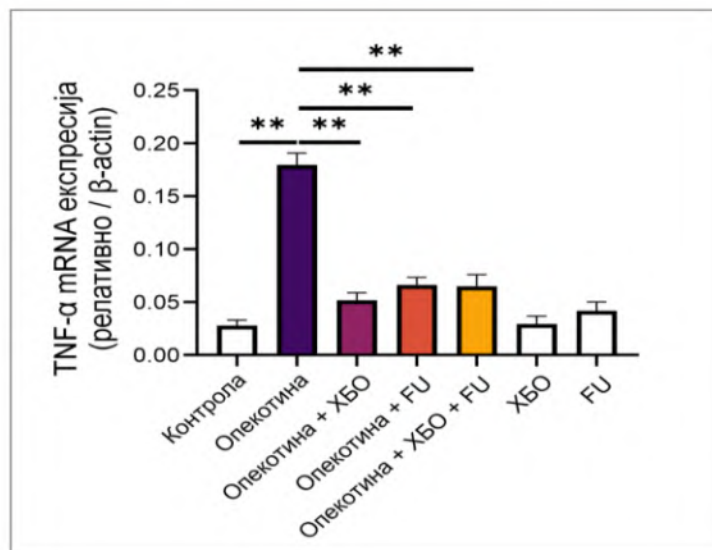


**Слика 14. Релативна експресија гена за проинфламаторне цитокине у подручју ране.**  
(средња вредност  $\pm$  SE, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01)

Релативна експресија проинфламаторних IL-6 и TNF- $\alpha$  гена била је значајно већа у групи са опекотинама у односу на контролну групу. Слично томе, значајно већа релативна експресија ових гена регистрована је у групи са опекотинама у односу на групу третирану ХБО. Група третирана екстрактом биљке FU показала је значајно мању релативну експресију ових гена у поређењу са групом са опекотинама. Исти резултат могао се приметити и поредећи групу са комбинованим третманом ХБО и екстракта FU са групом са опекотинама у којој је експресија наведених гена била значајно већа. Посматрајући третиране групе, није се могла приметити значајна разлика између групе третиране ХБО и групе третиране FU екстрактом, као ни између групе са комбинованим третманом и група са појединачним третманима. (Слика15-16, F = 10,887, F = 38,614, респективно).



15. Релативна експресија гена за проинфламаторне цитокине у подручју ране. (средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01)



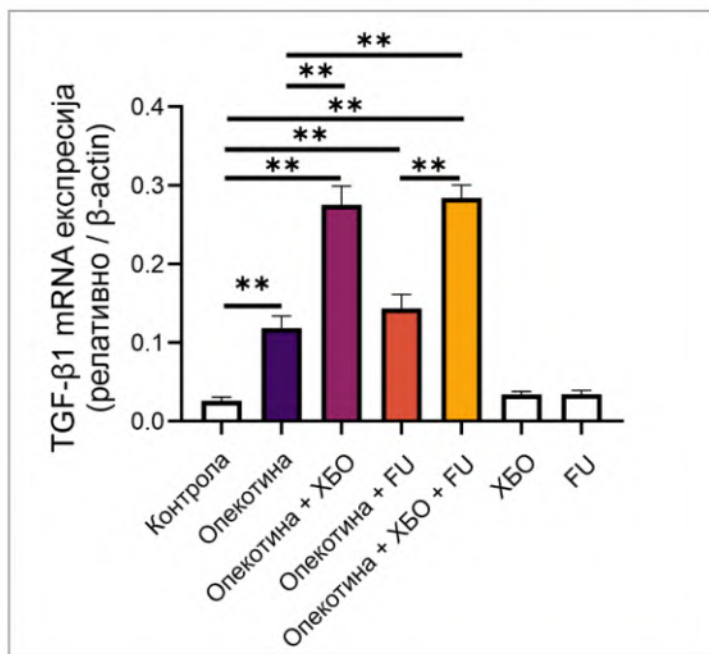
16. Релативна експресија гена за проинфламаторне цитокине у подручју ране. (средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01)

Даље је анализирана **експресија гена за** TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 3, који су цитокини укључени у зарастање рана и регенерацију ткива.

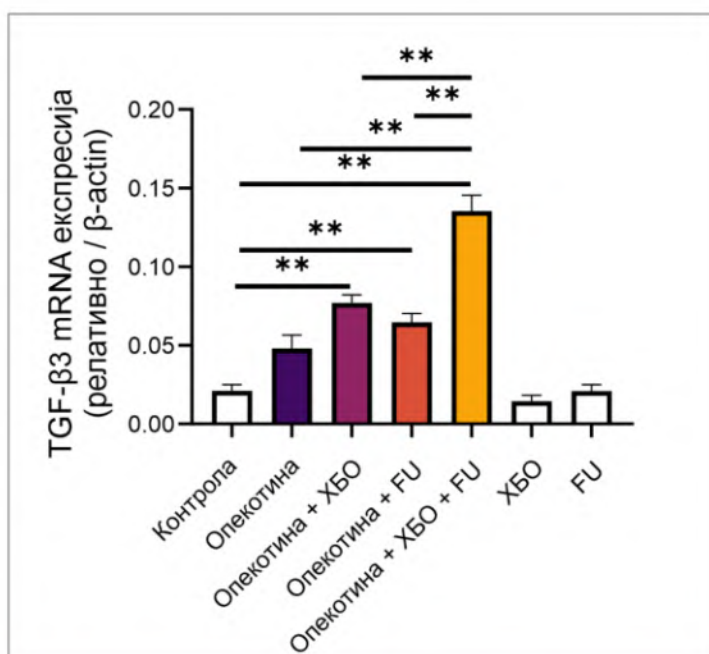
Наши резултати су показали да је експресија гена TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 3 била значајно већа у групи третираној ХБО у поређењу са контролном. Група третирана екстрактом биљке FU такође је показала значајно већу експресију гена TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 3 у односу на контролну групу. Ови гени у значајно већој мери били су експримирани и у групи са комбинованим третманом ХБО и FU поређећи са контролом. (Слика17-18, F = 60,922, F = 46,867, респективно).

У поређењу са групом са опекотинама, експресија TGF- $\beta$ 1 гена је била значајно већа у групи третираној ХБО. Исто тако, експресија TGF- $\beta$ 1 гена је била сигнификантно већа у групи третираној комбинованом терапијом ХБО и FU у односу на групу са опекотинама. Значајне разлике у експресији TGF- $\beta$ 1 гена у поређењу групе са опекотинама и групе третиране екстрактом FU, није било. (Слика 17).

Релативна експресија гена TGF- $\beta$ 3 била је значајно већа у групи третираној комбинованим ХБО и FU третманом, у поређењу са опекотинама. У групи третираној комбинованим третманом ХБО и FU примећена је и значајно већа експресија TGF- $\beta$ 3 гена према експресији запаженој у групама третираним само ХБО или само FU. (Слика 18).



**Слика 17.** Релативна експресија гена за цитокине у подручју ране.  
(средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )



**Слика 18. Релативна експресија гена за цитокине у подручју ране.**  
(средња вредност ± SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

#### 4.4. Релативна експресија гена повезаних са апоптозом у области ране

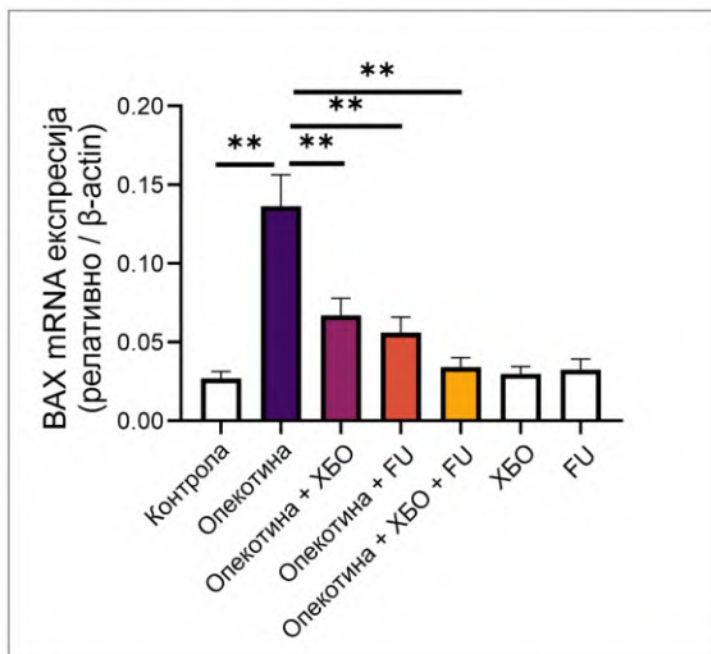
Апоптоза, која се може дефинисати као програмирана ћелијска смрт, представља важан процес у почетној фази опекотина и доминантан је узрок изумирања ћелија у зони стазе, која је главни терапијски циљ. Константна апоптоза у зони стазе доприноси губитку ткива и пропадању структура, па се решавање овог процеса намеће као један од главних циљева у току лечења.

У овом делу истраживања анализирана је експресија гена везаних за апоптозу, про-апоптотски Вах и каспаза-3, као и анти-апоптотски Bcl-2.

Анализа релативне експресије гена везаних за апоптозу показала је да је експресија про-апоптотског Вах била значајно већа у групи са опекотинама у односу на контролну групу. У поређењу са групом третираном ХБО, примећена је значајно већа релативна експресија Вах гена. Исти резултат је добијен и у односу групе третиране FU, где је у значајно мањој мери експримиран овај ген. Комбиновано третирање ХБО и FU резултирало је, такође, значајно већом релативном експресијом Вах гена према релативној експресији у групи са опекотинама.

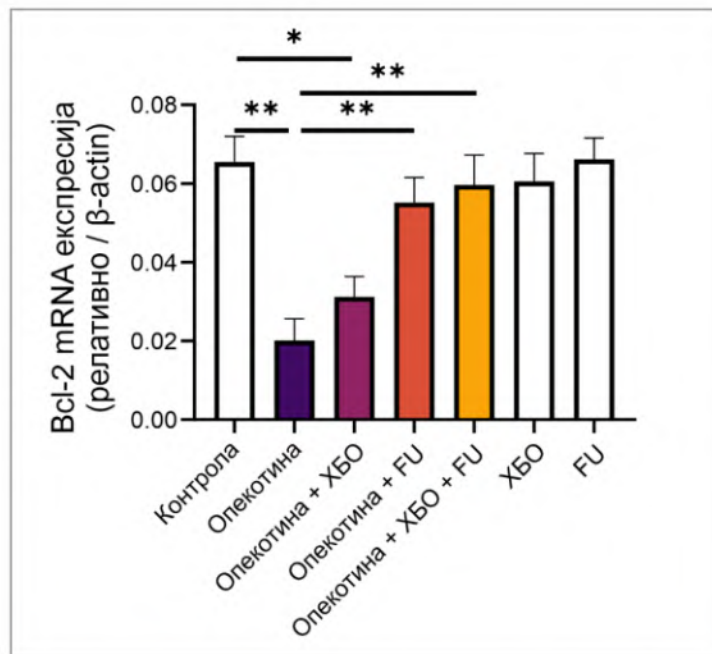
Група третирана са ХБО није показала значајнију разлику у генској експресији у односу на групу третирану екстрактом биљке FU. Слично томе, група третирана комбинацијом ХБО и FU се није значајније разликовала од групе третиране само ХБО. Ни у групи третираној само екстрактом FU није констатована сигнификантна разлика у експресији Вах гена у поређењу са групом која је третирана комбинованом применом ХБО

и FU екстракта. (Слика 19, F = 14,432).



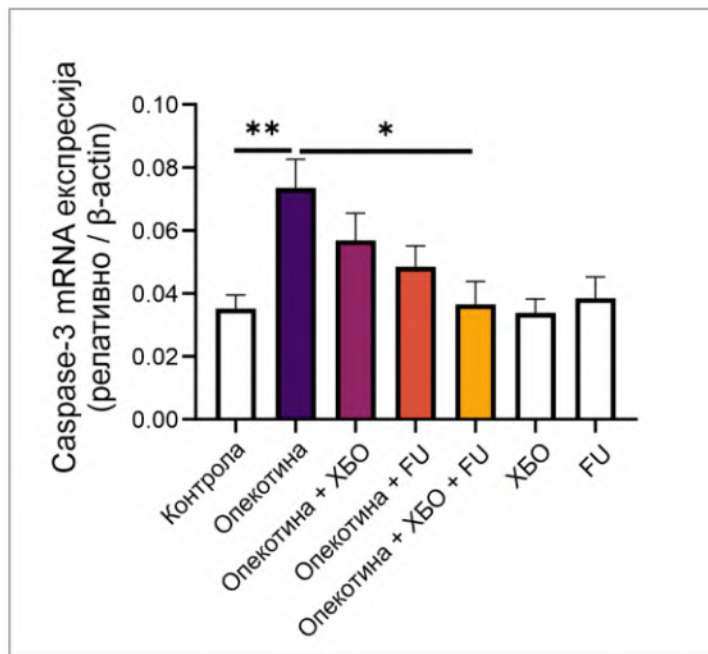
**Слика 19. Релативна експресија генаповезаних са апоптозом у области ране**  
(средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01)

Потом је анализирана релативна експресија анти-апоптотског гена Bcl-2. <sup>1</sup> Резултати су показали да је релативна експресија Bcl-2 гена била значајно нижа у групи са опекотинама у поређењу са контролним групама. Релативна експресија поменутог гена била је значајно нижа у групи са опекотинама у односу на групу третирану екстрактом биљке FU. Група третирана комбинацијом ХБО и FU екстракта показала је значајно већу експресију гена од групе са опекотинама. Такође, експресија је била значајно нижа у групи леченој само ХБО у поређењу са контролном (Слика 20, F = 8248).



**Слика 20. Релативна експресија гена повезаних са апоптозом у области ране**  
(средња вредност ± SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Релативна експресија заједничког иницијатора ћелијске смрти апоптозом, гена за каспазу-3, била је значајно већа у групи са опекотинама у поређењу са контролним групама. Значајно већа релативна експресија гена каспаза-3 регистрована је у групи са опекотинама и у поређењу са групом са комбинованим третманом ХБО и FU. Није примећена значајна разлика у експресији овог гена у поређењу групе са опекотинама и група третираних изолованим третманом ХБО и FU. Слично томе, између групе третиране ХБО и групе третиране FU екстрактом, није примећена значајнија разлика у релативној експресији гена каспаза-3. (Слика 21,  $F = 4469$ ).

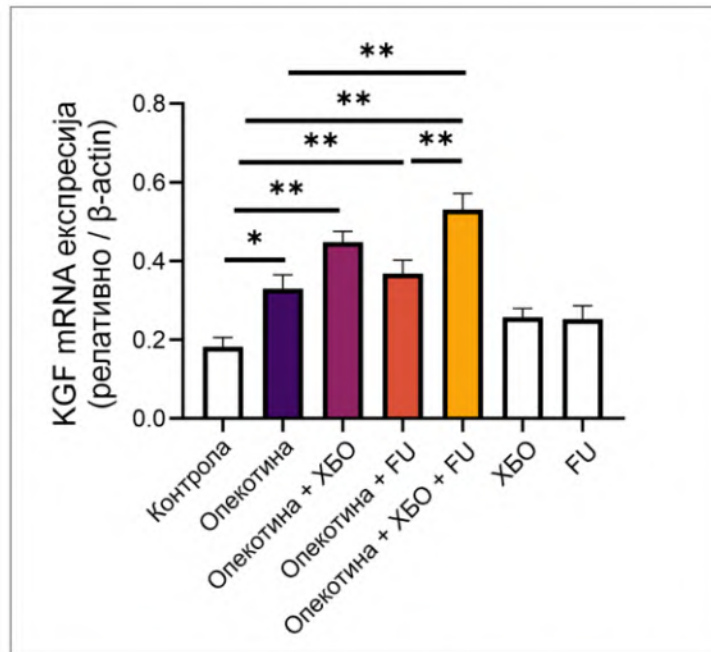


**Слика 21. Релативна експресија гена повезаних са апоптозом у области ране**  
(средња вредност ± SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

#### 4.5. Релативна експресија гена за факторе раста у подручју ране

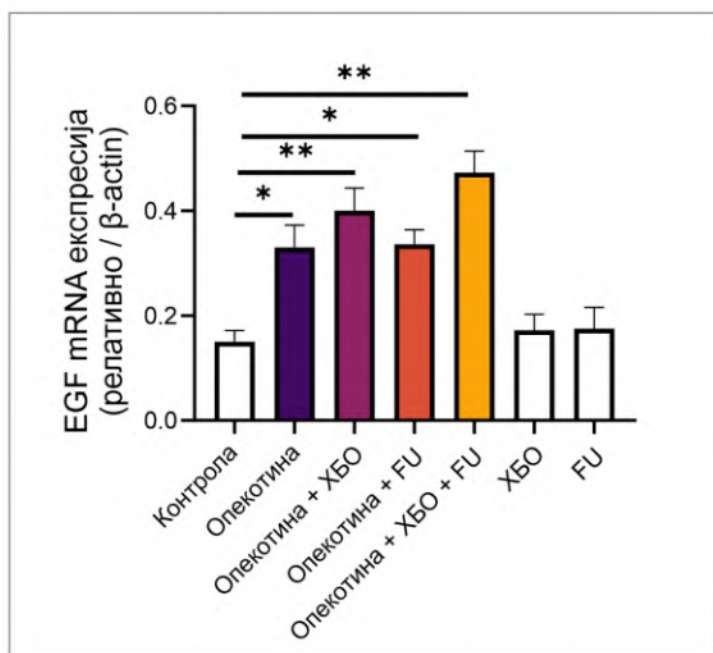
Истражена је и релативна експресија гена фактора раста релевантних за зарастање термичких рана.

Релативна експресија KGF гена је била значајно већа у групи третираној ХБО у односу на контролну. Исто тако, у групи третираној FU екстрактом, релативна експресија гена KGF је била у значајно већој мери испољена у поређењу са контролном. Исти резултат показало је и поређење групе са комбинованим третманом ХБО и FU и контролне групе, где је релативна експресија гена била у значајно већој мери већа код третиране групе. У групи која је примала комбиновани третман ХБО и FU, релативна експресија је била значајно већа у поређењу са групом FU. Релативна експресија KGF гена била је значајно већа и поредећи групу третирану комбинацијом ХБО и FU са групом са опекотинама. Статистички значајна разлика, међутим, није уочена у поређењу групе са симултаном применом ХБО и екстракта FU са групом која је третирана само ХБО (Слика 22,  $F = 14,882$ ).



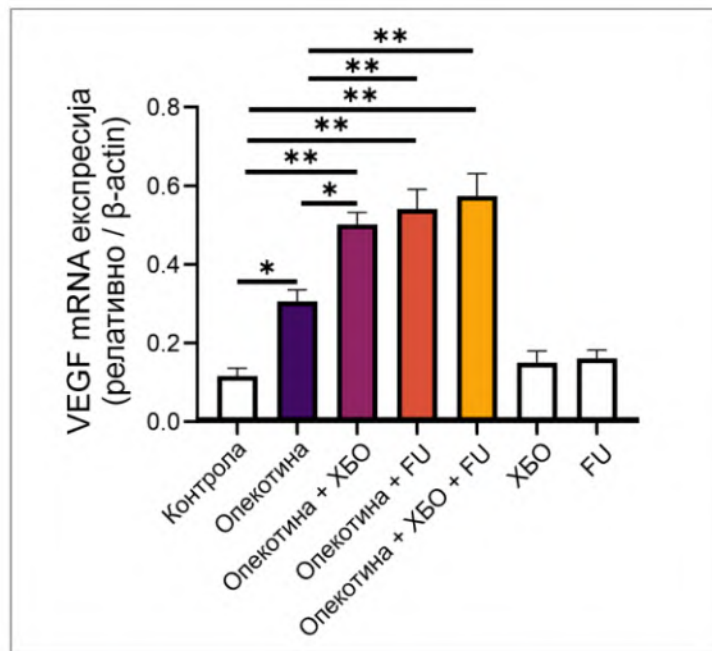
**Слика 22. Релативна експресија гена за факторе раста у подручју ране**  
(средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Релативна експресија EGF гена је била значајно већа у групи са опекотинама у поређењу са здравом контролом. Значајно већа релативна експресија EGF примећена је и у групи третираној ХБО у односу на здраву контролу. Група третирана екстрактом биљке FU такође је показала већу релативну експресију овог гена од групе са здравом контролом. На крају, група третирана применом ХБО и екстракта биљке FU имала је у значајно већој мери експримиран EGF ген поредећи са здравом контролом. У поређењу групе третиране ХБО и групе са опекотинама није уочена значајна разлика у експресији EGF гена. Релативна експресија EGF гена се није значајније разликовала ни у поређењу групе са опекотинама и групе са комбинованим ХБО и FU третманом. Исто тако, није било статистички значајне разлике у експресији овог гена ни у односу групе третиране само FU екстрактом и групе са опекотинама. Такође, није било значајне разлике између третираних група међу собом (слика 23,  $F = 12,217$ ).



Слика 23. Релативна експресија гена за факторе раста у подручју ране (средња вредност ± SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

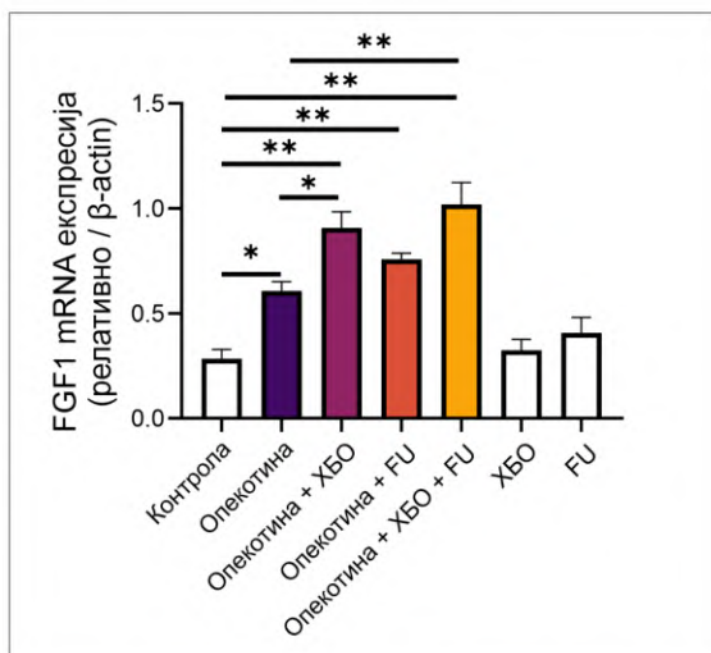
Следећи параметар који је испитиван је релативна експресија VEGF гена, која је била значајно већа у групи са опекотинама у поређењу са здравом контролом. Анализирајући групу третирану са ХБО утврђено је да је релативна експресија овог гена у значајно већој мери експримирана у односу на здраву контролу. Значајно већа експресија VEGF гена примећена је и у групи која је примала екстракт FU поредећи је са здравом контролом. Комбиновани третман ХБО и FU показао је, исто тако, већу релативну експресију VEGF гена у односу на здраву контролу. Потом је упоређена релативна експресија VEGF гена код свих третираних група у односу на групу са опекотинама. Резултати су показали да је релативна експресија VEGF гена била значајно виша у групи третираној ХБО у поређењу са групом са опекотинама. Такође, експресија овог гена била је значајно већа и у групи са применом ФУ екстракта у односу на групу са опекотинама. Група са комбинованом применом ХБО и FU показала је, исто тако, значајно већу експресију VEGF гена од групе са опекотинама. Статистички значајне разлике између третираних група, међутим, није било. (Слика 24,  $F = 30,287$ ).



**Слика 24. Релативна експресија гена за факторе раста у подручју ране**  
(средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

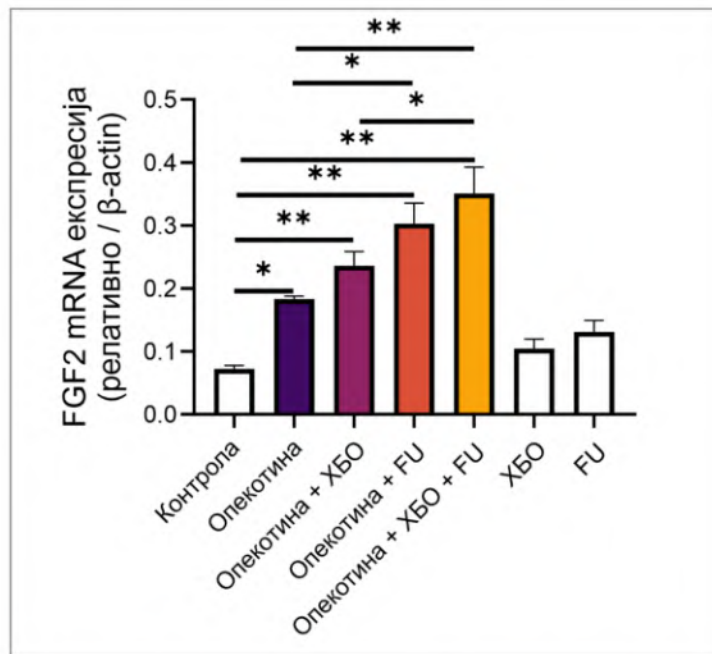
Релативна експресија гена FGF1 и FGF2 била је значајно већа у свим групама у поређењу са здравим контролама.

Код животиња лечених ХБО третманом, релативна експресија гена FGF1 је била значајно већа у поређењу са групом са опекотинама. Значајно већа релативна експресија гена FGF1 показана је и код животиња третираних комбинацијом ХБО и FU у односу на групу са опекотинама. Ипак, није било статистички значајне разлике између групе третиране само применом FU и групе са опекотинама. Слично томе, поредећи групу третирану само применом ХБО и групу са комбинованим третманом ХБО и FU, није уочена значајна разлика. (Слика 25,  $F = 20,193$ .)



**Слика 25. Релативна експресија гена за факторе раста у подручју ране**  
(средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Такође, релативна експресија FGF2 гена је била већа, у поређењу са опекотинама, у комбинованој FU и ХБО групи. Значајно већа експресија FGF2 гена примећена је и у групи са изолованим третманом FU у поређењу са групом са опекотинама. Значајне разлике, с друге стране, није било између групе са опекотинама и групе третиране само ХБО. Поредњи групе третиране само FU и комбинацијом FU и ХБО, такође, није уочена статистички значајна разлика. (Слика 26,  $F = 19,321$ ).

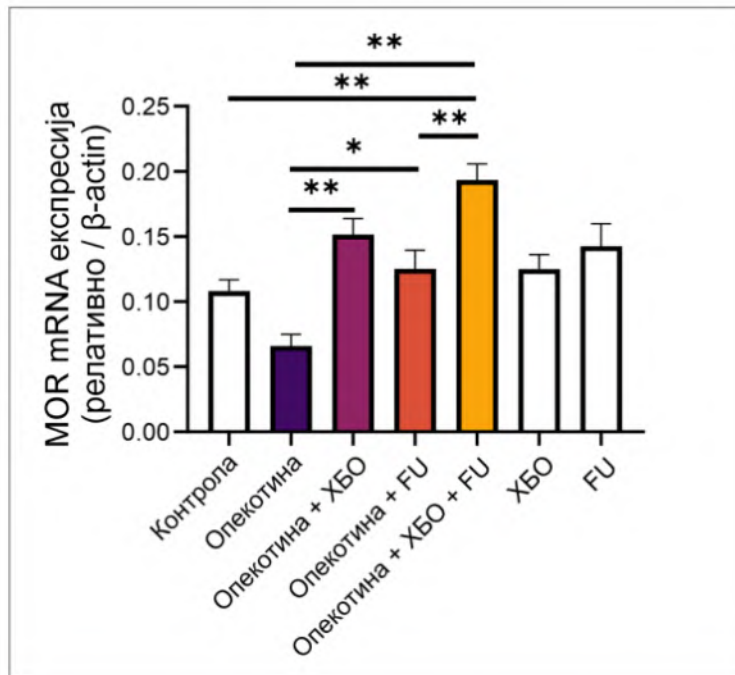


**Слика 26.** Релативна експресија гена за факторе раста у подручју ране (средња вредност ± SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

#### 4.6. Релативна експресија гена опиоидних и мелатонинских рецептора у подручју ране

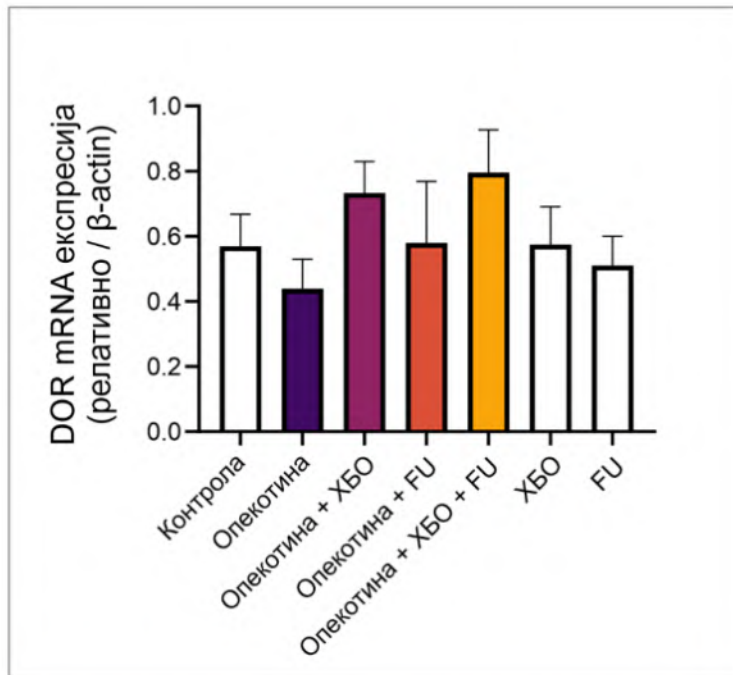
Затим је анализирана релативна експресија гена који кодирају опиоидне рецепторе у ткиву коже. Ранија истраживања су потврдила значај опиоидних рецептора изражених у кожи у процесу зарастања рана, као и антиноцицептивну улогу.

У поређењу са контролном групом, релативна експресија  $\mu$ OR гена је била значајно већа код животиња које су добиле комбиновани третман са екстрактом FU и ХБО. У овој групи је такође показана значајно већа релативна експресија гена у поређењу са групом са опекотинама. Релативна експресија  $\mu$ OR гена у групи са комбинованим ХБО и FU третманом била је значајно већа и у односу на групу са изолованим FU третманом. Значајна разлика, ипак, није примећена између групе третиране заједничком применом ХБО и FU и групе третиране само ХБО. (Слика 27,  $F = 10,078$ ).



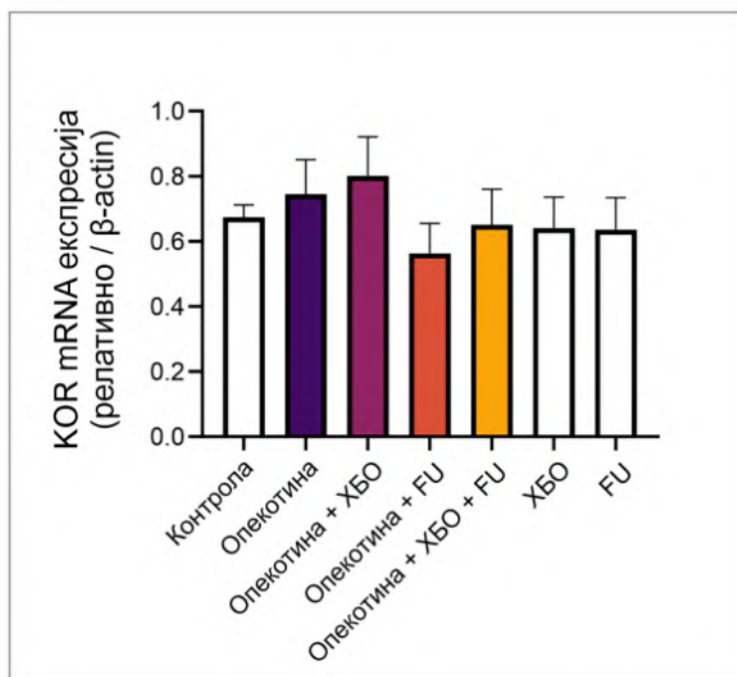
**Слика 27. Релативна експресија гена који кодирају опиоидне рецепторе у подручју ране**  
(средња вредност ± SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Што се тиче релативне експресије  $\delta$ OR гена, није уочена статистички значајна разлика између групе третиране ХБО и групе којој је дат FU екстракт. Значајне разлике није било ни између животиња које су биле подвргнуте комбинованом третману ХБО и FU и оних које су третиране само ХБО. Такође, поређење групе са комбинованим третманом и групе са изолованом применом FU није било разлике од статистичког значаја. Значајне разлике није било ни у поређењу третираних група са групом са опекотинама. (Слика 28,  $F = 1054$ )



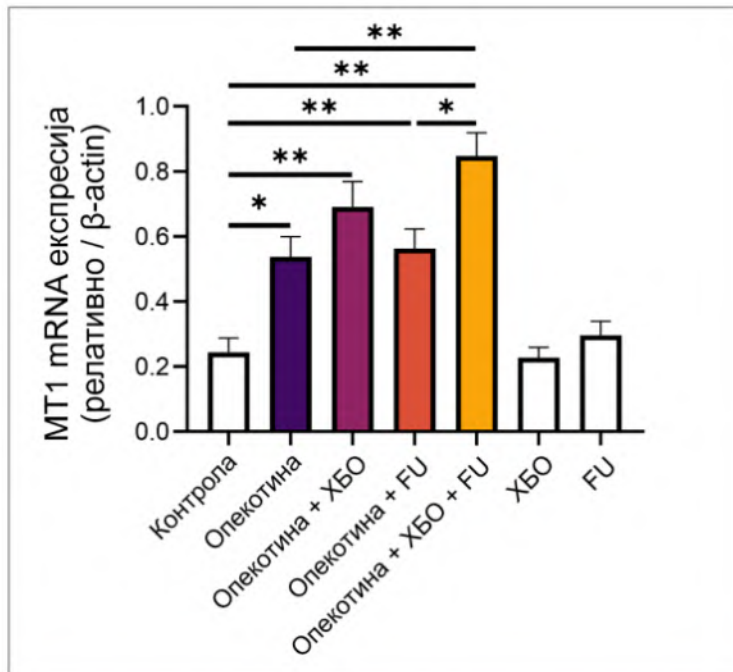
**Слика 28. Релативна експресија гена који кодирају опиоидне рецепторе у подручју ране** (средња вредност ± SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Слично томе, анализом добијених резултата није уочена значајна разлика у експресији  $\kappa$ OR гена између група са третманом, било изолованим ХБО и FU или комбинованим третманом, и групе са опекотинама. Такође, ни у поређењу третираних група међу собом, није било значајније разлике у експресији  $\kappa$ OR гена. (Слика 29,  $F = 0,647$ ).



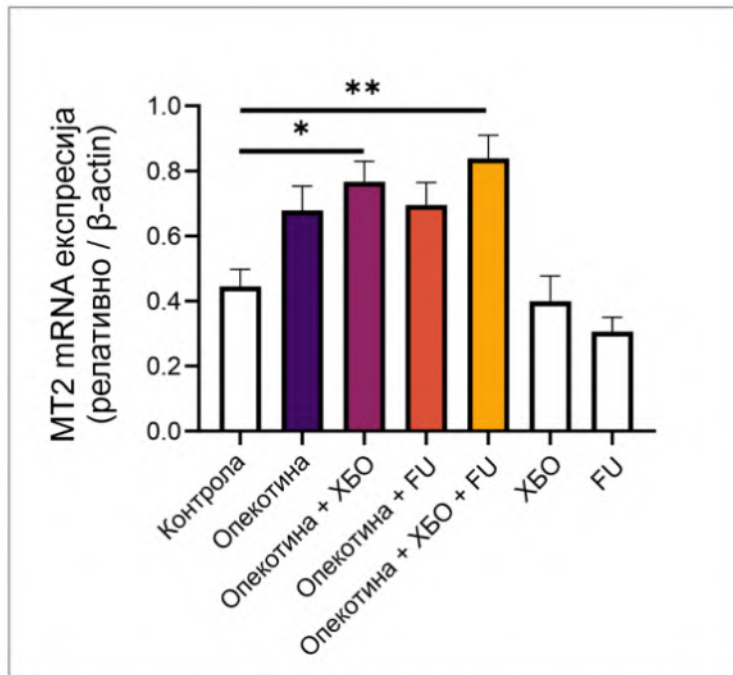
**Слика 29.** Релативна експресија гена који кодирају опиоидне рецепторе у подручју ране (средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01)

Међутим, релативна експресија МТ1 гена је била значајно већа у свим експерименталним групама у поређењу са здравим животињама. Такође, релативна експресија МТ1 гена је била значајно већа у групи која је примала комбиновани третман са FU екстрактом и ХБО у поређењу са групом са опекотинама. Група са комбинованим третманом показала је значајно већу релативну експресију МТ1 гена и у поређењу са групом која је третирана само екстрактом FU. Значајне разлике између групе са комбинованим третманом и групе третиране само ХБО, ипак, није било. Статистички значајна разлика уочена је и у групи третираној само ХБО у односу на групу са изолованим третманом екстрактом биљке FU. (Слика 30, F = 17,039).



**Слика 30.** Релативна експресија гена који кодирају мелатонинске рецепторе у подручју ране (средња вредност ± SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

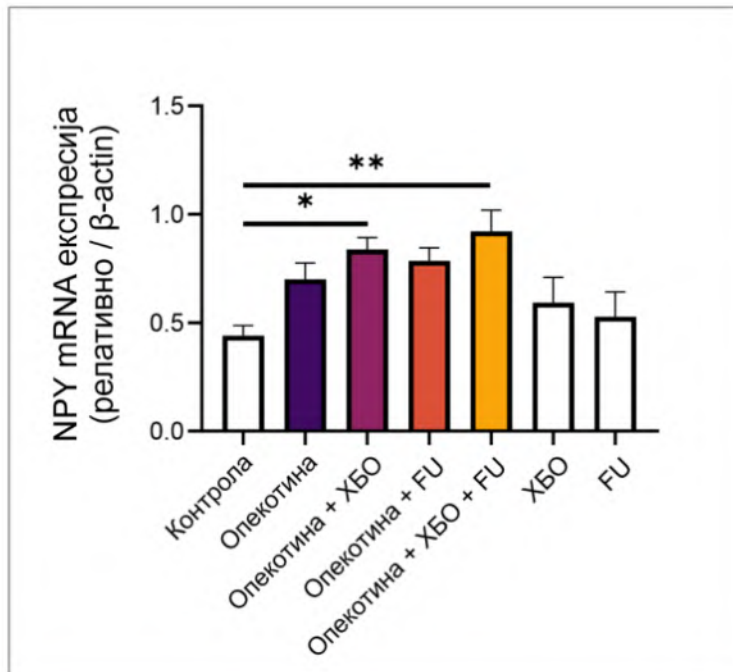
Релативна експресија MT2 гена је била значајно већа у групи третираној само ХБО у поређењу са контролом. Статистичка значајна разлика у односу на контролну групу, уочена је и у групи са комбинованом терапијом ХБО и FU. У међусобном односу ове две групе, разлика у релативној експресији MT2 гена није била од значаја. Група третирана само екстрактом биљке FU, такође, није показала значајну релативну експресију овог гена у поређењу са групом са опекотинама, али ни у поређењу са контролним групама. (Слика 31,  $C, F = 9725$ ).



**Слика 31. Релативна експресија гена који кодирају мелатонинске рецепторе у подручју ране** (средња вредност ± SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Потом је анализирана релативна експресија гена који кодира NPY молекул. Досадашња научна истраживања показала су да неуропептид Y преко својих рецептора учествује у модулирању и акутног и хроничног бола механичког и термичког порекла.

Анализом добијених резултата уочена је значајно већа релативна експресија NPY гена у групи која је била подвргнута ХБО третману у поређењу са контролом. Значајно већа експресија NPY гена примећена је и у групи комбиноване примене ХБО и FU екстракта у односу на контролну. Релативна експресија NPY гена није се значајно разликовала између ове две групе. Група третирана само екстрактом биљке FU није показала значајну разлику у експресији овог гена у поређењу са здравим животињама. (Слика 32,  $F = 9725$ ).

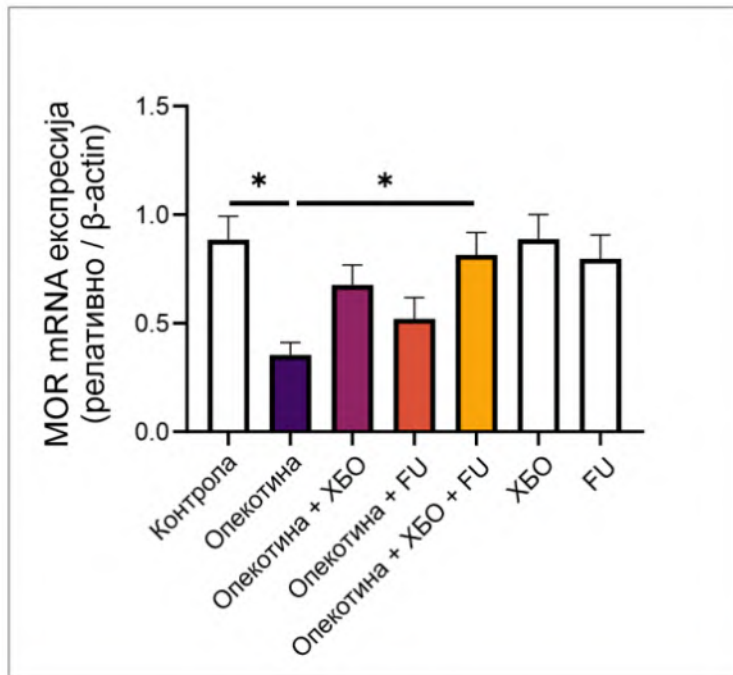


**Слика 32.** Релативна експресија гена који кодира NPY рецептор у подручју ране (средња вредност ± SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

#### 4.7. Релативна експресија гена који кодирају опиоидне и мелатонинске рецепторе на нивоу кичмене мождине

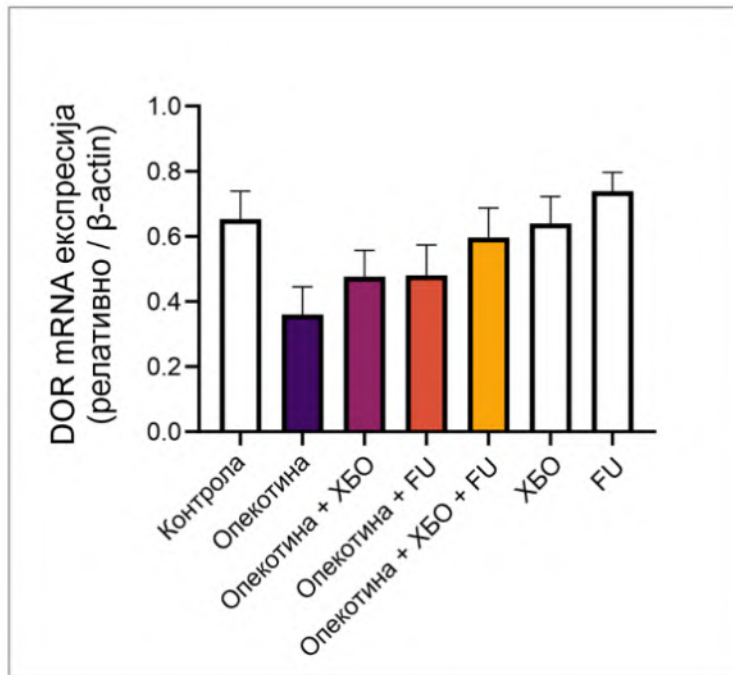
У циљу истраживања ноцицептивних ефеката третмана који се користе након термалне повреде коже, такође је анализирана релативна експресија гена који кодирају опиоидне рецепторе у кичменој моздини.

Детаљним разматрањем добијених резултата није уочена значајна разлика између групе третиране ХБО и групе која је примала екстракт FU. Значајне разлике није било ни између групе са комбинованим третманом и групе која је третирана само ХБО. Исто тако, поређењем групе која је примала комбинацију екстракта FU и ХБО са групом која је добила само екстракт биљке FU, није уочена сигнификантна разлика у релативној експресији гена опиоидних рецептора. Ипак, уочено је да је експресија  $\mu$ OR била значајно нижа у групи са опекотинама у поређењу са контролном групом. Такође, релативна експресија  $\mu$ OR гена била је значајно већа у групи са комбинованим третманом ХБО и FU у односу на групу са опекотинама. (Слика 33,  $F = 4198$ ).



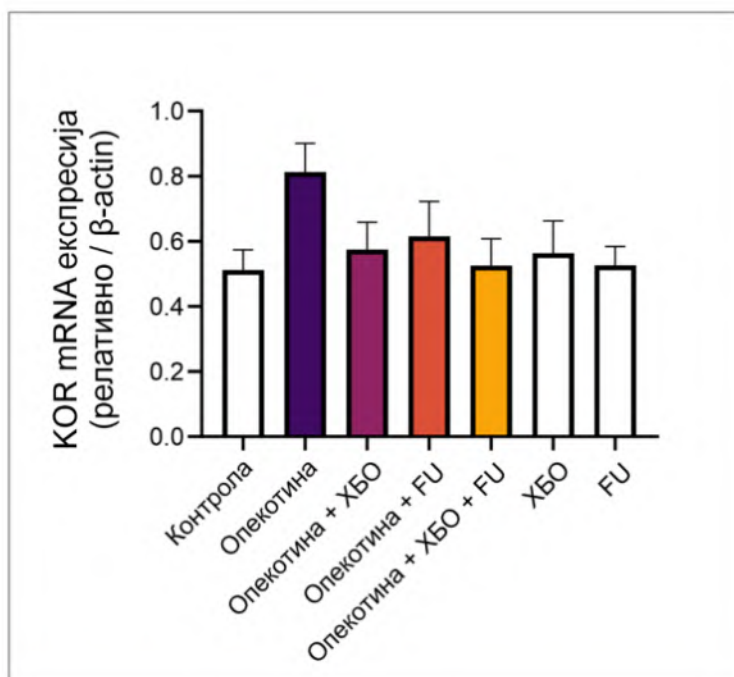
Слика 33. Релативна експресија гена који кодирају опиоидне рецепторе на нивоу кичмене  
 моздине  
 (средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Као и у ткиву коже, није уочена значајна разлика између експресије  $\delta$ OR код третираних група у односу на групу са опекотинама. Значајније разлике није било ни у поређењу третираних група са здравим контролама. Релативна експресија гена за  $\delta$ OR није се значајно мењала ни код групе са термичком лезијом у односу на контролу (Слика 34,  $F = 2477$ ).



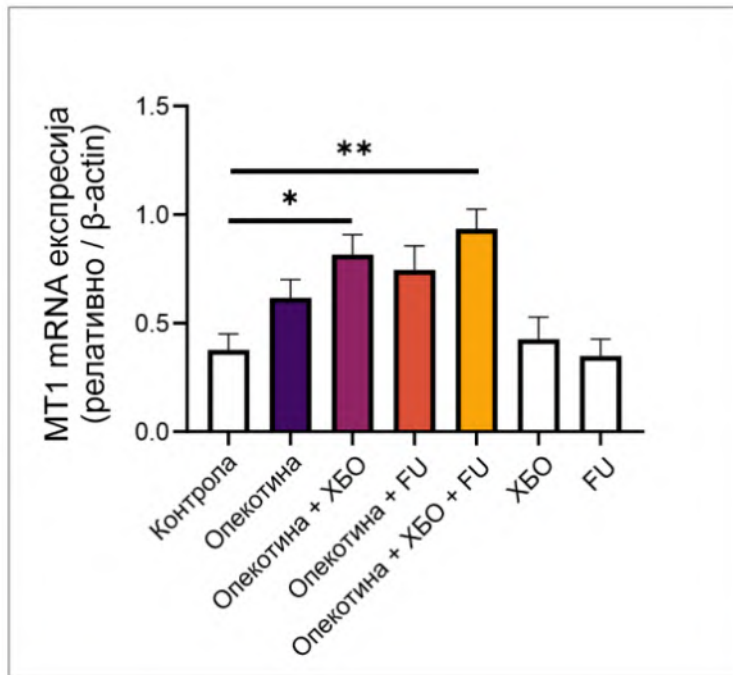
**Слика 34. Релативна експресија гена који кодирају опиоидне рецепторе на нивоу кичмене мождине**  
(средња вредност ± SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Анализом релативне експресије  $\kappa$ OR гена није уочена значајна разлика међу групама третираних само ХБО, само FU или комбинованим третманом. Третиране групе нису показале значајне промене у експресији  $\kappa$ OR ни у поређењу са здравим животињама, али ни у односу на групу са опекотинама. (Слика 35,  $F = 1525$ )



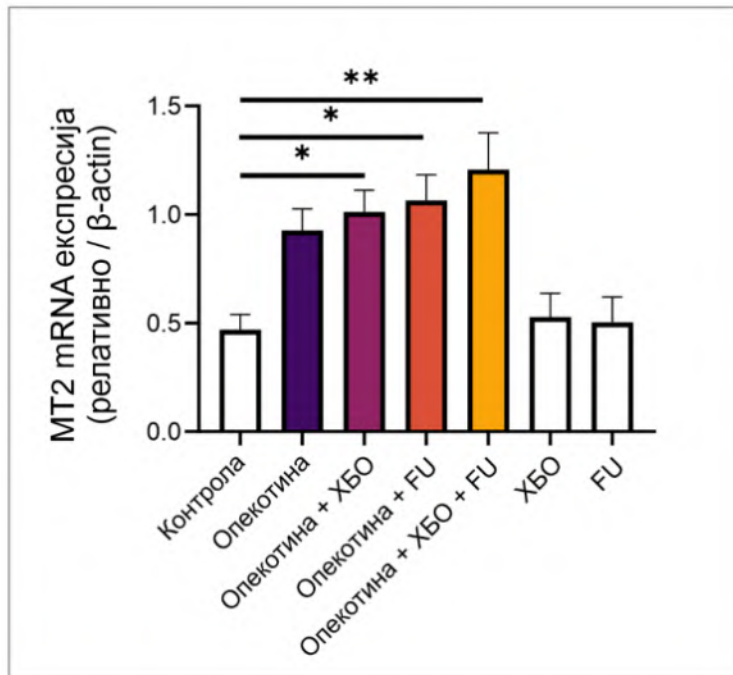
Слика 35. Релативна експресија гена који кодирају опиоидне рецепторе на нивоу кичмене мождине (средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Затим је анализирана релативна експресија гена који кодирају мелатонинске рецепторе на нивоу кичмене мождине. Резултати су показали да је релативна експресија MT1 гена била значајно већа код животиња које су примале ХБО третман у поређењу са здравим контролама. Релативна експресија MT1 гена била је значајно већа и у групи са симултаним третманом ХБО и FU у односу на контролу. Поређењем ове две групе, групе третиране само ХБО и групе са комбинованим ХБО и FU третманом, ипак, значајне разлике у експресији MT1 гена није било. Група третирана само екстрактом FU биљке није показала значајнију разлику у релативној експресији MT1 гена у односу на здраву контролу. (Слика 36,  $F = 6558$ ).



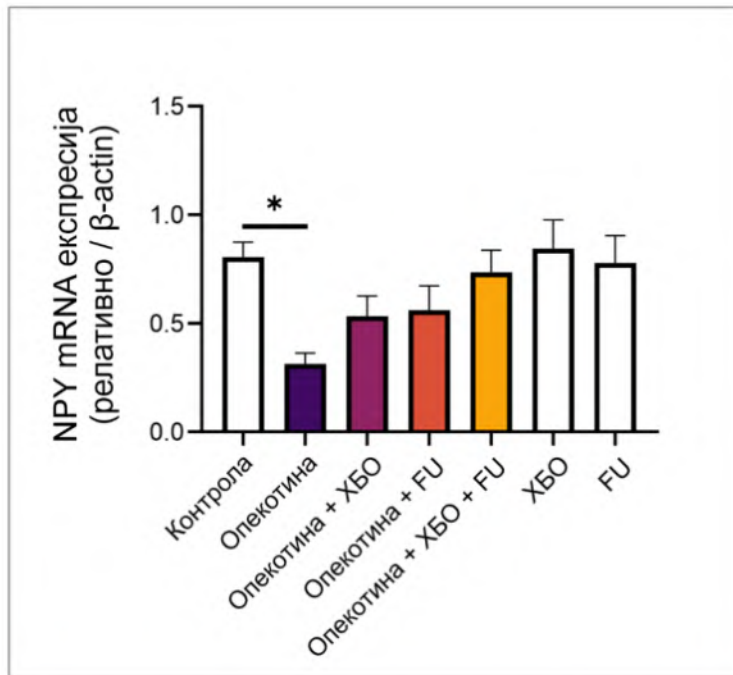
Слика 36. Релативна експресија гена који кодирају мелатонинске рецепторе на нивоу кичмене  
 моздине  
 (средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Слично, релативна експресија MT2 гена је такође била значајно већа у групи која је изложена само ХБО у поређењу са контролом. Исто тако, комбинована примена ХБО и FU показала је већу експресију MT2 гена у односу на контролу. У овом случају, група са изолованом применом FU екстракта је такође показала значајно већу релативну експресију MT2 гена у односу на контролу. Међутим, поредећи све третиране групе међусобно, није уочена статистички значајна разлика у релативној експресији MT2 гена. (Слика 37,  $F = 7086$ ).



Слика 37. Релативна експресија гена који кодирају мелатонинске рецепторе на нивоу кичмене мождине (средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

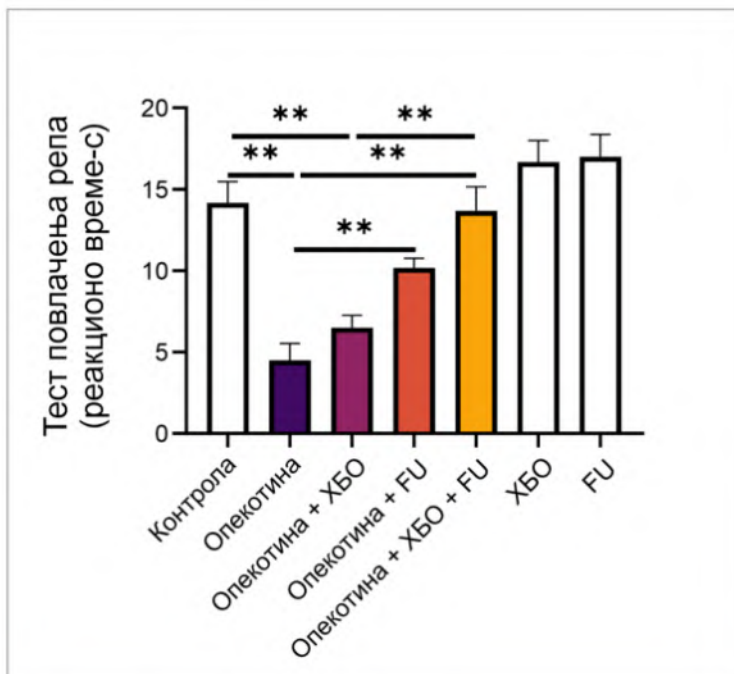
Такође је испитана и релативна експресија гена који кодира NPY на нивоу кичмене мождине. Релативна експресија гена за NPY је била значајно нижа у групи са опекотинама у поређењу са контролном групом. Није било разлике у поређењу групе третиране ХБО и групе са третманом FU екстрактом. Такође, ни поређењем групе третиране ХБО и групе са комбинованим ХБО и FU третманом није уочена значајнија разлика. Релативна експресија гена NPY није се значајно разликовала ни у односу групе третиране само екстрактом биљке FU и групе са комбинованим третманом. (Слика 38,  $F = 3578$ ).



Слика 38. Релативна експресија гена који кодира NPY рецептор на нивоу кичмене мождине (средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

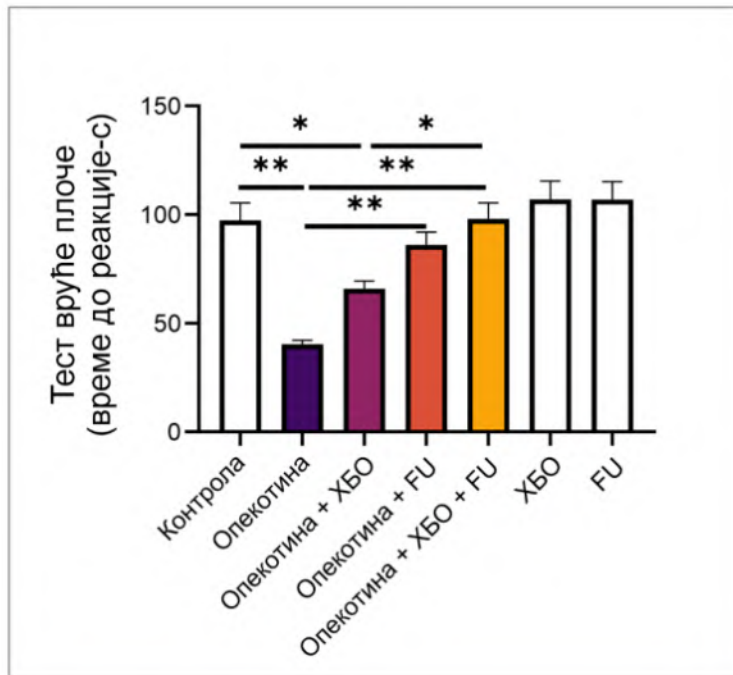
#### 4.8. Тестирање понашања

Процена ноцицепције је извршена коришћењем теста повлачења репа и теста вруће плоче под одговарајућим условима. Резултати теста повлачења репа показали су значајне промене у времену реаговања након термичке повреде. Протокол третмана коришћењем комбинације екстракта FU и ХБО довео је до значајног продужења времена реакције у поређењу са групом са опекотинама. Група са комбинованим ХБО и FU третманом показала је значајно дуже време реакције и у поређењу са групом третираном само ХБО. Значајне разлике у времену потребном за реакцију није било између групе са комбинованим третманом и групе са изолованом применом FU. Такође, није уочена значајна разлика у временском периоду протеклом до реакције животиње на стимулус у поређењу групе са изолованом применом ХБО и групе са опекотинама. (Слика 39,  $F = 17,646$ ).



**Слика 39.** Бихевиорално тестирање – тест повлачења репа  
(средња вредност ± SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

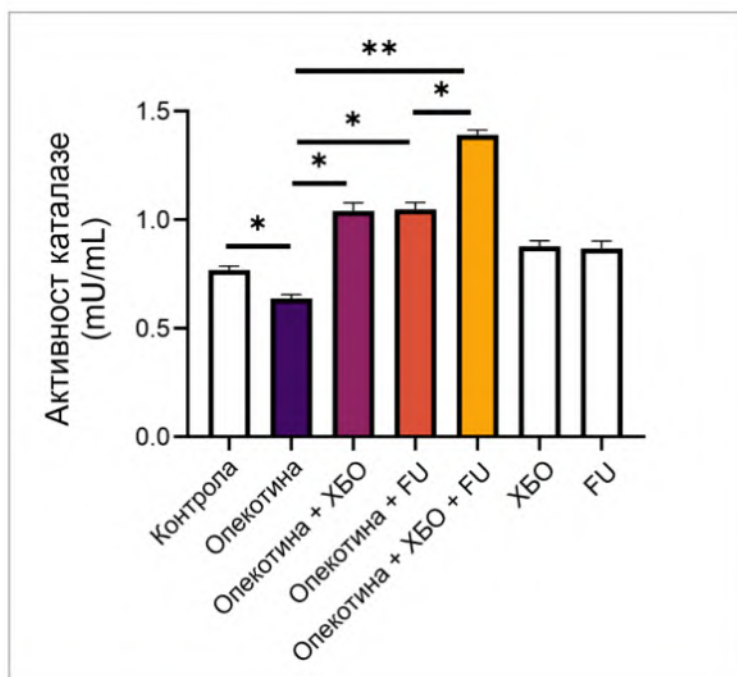
Слично томе, примењени протокол термичке повреде значајно је утицао на време реакције у тесту вруће плоче (Слика 40,  $F = 13,765$ ). Латенција за реаговање на термалне стимулусе значајно је повећана у групи са комбинованим екстрактом FU и ХБО у поређењу са групом са опекотинама. Исто тако, регистрована је значајна реакција у временском периоду протеклом до реакције код животиња које су третиране комбинованим третманом ХБО и FU у односу на групу животиња која је била изложена само ХБО. Група која је примала екстракт биљке FU се није значајно разликовала од групе са опекотинама у времену до реакције на термички стимулус. (Слика 40).



**Слика 40.** Бихевиорално тестирање – тест вруће плоче  
(средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

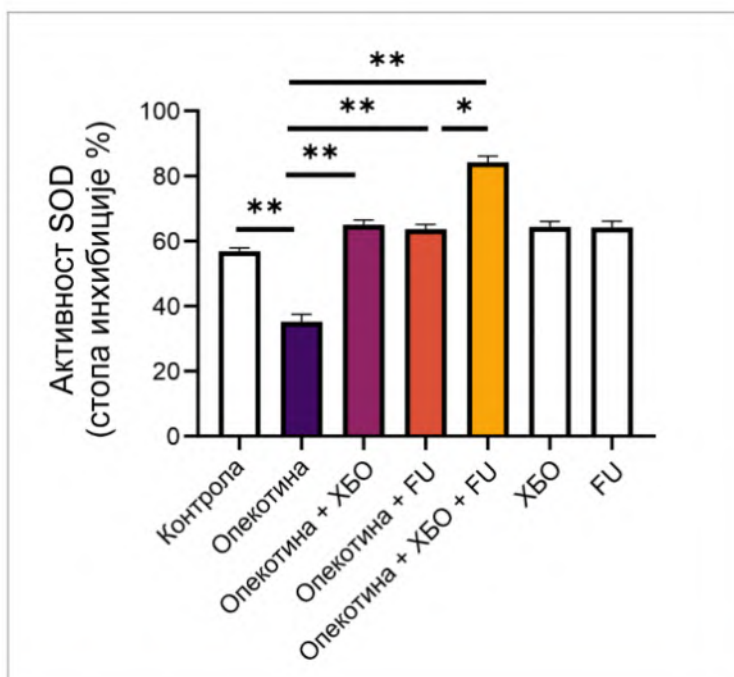
#### 4.9 Анализа параметара оксидативног стреса

Ензим каталаза (CAT) посредује у реакцији разградње токсичног водоник пероксида, а мерење активности овог ензима вршено је колориметријском методом у хомогенату ткива из подручја повреде. Анализа је показала да је активност CAT значајно нижа у групи животиња са термалном повредом у односу на контролну групу. Активност ензима је била значајно виша у групи третираној ХБО терапијом у односу на групу опекотина, а исти резултат је показан и у групи третираној екстрактом FU, при чему није било разлике између ове две појединачне групе. Најизраженија вредност активности CAT је показана у групи у којој је примењен комбиновани терапијски протокол ХБО и FU. Статистички значајна разлика је у овој групи уочена у поређењу са групом опекотина, али и у односу на групу са једноструком применом екстракта FU (Слика 41,  $F=76,48$ ).



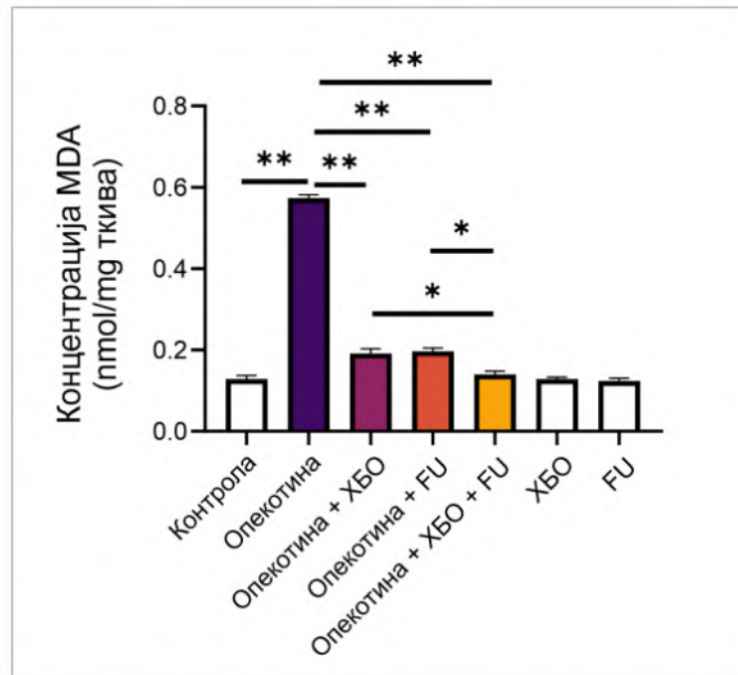
**Слика 41. Активност каталазе**  
(средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Супероксид дисмутаза (SOD) је ензим који, значајно убрзавајући ову реакцију, катализује претварање супероксид анјон радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) у водоник-пероксид ( $H_2O_2$ ), а његова активност је одређена колориметријском техником. Анализом је показано да је активност SOD значајно нижа у групи животиња са термалном повредом у односу на контролну групу. Активност ензима је била значајно виша у групи третираној искључиво ХБО терапијом у односу на групу опекотина, а исти резултат је показан и у групи третираној само екстрактом FU, при чему није било разлике између ове две појединачне групе. Активности SOD је била најизраженија у групи у којој је примењен комбиновани терапијски протокол ХБО и FU. Статистички значајна разлика је у овој групи уочена у поређењу са групом опекотина, али и у односу на групу са појединачном применом екстракта FU (Слика 42,  $F=72,29$ ).



**Слика 42. Активност супероксид дисмутазе (SOD)**  
(средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Концентрација MDA (малондиалдехида) је значајно повећана код термалне повреде коже, као биомаркера оксидативног стреса и липидне пероксидације. Ово повећање указује на оштећење ћелијских мембрана, што изазива стварање овог токсичног алдехида, који може допринети секундарном оштећењу ткива. Његова концентрација је одређена колориметријском техником у хомогенату ткива ране. Анализа је показала статистички високу вредност концентрације MDA у групи животиња са опекотинама у односу на контролну, и групе са примењеним терапијским протоколима. У групи животиња на којима је примењен комбиновани терапијски протокол ХБО и FU, концентрација MDA је била статистички значајно нижа у поређењу са групама у којима су примењени појединачни терапијски протоколи (Слика 43,  $F=388.7$ ).



**Слика 43.** Анализа липидне пероксидације - MDA  
(средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

## **5. Дискусија**

Тежина опекотине у великој мери зависи од дубине захваћеног ткива, што директно утиче на физиолошки одговор организма на повреду и целокупан процес зарастања. Процес регенерације опекотинских рана одвија се кроз четири узастопне, али међусобно преклапајуће фазе: хемостазе, упале, пролиферације и ремоделовања (17). Хемостаза представља непосредни одговор на васкуларну повреду, спречавајући прекомерни губитак крви и иницирајући регрутацију инфламаторних медијатора. Након тога следи инфламаторна фаза, коју карактерише активација имунских ћелија, ослобађање цитокина и инфилтрација леукоцита, чиме се постиже елиминација патогена и успостављање репараторних механизма. Током пролиферативне фазе долази до активације фибробласта, депоновања екстрацелуларног матрикса, ангиогенезе и реепителизације, што доприноси обнављању ткивне структуре. Коначно, фаза ремоделовања подразумева сазревање колагена и реорганизацију екстрацелуларног матрикса, чиме се одређује коначни структурни и функционални исход зарастања опекотинске ране (17). Једна од најупечатљивијих и најнепријатнијих клиничких манифестација опекотина јесте бол, који настаје услед сложених патофизиолошких механизма. Директно деловање термичког агенса на кожу доводи до активације ноцицептора и сензибилизације неурона, што изазива моментални и често интензиван болни одговор. Поред тога, инфламаторни процес додатно појачава перцепцију бола ослобађањем проинфламаторних медијатора, попут простагландина, брадикинина, хистамина и цитокина. Ови медијатори доприносе и периферној и централној сензибилизацији, продужавајући трајање болног осећаја и потенцијално изазивајући хипералгезију или алодинију (98). Сложен међусобни утицај оштећења ткива, стимулације ноцицептора и инфламаторних реакција наглашава мултифакторску природу бола код опекотинских повреда, што захтева свеобухватан приступ у терапији бола и збрињавању рана ради оптимизације исхода лечења пацијената (99).

У овом истраживању анализирали смо ефекте екстракта FU у комбинацији са терапијом хипербаричним кисеоником (ХБО) у третману након термалних повреда, са посебним нагласком на ноцицепцију и могуће механизме деловања. С обзиром на комплексност патофизиолошких промена које настају након опекотина, од суштинског је значаја истражити терапијске модалитете који могу ублажити бол, смањити инфламаторни одговор и побољшати процес зарастања. Постоји велики број доказа из експерименталних и клиничких студија који указују на значај примене ХБО у лечењу опекотина. Досадашња истраживања потврђују способност ХБО да позитивно утиче на кључне патофизиолошке механизме опекотинских повреда, укључујући смањење хипоксије ткива, модулацију оксидативног стреса и инфламације, као и убрзање ангиогенезе и епителизације (57, 100). Циљ ове студије је откривање доказа о повољним интеракцијама између ХБО терапије и процеса зарастања опекотинских рана чиме се додатно осветљава њен потенцијал у оптимизацији третмана термалних повреда. Резултати студије показали су да комбиновани третман са екстрактом FU и терапијом хипербаричним кисеоником доводи до значајног побољшања макроскопских и хистопатолошких карактеристика ране. Након примене ове комбиноване терапије, уочено је значајно повећање контракције кожне лезије у поређењу са контролном групом, али и у односу на групу која је примала само орално администрирани екстракт FU. Хистопатолошка евалуација је такође показала да, иако између појединачних третмана екстрактом FU и ХБО није било значајних разлика, њихова комбинована примена довела је до израженог побољшања у процесима зарастања. У узорцима коже животиња третираних комбинованим протоколом, примећена је интензивна обнова епитела, присуство густих колагених влакана и реституција нормалне архитектуре ткива. Ови налази сугеришу да истовремена примена екстракта FU и ХБО терапије може имати синергистички ефекат

доприноси бржој и квалитетнијој регенерацији оштећеног ткива.

Можемо претпоставити да терапија хипербаричним кисеоником позитивно утиче на епителизацију опекотинских рана смањујући штетне ефекте хипоксије, чиме се стварају повољнији услови за убрзану пролиферацију и миграцију епителних ћелија. Познато је да хипоксија представља један од кључних фактора који могу успорити регенеративне процесе у ткиву након термалних повреда, а примена ХБО терапије може значајно допринети побољшању оксигенације, чиме се подстиче обнова епидермиса и убрзава затварање ране. Међутим, упркос овим потенцијалним механизмима деловања, постоје контрадикторни резултати у литератури у вези са утицајем ХБО терапије на епителизацију опекотина другог степена. Док нека истраживања указују на њен повољан ефекат у убрзавању реепителизације и побољшању исхода лечења, друге студије нису потврдиле значајну корист или су чак сугерисале могућност негативних ефеката у одређеним експерименталним условима (100, 101). Ове несугласице указују на потребу за додатним истраживањима како би се прецизније дефинисао оптималан режим примене ХБО терапије и разјаснио њен стварни утицај на процес епителизације код опекотинских рана различите тежине. Налази ове студије су у складу са истраживањем *Hatibie* и сарадника, који су на елегантан начин демонстрирали благотворне ефекте ХБО на процес зарастања рана (102). Њихова студија јасно указује на то да је адекватан ниво кисеоника неопходан за оптимално исцељење ткива, с обзиром на његову кључну улогу у ћелијској пролиферацији, миграцији, ангиогенези и модулацији инфламаторног одговора. Ови налази додатно потврђују значај оксигенације у репаративним процесима и наглашавају потенцијал ХБО терапије као адјувантне стратегије у лечењу опекотинских и других хроничних рана.

Мерењем параметара оксидативног стреса у подручју опекотине, приказани су подаци у складу са савременим студијама које су показале позитиван ефекат системске примене антиоксидативних терапеутика. Активност каталазе у току опекотина је сложена, са почетним смањењем у неким ткивима након повреде опекотином, након чега следи повећање активности у секрету из ране и серуму током времена, вероватно као заштитни антиоксидативни одговор на оксидативни стрес од опекотине и пратеће инфламације. Приказани резултат показује да је активност каталазе након експерименталног протокола нижа у групи животиња са опекотином без третмана. Истовремено, у групи животиња са комбинованом терапијом ХБО и FU, активност каталазе у пределу ране је значајно повећана, што може указати на њену улогу у механизмима зарастања ране. Сличан податак је добијен и анализом активности SOD, која је значајно повећана у групи животиња на којима је примењена комбинована терапија ХБО и FU. Познато је да активност овог ензима расте у фазама опоравка након термалне повреде, а комбиновани терапијски протокол је и преко овог механизма допринео бржем зарастању ране и опоравку.

Претходна истраживања су показала да антиоксиданси могу имати значајну улогу у модулацији инфламаторног одговора, пре свега путем редукције проинфламаторних медијатора као што су цитокини и реактивне врсте кисеоника, чиме се смањује инфламаторна каскада која може допринети даљем оштећењу ткива. Поред тога, системска примена антиоксидативних супстанци показала је значајан потенцијал у инхибицији апоптозе ћелија у оштећеном ткиву, што може допринети очувању структуралног интегритета и убрзању процеса зарастања (103, 104, 105). Ови налази додатно потврђују важност оксидативног стреса као једног од кључних фактора у патофизиологији опекотинских рана и указују на потенцијалне користи антиоксидативне терапије у побољшању клиничког исхода пацијената са термичким повредама. Штавише, недавна студија коју су спровели *Sheng Wu* и сарадници показала је повећану експресију

мелатонинских и опиоидних рецептора након једнонедељне терапије хипербаричном оксигенацијом код пацијената са болом изазваним опекотинама (33). Ови налази сугеришу да поменути рецептори могу имати значајну улогу у модулацији ноцицептивних сензација, потенцијално доприносећи аналгетском ефекту ХБО третмана.

Мелатонин, осим што делује као снажан антиоксиданс и имуномодулатор, показује и неуропротективна својства, укључујући утицај на централне и периферне путеве бола. С друге стране, активација опиоидних рецептора позната је по свом аналгетском ефекту, а њихова повећана експресија може допринети смањењу перцепције бола код пацијената са термичким повредама. Ови резултати додатно наглашавају сложене механизме кроз које ХБО терапија може ублажити бол, не само побољшањем оксигенације ткива, већ и кроз интеракцију са кључним неуроблошким системима укљученим у регулацију ноцицепције (33). У овој студији, показано је да је релативна генска експресија  $\mu$ OR и MT1 била значајно повећана у подручју ране у поређењу са контролним групама. Ови резултати додатно потврђују хипотезу да ХБО терапија, у комбинацији са применом FU екстракта, може модулирати експресију кључних рецептора укључених у аналгезију и репаративне процесе у ткиву.

Повећана експресија  $\mu$ OR сугерише потенцијално појачану ендегену опиоидну активност у оштећеном ткиву, што може допринети смањењу бола и побољшању субјективног осећаја пацијената током процеса зарастања. Слично томе, повећана експресија MT1 рецептора указује на значај мелатонинског сигналног пута у регенеративним процесима, с обзиром на познате антиинфламаторне, антиоксидативне и цитопротективне ефекте мелатонина.

Ови налази у складу су са претходним истраживањима која су показала да терапије усмерене на оксидативни стрес и инфламаторне путеве могу модулирати експресију рецептора укључених у ноцицепцију и репарацију ткива (106). Даља истраживања су неопходна како би се прецизно дефинисали механизми кроз које ХБО и антиоксидативни третмани утичу на експресију  $\mu$ OR и MT1 и како би се истражила њихова клиничка примена у оптимизацији терапије бола код пацијената са термичким повредама.

Додатак антиоксиданата током процеса зарастања рана представља област интензивног истраживања у биомедицинским наукама, с обзиром на кључну улогу оксидативног стреса у патофизиологији оштећења ткива и репаративним механизмима. Бројне студије су показале да оксидативни стрес, настао услед повећане продукције реактивних врста кисеоника и смањене активности антиоксидативних система, може негативно утицати на процес епителизације, ангиогенезе и ремоделовања ткива (107, 108, 109).

У том контексту, примена стандардних антиоксиданаса, попут витамина С, витамина Е и селена, показала је значајне терапеутске ефекте у побољшању зарастања кожных лезија. Конкретно, витамин С, познат по својој улози у синтези колагена и неутрализацији слободних радикала, показао је способност убрзавања реепителизације и побољшања интегритета новоствореног ткива (107). Витамин Е, захваљујући својим снажним липофилним антиоксидативним својствима, делује протективно на ћелијске мембране, смањујући липидну пероксидацију и инфламаторни одговор у ткиву оштећеном повредом (108). Селен, као есенцијални микроелемент са важном улогом у функцији глутатион пероксидазе, доприноси модулацији инфламације и заштити ћелија од оксидативног оштећења, чиме додатно поспешује репаративне процесе (109). Ови налази указују на то да антиоксидативна терапија може представљати значајну адјувантну стратегију у третману кожных повреда, са потенцијалом да смањи инфламаторни стрес, убрза регенерацију ткива и побољша коначни исход зарастања рана. Међутим, потребно је спровести додатна

истраживања како би се прецизно дефинисале оптималне дозе, начини примене и потенцијалне интеракције антиоксиданаса са другим терапијским модалитетима у лечењу оштећења коже.

У последње време, природни производи богати антиоксидансима све више су предмет научних истраживања због њиховог потенцијалног утицаја на процес зарастања рана. Експерименталне студије су показале да одређени биоактивни састојци присутни у биљним екстрактима и природним једињењима могу значајно допринети убрзању регенерације ткива, чиме се отвара могућност за њихову примену као адјувантне терапије у лечењу оштећења коже (110,111,112). Механизам њиховог деловања обухвата стимулацију кључних биолошких процеса неопходних за репарацију ткива, што укључује повећану контракцију ране, као и појачану синтезу и акумулацију структурних компоненти екстрацелуларног матрикса. Конкретно, уочено је да одређени антиоксидативни природни производи доводе до пораста нивоа хидроксипролина и хексозамина, молекула који имају значајну улогу у формирању колагених влакана и стабилизацији међућелијских структура. Такође, студије су показале повећану присутност фибробласта и фиброцита, ћелија које су кључне за ремоделовање ткива и синтезу матриксних протеина (110). Додатно, ове биоактивне супстанце доприносе бољој реепителизацији, повећаној депозицији колагена и побољшаној организацији влакана унутар регенерисаног ткива. Такође је примећено појачано присуство фибронектина, гликопротеина који игра кључну улогу у ћелијској адхезији, миграцији и диференцијацији током процеса зарастања (111). Све ове промене доприносе формирању функционалног и структурно стабилног ткива, што указује на значајан потенцијал природних антиоксиданаса у побољшању квалитета регенерације рана.

Иако су ови налази обећавајући, неопходна су даља истраживања како би се боље разумела специфична ћелијска и молекуларна дејства ових супстанци, као и њихова ефикасност у клиничким условима. Додатно, будуће студије треба да се фокусирају на оптимизацију дозирања, начина примене и потенцијалних интеракција са постојећим терапијским протоколима, како би се обезбедила максимална корист у клиничкој пракси.

Изражене промене у релативној експресији гена у хипокампусу уочене су и код опиоидних рецептора, што је у складу са претходно описаним механизмима који укључују смањење експресије опиоидних рецептора у процесу развоја неуропатског бола. Овај феномен је посебно значајан када се посматра из перспективе различитих нивоа нервног система, укључујући дорзални ганглион спиналног нерва, кичмену мождину и супраспиналне регије. Досадашња истраживања указују на то да смањење експресије опиоидних рецептора може допринети смањењу ефикасности ендогеног опиоидног система у модулацији бола, што додатно отежава терапијски приступ неуропатском болу и може имати импликације на отпорност пацијената на аналгезију изазвану опиоидима (113). Ови налази потврђују сложене неуробиолошке механизме укључене у патофизиологију неуропатског бола и наглашавају потребу за даљим истраживањима која би омогућила развој нових терапеутских стратегија усмерених на модулацију опиоидног система на различитим нивоима централног и периферног нервног система. Међутим, промене у експресији опиоидних рецептора након претходних третмана биле су сложеније и указивале су на диференцијалне одговоре унутар различитих подтипова рецептора. Наиме, док је значајан пад експресије  $\mu$  и  $\delta$  опиоидних рецептора, који је уочен седам дана након термичке повреде, успешно неутрализован у групи са комбинованим третманом, супротан одговор забележен је код експресије  $\kappa$  рецептора. Релативна експресија  $\kappa$  рецептора била је значајно повећана као реакција на термичку трауму, што сугерише потенцијалну улогу овог рецептора на постопеклој инфламаторној и ноцицептивној адаптацији. Међутим, ова

повећана експресија је значајно редукована до нивоа контролних вредности након примене антиоксидативне суплементације, како самостално, тако и у комбинацији са терапијом ХБО.

Добијени резултати су у складу са претходним истраживањима која су указала на генерализовану позитивну регулацију опиоидних рецептора након појединачног третмана хипербаричним кисеоником на експерименталном моделу повреде исхијадичног нерва код пацова (114). Ови налази додатно доприносе разумевању комплексне интеракције између оксидативног стреса, инфламације и опиоидног система у оквиру механизма одговора на термичке повреде и наглашавају потенцијалну терапијску вредност антиоксидативне и ХБО терапије у модулатији опиоидних рецептора у контексту неуропатског бола. Још значајније, добијени подаци подржавају раније извештаје о специфичном повећању експресије  $\mu$  опиоидних рецептора након продужених третмана хипербаричним кисеоником, у трајању од једне и две недеље, код пацова са неуропатским болом изазваним опекотинама. Ови налази наглашавају важност трајања и интензитета ХБО терапије у модулатији опиоидног система и сугеришу потенцијалне механизме путем којих ова терапијска стратегија може допринети ублажавању неуропатског бола кроз регулацију експресије опиоидних рецептора у централном и периферном нервном систему (33). Међутим, приказани резултати нису у складу са истовременом позитивном регулацијом  $\mu$  и  $k$  опиоидних рецептора у клинастом језгру (*nucleus cuneatus*), дорзалним роговима кичмене мождине и кожи задње шапе, која је примећена након хроничне примене ХБО. Ове дискрепанце могу указивати на различите механизме адаптације опиоидног система у зависности од трајања и модалитета ХБО третмана, као и на могуће регионалне варијације у одговору ткива на терапију. Диференцијална регулација опиоидних рецептора између централних и периферних структура може имати значајне импликације на разумевање аналгетских ефеката хипербаричне оксигенације и захтевати даља истраживања како би се разјаснила комплексна улога  $\mu$  и  $k$  рецептора у неуробиолошким процесима који прате неуропатски бол (33). Могуће објашњење за уочене разлике у релативној експресији  $k$  опиоидних рецептора могло би се приписати ткивним специфичностима унутар исте врсте. У том контексту, треба узети у обзир да хипокампадно ткиво, као део централних аналгетских механизма, може реаговати другачије у датим експерименталним условима у поређењу са другим регијама нервног система. Хипокампус игра кључну улогу у модулатији бола кроз интеракцију са опиоидним и неуромодулаторним системима, те је могуће да варијације у експресији  $k$  рецептора одражавају специфичне адаптивне одговоре ове структуре на оксидативни стрес, инфламаторне процесе или хомеостатске промене изазване термичком повредом и примењеним терапијама. Ови налази наглашавају потребу за додатним студијама које би детаљније разјасниле регионалне разлике у одговору опиоидног система и њихову потенцијалну улогу у аналгезији посредованој хипербаричним кисеоником.

Опиоидни рецептори у дорзалном рогу кичмене мождине показали су значајне промене у одговору на ноцицептивне стимулансе код експерименталних животиња са генетском делецијом опиоидних рецептора. Ове промене сугеришу кључну улогу опиоидног система у модулатији ноцицептивних сигнала на нивоу кичмене мождине, при чему дисфункција опиоидних рецептора може довести до алтерисаног преноса бола (115). Међутим, тачан механизам који доводи до смањене експресије  $\mu$  опиоидних рецептора у дорзалном рогу остаје нејасан. Претпоставља се да овај феномен може бити последица компензаторних механизма централног нервног система, укључујући промене у сигналним путевима повезаним са опиоидним рецепторима, регулацију транскрипције гена одговорних за њихову експресију или интеракције са другим неуротрансмитерским системима (116, 117). Нужно је спровести додатне анализе како би се разјаснили прецизни молекуларни и

физиолошки процеси који стоје иза ове регулације, што би могло имати значајније импликације за разумевање механизма бола и развоја нових аналгетских стратегија. Повишени нивои опиоида у плазми, који су забележени током акутне фазе повреде опекотинама, могу допринети смањењу експресије опиоидних рецептора. Ова регулација може бити резултат механизма негативне повратне спреге, при чему повећана доступност ендогених опиоида доводи до интернализације и деградације опиоидних рецептора или инхибиције њихове синтезе. Важно је напоменути да се ово запажање највероватније односи на студије у којима су узорци прикупљани четири недеље након трауматског догађаја, што се разликује од протокола примењеног у овом истраживању. Разлике у временском оквиру узорковања могу значајно утицати на добијене резултате, с обзиром на то да је експресија опиоидних рецептора динамичан процес који зависи од различитих фактора, укључујући фазу инфламаторног одговора, неуроендокрине адаптације и регенеративне процесе у нервном систему. Даља истраживања су потребна како би се утврдило у којој мери акутне и хроничне промене у нивоу циркулишућих опиоида утичу на регулацију опиоидних рецептора у различитим ткивима, што би могло имати велики клинички значај у разумевању модулатије бола након тешких повреда.

Промене у опиоидним и ноцицептивним рецепторима могу бити укључене у механизме који леже у основи различитих промена понашања које се јављају истовремено са повредама. Ове промене могу допринети модулатији одговора на бол, али и утицати на широк спектар неуробихевиоралних функција. Истраживања су показала да дисфункција опиоидних и ноцицептивних рецептора може значајно утицати на различите аспекте понашања, укључујући повећану анксиозност и развој депресивних стања (115,118,119) као и на когнитивне функције, при чему су забележена оштећења у процесима учења и меморије (120). Поред тога, промене у експресији и функционалности ових рецептора могу допринети модулатији ноцицептивних путева, што може резултирати променама у перцепцији и одговору на бол (119). Ови налази сугеришу да модулатија опиоидног система није ограничена само на аналгезију, већ може имати шире импликације на неуропсихијатријске исходе након повреда. Потребне су даље анализе како би се разјаснили прецизни механизми који повезују промене у опиоидним и ноцицептивним рецепторима са бихевиоралним исходима, што би могло допринети развоју нових терапијских стратегија за управљање посттрауматским неуролошким и психолошким последицама.

Благотворна улога промена у мелатонинском систему, како на периферном нивоу, тако и на нивоу кичмене мождине, претходно је документована у истраживањима на неуропатским пацовима коришћењем модела термалне ноцицептивне хиперсензитивности. (121). Хипоалгезијски ефекат МТ1 и МТ2 рецептора додатно је потврђен у ранијим студијама (122), при чему је прецизно дефинисан и механизам њиховог деловања преко мелатонин-МТ1-РКСγ сигналног пута. Ова открића указују на значај мелатонинског система у модулатији ноцицептивних сигнала и потенцијално отварају нове терапијске могућности за управљање неуропатским болом. Познато је да су МТ1 и МТ2 рецептори изражени у значајној мери у кичменој мождини, што додатно подржава хипотезу о њиховој улози у регулацији бола. Њихова активација може допринети модулатији ноцицептивних путева путем интеракције са кључним интрацелуларним сигналним молекулама, укључујући протеин киназу С гама (РКСγ), што може имати импликације на пластичност кичмене мождине и адаптивне одговоре на болне стимулансе. Додатна истраживања су потребна како би се детаљно разјаснили молекуларни механизми путем којих мелатонински рецептори доприносе аналгезији, као и како би се проценила њихова клиничка примена у третману хроничног бола и неуропатских стања (123).

Повећање функционалности неуропептидног Y (NPY) система у кичменој моздини након повреде претходно је описано и повезано са интернализацијом Y1 рецептора, што је такође потврђено у контексту инфламаторних процеса. Ове промене сугеришу да NPY систем игра кључну улогу у неуробиолошким адаптацијама након повреде, посебно у модулацији ноцицептивних сигнала и инфламаторних одговора. Интернализација Y1 рецептора може представљати механизам којим организам регулише претерану активацију овог сигналног пута, потенцијално смањујући преосетљивост на болне стимулансе и ограничавајући инфламаторну реакцију ([124,125](#)).

Будући да је NPY познат по својим аналгетским и неуропротективним својствима, повећана експресија овог пептида у кичменој моздини може имати значајну улогу у ендогеним механизмима опоравка након повреде. Осим тога, регулација Y1 рецептора може бити од кључног значаја за разумевање интеракције између неуропептидних и класичних неуротрансмитерских система у модулацији бола и инфламације. Нове студије су неопходне како би се разјаснила специфична улога NPY система у различитим врстама повреда, као и његова потенцијална примена у терапијским стратегијама за ублажавање неуропатског и инфламаторног бола. Поред улоге Y1 рецептора, антиноцицептивно дејство путем Y2 рецептора такође је описано у експерименталним моделима акутног бола. Ова открића указују на комплексну улогу NPY система у модулацији ноцицептивних процеса, при чему оба рецептора - Y1 и Y2 – учествују у регулацији преноса болних импулса на нивоу кичмене моздине. Док се Y1 рецептор углавном повезује са брзим одговорима на повреду и инфламацију, Y2 рецептор је често укључен у дугорочну модулацију ноцицепције, потенцијално путем инхибиције пресинаптичког ослобађања неуротрансмитера и смањења ексцитабилности неурона који преносе болне сигнале.

Ове интеракције између Y1 и Y2 рецептора могу допринети ендогеним механизмима заштите од прекомерне ноцицептивне стимулације, што би могло имати импликације за развој нових терапијских приступа у третману акутног и хроничног бола. Како би се боље разумели специфични путеви преко којих NPY систем остварује своје аналгетске ефекте, као и потенцијална селективна активација ових рецептора у клиничком контексту, нужно је спровести додатне анализе ([39](#)).

## **6. Закључак**

Савремена истраживања усмерена на примену суплементације антиоксидансима, као и хипербаричне оксигенације у лечењу пацијената са тешким опекотинама, показала су значајне бенефите у различитим аспектима опоравка. Конкретно, ови модалитети терапије допринели су убрзању процеса зарастања рана, побољшању репаративних механизма ткива и смањењу инфламаторног одговора, што се у коначници одразило на смањење морталитета код пацијената са тешким термичким повредама.

Хипербарична оксигенација, као терапијски приступ који подразумева излагање организма повећаном притиску кисеоника, доказано побољшава оксигенацију ткива, стимулише ангиогенезу и редукује оксидативни стрес, чиме се оптимизују услови за зарастање опекотинских рана. Паралелно с тим, суплементација антиоксидансима игра кључну улогу у неутрализацији реактивних кисеоничних врста које настају услед оксидативног стреса индукованог термалним повредама. Кумулативни ефекат ових терапијских стратегија огледа се у смањењу системске инфламације, редукцији секундарног оштећења ткива и превенцији компликација повезаних са тешким опекотинама.

На основу добијених резултата, можемо закључити да истовремена примена хипербаричне оксигенације и суплементације антиоксидансима представља ефикасан терапијски приступ у третману термалних повреда коже. Посебан значај ових метода огледа се у њиховој способности да ублаже болне сензације које прате ову врсту трауме, што може имати значајне импликације на квалитет живота пацијената и постоперативни опоравак.

Међутим, с обзиром на то да у овомистраживању није уочена статистички значајна разлика у ефектима појединачних терапијских модалитета, док је истовремена примена хипербаричне оксигенације и суплементације антиоксидансима резултирала значајним ублажавањем симптома и побољшањем исхода лечења, неопходна су даља истраживања како би се детаљно објаснили адитивни и међусобно повезани механизми деловања ових терапијских стратегија.

Могуће је да синергијски ефекти комбиноване терапије произилазе из комплементарних механизма деловања ових третмана на ћелијском и молекуларном нивоу. Хипербарична оксигенација може повећати биодоступност кисеоника у хипоксичним ткивима, што подстиче неоваскуларизацију, убрзава епителизацију и смањује инфламаторни одговор, док суплементација антиоксидансима може ограничити оштећења изазвана оксидативним стресом и побољшати ћелијску хомеостазу. Њихова истовремена примена може допринети оптимизацији репаративних процеса кроз модулацију инфламаторних путева, побољшање митохондријске функције и регулацију апоптотских процеса, што све заједно резултира бољим клиничким исходима у третману тешких термалних повреда.

Будућа истраживања требало би да се фокусирају на идентификацију специфичних биомаркера који одражавају ефекте ове комбиноване терапије, као и на детаљнију анализу фармакодинамичких и фармакокинетичких интеракција између хипербаричне оксигенације и антиоксидативних агенаса. Разумевање ових сложених механизма могло би допринети даљој оптимизацији протокола лечења опекотинских повреда и развоју нових, још ефикаснијих терапијских приступа.

## **7. Литература**

1. Roshangar L, Soleimani Rad J, Kheirjou R, Reza Ranjkesh M, Ferdowsi Khosroshahi A. Skin Burns: Review of Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Wounds*. 2019 Dec;31(12):308–15.
2. Brusselaers N, Monstrey S, Vogelaers D, Hoste E, Blot S. Severe burn injury in Europe: a systematic review of the incidence, etiology, morbidity, and mortality. *Crit Care*. 2010;14(5):R188.
3. Evers LH, Bhavsar D, Mailänder P. The biology of burn injury. *Exp Dermatol*. 2010 Sep;19(9):777–83.
4. Goei H, Hop MJ, van der Vlies CH, Nieuwenhuis MK, Polinder S, Middelkoop E, et al. Return to work after specialised burn care: A two-year prospective follow-up study of the prevalence, predictors and related costs. *Injury*. 2016 Sep;47(9):1975–82.
5. Brink C, Isaacs Q, Scriba MF, Nathire MEH, Rode H, Martinez R. Infant burns: A single institution retrospective review. *Burns*. 2019 Nov;45(7):1518–27.
6. Walker NJ, King KC. Acute and Chronic Thermal Burn Evaluation and Management. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Jun 3]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430730/>
7. Peck MD. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. *Burns*. 2011 Nov;37(7):1087–100.
8. Warby R, Maani CV. Burn Classification. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Jun 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539773/>
9. American Burn Association/American College of Surgeons. Guidelines for the operation of burn centers. *J Burn Care Res*. 2007;28(1):134–41.
10. Thorne CH. Grabb and Smith's Plastic Surgery. 7th ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins; 2014. Vol. 15. p. 148–150.
11. Moore RA, Popowicz P, Burns B. Rule of Nines. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Jun 15]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513287/>
12. Schaefer TJ, Szymanski KD. Burn Evaluation and Management(Archived). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Jun 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430741/>
13. Hettiaratchy S, Dziewulski P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. *BMJ*. 2004 Jun 12;328(7453):1427–9.
14. Schwacha MG. Macrophages and post-burn immune dysfunction. *Burns*. 2003 Feb;29(1):1–14.
15. Nielson CB, Duethman NC, Howard JM, Moncure M, Wood JG. Burns: Pathophysiology of Systemic Complications and Current Management. *J Burn Care Res*. 2017;38(1):e469–81.
16. Agay D, Andriollo-Sanchez M, Claeysen R, Touvard L, Denis J, Roussel AM, et al. Interleukin-6, TNF-alpha and interleukin-1 beta levels in blood and tissue in severely

- burned rats. *Eur Cytokine Netw*. 2008 Mar;19(1):1–7.
17. Shpichka A, Butnaru D, Bezrukov EA, Sukhanov RB, Atala A, Burdukovskii V, et al. Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Mar 15;10(1):94.
  18. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*. 2009;37(5):1528–42.
  19. Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *J Chin Med Assoc*. 2018 Feb;81(2):94–101.
  20. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev*. 2019 Jan 1;99(1):665–706.
  21. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012;49(1):35–43.
  22. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol*. 2020 Sep;10(9):200223.
  23. Swieboda P, Filip R, Prystupa A, Drozd M. Assessment of pain: types, mechanism and treatment. *Ann Agric Environ Med*. 2013;Spec no. 1:2–7.
  24. Guirimand F, Le Bars D. [Physiology of nociception]. *Ann Fr Anesth Reanim*. 1996;15(7):1048–79.
  25. Chaouch A, Besson JM. [Peripheral and spinal mechanisms of nociception]. *Rev Neurol (Paris)*. 1986;142(3):173–200.
  26. Bourne S, Machado AG, Nagel SJ. Basic anatomy and physiology of pain pathways. *Neurosurg Clin N Am*. 2014 Oct;25(4):629–38.
  27. Institute of Medicine (US) Committee on Pain, Disability, and Chronic Illness Behavior. Pain and Disability: Clinical, Behavioral, and Public Policy Perspectives [Internet]. Osterweis M, Kleinman A, Mechanic D, editors. Washington (DC): National Academies Press (US); 1987 [cited 2025 Jun 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK219254/>
  28. Lipp J. Possible mechanisms of morphine analgesia. *Clin Neuropharmacol*. 1991 Apr;14(2):131–47.
  29. Cullen JM, Cascella M. Physiology, Enkephalin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Jun 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557764/>
  30. Morgan MM, Christie MJ. Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *British Journal of Pharmacology*.

- 2011;164(4):1322–34.
31. Trigo JM, Martín-García E, Berrendero F, Robledo P, Maldonado R. The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction. *Drug Alcohol Depend.* 2010 May 1;108(3):183–94.
  32. Wang Y, Zhuang Y, DiBerto JF, Zhou XE, Schmitz GP, Yuan Q, et al. Structures of the entire human opioid receptor family. *Cell.* 2023 Jan 19;186(2):413–427.e17.
  33. Wu ZS, Wu SH, Lee SS, Lin CH, Chang CH, Lo JJ, et al. Dose-Dependent Effect of Hyperbaric Oxygen Treatment on Burn-Induced Neuropathic Pain in Rats. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 20;20(8):1951.
  34. Wang Y, Gupta M, Poonawala T, Farooqui M, Li Y, Peng F, et al. Opioids and opioid receptors orchestrate wound repair. *Transl Res.* 2017 Jul;185:13–23.
  35. Srinivasan V, Zakaria R, Jeet Singh H, Acuna-Castroviejo D. Melatonin and its agonists in pain modulation and its clinical application. *Arch Ital Biol.* 2012 Dec;150(4):274–89.
  36. De Gregorio D, Comai S. Acute and Chronic Pain Preclinical Models to Study the Analgesic Properties of Melatonergic Compounds. *Methods Mol Biol.* 2022;2550:453–61.
  37. Kuthati Y, Lin SH, Chen IJ, Wong CS. Melatonin and their analogs as a potential use in the management of Neuropathic pain. *J Formos Med Assoc.* 2019 Aug;118(8):1177–86.
  38. Diaz-delCastillo M, Christiansen SH, Appel CK, Falk S, Woldbye DPD, Heegaard AM. Neuropeptide Y is Up-regulated and Induces Antinociception in Cancer-induced Bone Pain. *Neuroscience.* 2018 Aug 1;384:111–9.
  39. Smith PA, Moran TD, Abdulla F, Tumber KK, Taylor BK. Spinal mechanisms of NPY analgesia. *Peptides.* 2007 Feb;28(2):464–74.
  40. Graefe SB, Rahimi N, Mohiuddin SS. Biochemistry, Substance P. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Jun 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554583/>
  41. Jeschke MG, van Baar ME, Choudhry MA, Chung KK, Gibran NS, Logsetty S. Burn injury. *Nat Rev Dis Primers.* 2020 Feb 13;6(1):11.
  42. Schaefer TJ, Nunez Lopez O. Burn Resuscitation and Management(Archived). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Jun 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430795/>
  43. Żwierzeło W, Piorun K, Skórka-Majewicz M, Maruszewska A, Antoniewski J, Gutowska I. Burns: Classification, Pathophysiology, and Treatment: A Review. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 13;24(4):3749.

44. Mulder PPG, Vlig M, Fasse E, Stoop MM, Pijpe A, van Zuijlen PPM, et al. Burn-injured skin is marked by a prolonged local acute inflammatory response of innate immune cells and pro-inflammatory cytokines. *Front Immunol*. 2022;13:1034420.
45. Xiao M, Li L, Li C, Zhang P, Hu Q, Ma L, et al. Role of autophagy and apoptosis in wound tissue of deep second-degree burn in rats. *Acad Emerg Med*. 2014 Apr;21(4):383–91.
46. Sahib AS, Al-Jawad FH, Alkaisy AA. Effect of antioxidants on the incidence of wound infection in burn patients. *Ann Burns Fire Disasters*. 2010 Dec 31;23(4):199–205.
47. Alyafi T, Al-Marzouki AHH, Al Hassani AN. Therapeutic Outcome of Burn Patients Treated With Hyperbaric Oxygen. *Cureus*. 2021 Oct;13(10):e18671.
48. Pruteanu LL, Bailey DS, Grădinaru AC, Jäntschi L. The Biochemistry and Effectiveness of Antioxidants in Food, Fruits, and Marine Algae. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Apr 2;12(4):860.
49. Al-Jawad FH, Sahib AS, Al-Kaisy AA. Role of antioxidants in the treatment of burn lesions. *Ann Burns Fire Disasters*. 2008 Dec 31;21(4):186–91.
50. Laspro M, Wei LW, Brydges HT, Gorenstein SA, Huang ET, Chiu ES. Hyperbaric Oxygen Therapy Regimens, Treated Conditions, and Adverse Effect Profile: an Undersea and Hyperbaric Medical Society Survey Study. *Undersea Hyperb Med*. 2024;51(4):369–76.
51. Kasprzyk-Kucewicz T, Cholewka A, Englisz-Jurgielewicz B, Mucha R, Relich M, Kawecki M, et al. Thermal Effects of Topical Hyperbaric Oxygen Therapy in Hard-to-Heal Wounds-A Pilot Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Jun 23;18(13):6737.
52. Camporesi EM, Bosco G. Mechanisms of action of hyperbaric oxygen therapy. *Undersea Hyperb Med*. 2014;41(3):247–52.
53. Haltern C, Siekmann UP, Rump AF, Rossaint R. [Hyperbaric oxygen therapy (HBO): current standing]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2000 Aug;35(8):487–502.
54. DuBose KJ, Cooper JS. Hyperbaric Patient Selection. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Jun 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499820/>
55. Chiang IH, Chen SG, Huang KL, Chou YC, Dai NT, Peng CK. Adjunctive hyperbaric oxygen therapy in severe burns: Experience in Taiwan Formosa Water Park dust explosion disaster. *Burns*. 2017 Jun;43(4):852–7.
56. Cianci P, Lueders HW, Lee H, Shapiro RL, Sexton J, Williams C, et al. Adjunctive hyperbaric oxygen therapy reduces length of hospitalization in thermal burns. *J Burn Care*

- Rehabil. 1989;10(5):432–5.
57. Smolle C, Lindenmann J, Kamolz L, Smolle-Juettner FM. The History and Development of Hyperbaric Oxygenation (HBO) in Thermal Burn Injury. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Jan 8;57(1):49.
  58. Kisić BB, Mirić D, Dragojević M, Dragojević I. Reactive oxygen species. *Praxis medica*. 2006;34(1–2):73–8.
  59. Jakubczyk K, Dec K, Kałduńska J, Kawczuga D, Kochman J, Janda K. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkur Lekarski*. 2020 Apr 22;48(284):124–7.
  60. Rezayian M, Niknam V, Ebrahimzadeh H. Oxidative damage and antioxidative system in algae. *Toxicol Rep*. 2019;6:1309–13.
  61. Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2018;12(3):88–93.
  62. Scibior D, Czczot H. [Catalase: structure, properties, functions]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2006;60:170–80.
  63. Averill-Bates DA. The antioxidant glutathione. *Vitam Horm*. 2023;121:109–41.
  64. Fitzmaurice SD, Sivamani RK, Isseroff RR. Antioxidant therapies for wound healing: a clinical guide to currently commercially available products. *Skin Pharmacol Physiol*. 2011;24(3):113–26.
  65. Zhang MJ, Wang QF, Gao LX, Jin H, Wang ZY. Comparative observation of the changes in serum lipid peroxides influenced by the supplementation of vitamin E in burn patients and healthy controls. *Burns*. 1992 Feb;18(1):19–21.
  66. Barbosa E, Faintuch J, Machado Moreira EA, Gonçalves da Silva VR, Lopes Pereira MJ, Martins Fagundes RL, et al. Supplementation of vitamin E, vitamin C, and zinc attenuates oxidative stress in burned children: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Burn Care Res*. 2009;30(5):859–66.
  67. Campos ACL, Groth AK, Branco AB. Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008 May;11(3):281–8.
  68. Viaña-Mendieta P, Sánchez ML, Benavides J. Rational selection of bioactive principles for wound healing applications: Growth factors and antioxidants. *Int Wound J*. 2022 Jan;19(1):100–13.
  69. Rehou S, Shahrokhi S, Natanson R, Stanojcic M, Jeschke MG. Antioxidant and Trace Element Supplementation Reduce the Inflammatory Response in Critically Ill Burn

- Patients. *J Burn Care Res.* 2018 Jan 1;39(1):1–9.
- 3
70. Criollo-Mendoza MS, Contreras-Angulo LA, Leyva-López N, Gutiérrez-Grijalva EP, Jiménez-Ortega LA, Heredia JB. Wound Healing Properties of Natural Products: Mechanisms of Action. *Molecules.* 2023 Jan 6;28(2):598.
- 3
71. Comino-Sanz IM, López-Franco MD, Castro B, Pancorbo-Hidalgo PL. The Role of Antioxidants on Wound Healing: A Review of the Current Evidence. *J Clin Med.* 2021 Aug 13;10(16):3558.
72. Al-Kaisy AA, Salih Sahib A, Al-Biati H a. HK. Effect of zinc supplement in the prognosis of burn patients in iraq. *Ann Burns Fire Disasters.* 2006 Sep 30;19(3):115–22.
- 3
73. Ramana KV, Reddy ABM, Majeti NVRK, Singhal SS. Therapeutic Potential of Natural Antioxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:9471051.
74. Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology.* 2003 Jul 15;189(1–2):75–88.
75. Katanić J, Boroja T, Mihailović V, Nikles S, Pan SP, Rosić G, et al. In vitro and in vivo assessment of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) as anti-inflammatory agent. *J Ethnopharmacol.* 2016 Dec 4;193:627–36.
76. Savina T, Lisun V, Feduraev P, Skrypnik L. Variation in Phenolic Compounds, Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts from Different Plant Organs of Meadowsweet (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.). *Molecules.* 2023 Apr 16;28(8):3512.
- 4
77. Katanić J, Boroja T, Stanković N, Mihailović V, Mladenović M, Kreft S, et al. Bioactivity, stability and phenolic characterization of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. *Food Funct.* 2015 Apr;6(4):1164–75.
- 2
78. Samardžić S, Arsenijević J, Božić D, Milenković M, Tešević V, Maksimović Z. Antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench. *J Ethnopharmacol.* 2018 Mar 1;213:132–7.
- 4
79. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 2011 Jun;82(4):513–23.
- 4
80. Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(1):19–21.
81. Vinaik R, Aijaz A, Jeschke MG. Small animal models of thermal injury. *Methods Cell Biol.* 2022;168:161–89.
- 2
82. Brkic P, Stojiljkovic M, Jovanovic T, Dacic S, Lavrnja I, Savic D, et al. Hyperbaric oxygenation improves locomotor ability by enhancing neuroplastic responses after cortical ablation in rats. *Brain Inj.* 2012;26(10):1273–84.

83. Arsenijevic N, Selakovic D, Katanic Stankovic JS, Mihailovic V, Mitrovic S, Milenkovic J, et al. Variable neuroprotective role of *Filipendula ulmaria* extract in rat hippocampus. *J Integr Neurosci*. 2021 Dec 30;20(4):871–83.
- 4 84. Rosic G, Joksimovic J, Selakovic D, Milovanovic D, Jakovljevic V. Anxiogenic effects of chronic exposure to nandrolone decanoate (ND) at supraphysiological dose in rats: a brief report. *Neuro Endocrinol Lett*. 2014;35(8):703–10.
85. Katanić J, Matić S, Pferschy-Wenzig EM, Kretschmer N, Boroja T, Mihailović V, et al. *Filipendula ulmaria* extracts attenuate cisplatin-induced liver and kidney oxidative stress in rats: In vivo investigation and LC-MS analysis. *Food Chem Toxicol*. 2017 Jan;99:86–102.
86. Katanić J, Pferschy-Wenzig EM, Mihailović V, Boroja T, Pan SP, Nikles S, et al. Phytochemical analysis and anti-inflammatory effects of *Filipendula vulgaris* Moench extracts. *Food Chem Toxicol*. 2018 Dec;122:151–62.
87. Bannon AW, Malmberg AB. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2007 Oct;Chapter 8:Unit 8.9.
- 2 88. Guo HF, Abd Hamid R, Mohd Ali R, Chang SK, Rahman MH, Zainal Z, et al. Healing Properties of Epidermal Growth Factor and Tocotrienol-Rich Fraction in Deep Partial-Thickness Experimental Burn Wounds. *Antioxidants* (Basel). 2020 Feb 3;9(2):130
89. Hadi AM, Mouchaers KTB, Schaliq I, Grunberg K, Meijer GA, Vonk-Noordegraaf A, et al. Rapid quantification of myocardial fibrosis: A new macro-based automated analysis. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2010;33(5):257–69.
90. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001 Aug;23(4):291–9.
91. Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, et al. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem*. 2014 Oct;62(10):751–8.
- 1 92. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
93. Fu H, Li F, Thomas S, Yang Z. Hyperbaric oxygenation alleviates chronic constriction injury (CCI)-induced neuropathic pain and inhibits GABAergic neuron apoptosis in the spinal cord. *Scand J Pain*. 2017 Oct;17:330–8.
- 1 94. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007 May;39(2):175–91.
95. Lehmann EL, D’Abrera HJM. *Nonparametrics: Statistical Methods Based on Ranks*. New

- York, NY: Springer; 2006. 479 p.
96. Guo HF, Mohd Ali R, Abd Hamid R, Chang SK, Zainal Z, Khaza'ai H. A new histological score grade for deep partial-thickness burn wound healing process. *Int J Burns Trauma*. 2020;10(5):218–24.
  97. Sanchez IR, Swaim SF, Nusbaum KE, Hale AS, Henderson RA, McGuire JA. Effects of chlorhexidine diacetate and povidone-iodine on wound healing in dogs. *Vet Surg*. 1988;17(6):291–5.
  98. Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth*. 1995 Aug;75(2):125–31.
  99. Griggs C, Goverman J, Bittner EA, Levi B. Sedation and Pain Management in Burn Patients. *Clin Plast Surg*. 2017 Jul;44(3):535–40.
  100. Korn HN, Wheeler ES, Miller TA. Effect of hyperbaric oxygen on second-degree burn wound healing. *Arch Surg*. 1977 Jun;112(6):732–7.
  101. Shoshani O, Shupak A, Barak A, Ullman Y, Ramon Y, Lindenbaum E, et al. Hyperbaric oxygen therapy for deep second degree burns: an experimental study in the guinea pig. *Br J Plast Surg*. 1998 Jan;51(1):67–73.
  102. Hatibie MJ, Islam AA, Hatta M, Moenadjat Y, Susilo RH, Rendy L. Hyperbaric Oxygen Therapy for Second-Degree Burn Healing: An Experimental Study in Rabbits. *Adv Skin Wound Care*. 2019 Mar;32(3):1–4.
  103. Vinha PP, Martinez EZ, Vannucchi H, Marchini JS, Farina JA, Jordao AA, et al. Effect of acute thermal injury in status of serum vitamins, inflammatory markers, and oxidative stress markers: preliminary data. *J Burn Care Res*. 2013;34(2):e87-91.
  104. Csontos C, Rezman B, Foldi V, Bogar L, Drenkovics L, Röth E, et al. Effect of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress and inflammation after severe burn. *Burns*. 2012 May;38(3):428–37.
  105. Sterling JP, Lombardi VC. Decreasing the Likelihood of Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Burn Injury with Early Antioxidant Treatment. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Jul 26;10(8):1192.
  106. Petrikonis K, Bernatoniene J, Kopustinskiene DM, Casale R, Davinelli S, Saso L. The Antinociceptive Role of Nrf2 in Neuropathic Pain: From Mechanisms to Clinical Perspectives. *Pharmaceutics*. 2024 Aug 15;16(8):1068.
  107. Wijaya IP, Rusly Hariantana Hamid AR, Bagus Mahadewa TG, Putu Hendra Sanjaya IG, Suka Adnyana IM, Suyasa IK. Supplementation of high-dose ascorbic acid reduces necrosis on random dorsal skin flap in rats. *International Journal of Surgery Open*. 2022 Sep 1;46:100525.

108. <sup>2</sup> Hobson R. Vitamin E and wound healing: an evidence-based review. *Int Wound J*. 2016 Jun;13(3):331–5.
109. <sup>2</sup> Abbaszadeh A, Tehmasebi-Foolad A, Rajabzadeh A, Beigi-Brojeni N, Zarei L. Effects of Chitosan/Nano Selenium Biofilm on Infected Wound Healing in Rats; An Experimental Study. *Bull Emerg Trauma*. 2019 Jul;7(3):284–91.
110. Goorani S, Zangeneh MM, Koohi MK, Seydi N, Zangeneh A, Souri N, et al. Assessment of antioxidant and cutaneous wound healing effects of *Falcaria vulgaris* aqueous extract in Wistar male rats. *Comparative Clinical Pathology* [Internet]. 2018 [cited 2025 Jun 12]; Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85056638636&doi=10.1007%2fs00580-018-2866-3&partnerID=40&md5=8a09da80f4fa875329b682f737ff32c1>
111. Ahmad SU, Binti Aladdin NA, Jamal JA, Shuid AN, Mohamed IN. <sup>2</sup> Evaluation of Wound-Healing and Antioxidant Effects of *Marantodes pumilum* (Blume) Kuntze in an Excision Wound Model. *Molecules*. 2021 Jan 5;26(1):228.
112. Khalil R, Yahya G, Abdo WS, El-Tanbouly GS, Johar D, Abdel-Halim MS, et al. Emerging Approach for the Application of *Hibiscus sabdariffa* Extract Ointment in the Superficial Burn Care. *Scientia Pharmaceutica*. 2022 Sep;90(3):41.
113. <sup>2</sup> Li L, Chen J, Li YQ. The Downregulation of Opioid Receptors and Neuropathic Pain. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 22;24(6):5981.
114. Gibbons CR, Liu S, Zhang Y, Sayre CL, Levitch BR, Moehlmann SB, et al. Involvement of brain opioid receptors in the anti-allodynic effect of hyperbaric oxygen in rats with sciatic nerve crush-induced neuropathic pain. *Brain Res*. 2013 Nov 6;1537:111–6.
115. <sup>2</sup> Martínez-Navarro <sup>2</sup>1, Cabañero D, Wawrzczak-Bargiela A, Robe A, Gavériaux-Ruff C, Kieffer BL, et al. Mu and delta opioid receptors play opposite nociceptive and behavioural roles on nerve-injured mice. *Br J Pharmacol*. 2020 Mar;177(5):1187–205.
116. <sup>2</sup> Ueda M, Hirose M, Takei N, Ibuki T, Naruse Y, Iyata Y, et al. Foot Hyperalgesia after Thoracic Burn Injury. *Acta Histochemica Et Cytochemica*. 2001;34(6):441–50.
117. <sup>2</sup> Osgood PF, Murphy JL, Carr DB, Szyfelbein SK. Increases in plasma beta-endorphin and tail flick latency in the rat following burn injury. *Life Sci*. 1987 Feb 9;40(6):547–54.
- 118 <sup>2</sup> Peciña M, Karp JF, Mathew S, Todtenkopf MS, Ehrich EW, Zubieta JK. Endogenous opioid system dysregulation in depression: implications for new therapeutic approaches. *Mol Psychiatry*. 2019 Apr;24(4):576–87.
- 119 <sup>2</sup> Ferdousi MI, Calcagno P, Clarke M, Aggarwal S, Sanchez C, Smith KL, et al. Hyporesponsivity to mu-opioid receptor agonism in the Wistar-Kyoto rat model of altered

- nociceptive responding associated with negative affective state. *Pain*. 2021 Feb 1;162(2):405–20.
120. Wang L, Hou K, Wang H, Fu F, Yu L. Role of mu-opioid receptor in nociceptive modulation in anterior cingulate cortex of rats. *Mol Pain*. 2020;16:1744806920966144.
121. Borsani E, Buffoli B, Bonazza V, Reiter RJ, Rezzani R, Rodella LF. Single Administration of Melatonin Modulates the Nitroxidergic System at the Peripheral Level and Reduces Thermal Nociceptive Hypersensitivity in Neuropathic Rats. *Int J Mol Sci*. 2017 Oct 14;18(10):2143.
122. Piano I, Baba K, Claudia Gargini null, Tosini G. Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate the scotopic electroretinogram via PKC $\zeta$  in mice. *Exp Eye Res*. 2018 Dec;177:50–4.
123. Zahn PK, Lansmann T, Berger E, Speckmann EJ, Musshoff U. Gene expression and functional characterization of melatonin receptors in the spinal cord of the rat: implications for pain modulation. *J Pineal Res*. 2003 Aug;35(1):24–31.
124. Marvizon JC, Chen W, Fu W, Taylor BK. Neuropeptide Y release in the rat spinal cord measured with Y1 receptor internalization is increased after nerve injury. *Neuropharmacology*. 2019 Nov 1;158:107732.
125. Taiwo OB, Taylor BK. Antihyperalgesic effects of intrathecal neuropeptide Y during inflammation are mediated by Y1 receptors. *Pain*. 2002 Apr;96(3):353–63

## **8. Скраћенице**

**WHO** - енгл. World Health Organization, Светска здравствена организација,  
**ABA** - енгл. American Burn Association, Америчко удружење за лечење опекотина,  
**ROS**- енгл. reactive oxygen species, слободни кисеонични радикали,  
**IL**- енгл. Interleukins, интерлеукини,  
**TNF $\alpha$**  - енгл. tumor necrosis factor- $\alpha$ , фактор некрозе тумора- $\alpha$ ,  
**TGF $\beta$** - енгл. Transforming Growth Factor- $\beta$ , трансформишући фактор раста- $\beta$ ,  
**Bax**- енгл. Bcl-2-associated X protein, Bcl-2 удружени X протеин,  
**Bcl-2** - енгл. B-cell lymphoma 2, Лимфом В хелија 2,  
**IFN $\gamma$**  - енгл. Interferon- $\gamma$ , интерферон- $\gamma$ ,  
**bFGF** - енгл. Basic fibroblast growth factor, основни фибробластни фактор раста,  
**PDGF** - енгл. Platelet-derived growth factor, тромбоцитни фактор раста,  
**VEGF** - енгл. Vascular endothelial growth factor, васкуларни ендотелни фактор раста,  
**ECM** - енгл. Extracellular matrix, екстрацелуларни матрикс,  
 **$\mu$ OR**- енгл.  $\mu$  opioid receptors,  $\mu$  опиоидни рецептори,  
 **$\delta$ OR** - енгл.  $\delta$  opioid receptors,  $\delta$  опиоидни рецептори,  
 **$\kappa$ OR** - енгл.  $\kappa$  opioid receptors,  $\kappa$  опиоидни рецептори,  
**NOPR** - енгл. nociceptin receptors, ноцицептин рецептори,  
**MT1** - енгл. melatonin receptor 1, рецептор мелатонина 1,  
**MT2** - енгл. melatonin receptor 2, рецептор мелатонина 2,  
**NPY**- енгл. neuropeptide Y, неуропептид Y,  
**NK1R**- енгл. neurokinin-1 receptor, неурокинин-1 рецептор,  
**CGRP**- енгл. calcitonin gene-related peptide, пептид повезан са геном калцитонина,  
**PMNs**- енгл. Polymorphonuclear leukocytes, полиморфонуклеарни леукоцити,  
**MOF**- енгл. multiple organ failure, мултиорганска дисфункција,  
**ХБО**- енгл. Hyperbaric oxygen therapy, хипербарична терапија кисеоником,  
**UHMS** - енгл. The Undersea and Hyperbaric Medical Society, удружење за подморску и хипербаричну медицину,  
**AGF**- енгл. Angiogenic growth factor, ангиогени фактор раста,  
**MDGF**- енгл. Macrophage-Derived Growth Factor, фактор раста макрофага,  
**SOD**- енгл. superoxide dismutase, супероксид димутаза,  
**CAT**- енгл. catalase, каталаза,  
**GPx**- енгл. glutathione peroxidase, глутатион пероксидаза,  
**GR**- енгл. glutathione reductase, глутатион редуктаза,  
**GSH** - енгл. glutathione, глутатион,  
**GSSH** - енгл. glutathione disulfide, глутатион дисуфид,  
**MDA**- енгл. malondialdehyde, малондиалдехид,  
**FU** – лат. Filipendula ulmaria (L.) Maxim, медуника,  
**TBARS** – енгл. Thiobarbituric acid reactive substances, индекс липидне пероксидације,  
**RNA**- енгл. Ribonucleic acid, рибонуклеинска киселина,  
**BSP**- енгл. 1-Bromo-3-chloropropane, бромхлорпропан,  
**cdNA**- енгл. Complementary DNA, комплементарна ДНК,  
**PCR**- енгл. Polymerase Chain Reaction, ланчана реакција полимеразе,  
**qRT-PCR**– енгл. Quantitative Real Time-PCR, квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену,  
**KGF**– енгл. Keratinocyte growth factor, фактор раста кератиноцита,  
**EGF**- енгл. Epidermal growth factor, епидермални фактор раста,

**PBS**– енгл. Phosphate Buffered Saline, раствор фосфатног пуфера,  
**HRP**– енгл. Horseradish peroxidase, пероксидаза рена,  
**DMSO**– енгл. Dimethyl sulfoxide , диметил сулфоксид,  
**HC**- High Control,  
**OD**- коригована апсорпција,  
**ddH<sub>2</sub>O**– душло дестилована вода,  
**XO**– енгл. Xanthine oxidase, ксантин оксидаза,  
**WST**– енгл. Water-soluble tetrazolium, хидросолубилни тетразолијум,  
**BHT**– енгл. Butylated hydroxytoluene, бутил хидрокситолуен,  
**TBA**– енгл. Thiobarbituric acid, тиобарбитурне киселина

## Биографија аутора

Рођен 27.10.1992. године у Ћуприји, Република Србија, где је завршио основну школу "13. октобар" и гимназију у Ћуприји. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписао је 2011. године, а завршио у септембру 2017.године. У октобру 2018. год. уписује Докторске академске студије, на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, смер експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Од септембра 2018.године запослен у ОБ Ћуприја, на одељењу Опекотина, пластичне и реконструктивне хирургије. У априлу 2019. године уписао специјализацију из области Пластичне, реконструктивне и естетске хирургије на Медицинском факултету Универзитета у Београду. 30.1.2025. године положио специјалистички испит са одличном оценом и стекао звање специјалисте пластичне, реконструктивне и естетске хирургије. Члан већег броја струковних и професионалних удружења. Интересовање за научно истраживачки рад показује од студентских дана, као активни учесник бројних студентских конференција у земљи и иностранству, као и студентских размена у Мексику, Републици Чешкој, Шпанији и Италији.

Образац 1

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

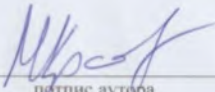
„Ефекти истовремене примене хипербаричне терапије кисеоником и екстракта биљке *Filipendula ulmaria (L.) Maxim.* у експерименталном моделу термичке повреде коже пацова“

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица.

У Крагујевцу, 2025. године,

  
\_\_\_\_\_  
потпис аутора

Образац 2

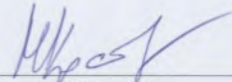
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

„Ефекти истовремене примене хипербаричне терапије кисеоником и екстракта биљке  
*Filipendula ulmaria (L.) Maxim.* у експерименталном моделу термичке повреде коже  
пацова”

истоветне.

У Крагујевцу, 2025. године,



---

потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Милош Крстић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Ефекти истовремене примене хипербаричне терапије кисеоником и екстракта биљке *Filipendula ulmaria (L.) Maxim.* у експерименталном моделу термичке повреде коже пацова”

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

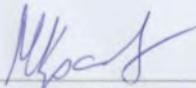
не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу, 2025. године,

  
\_\_\_\_\_  
потпис аутора

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од поменутих лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

# Ефекти истовремене примене хипербаричне терапије кисеоником и екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. у експерименталном моделу термичке повреде коже пацова

## ORIGINALITY REPORT

# 10%

SIMILARITY INDEX

## PRIMARY SOURCES

|   |  |                 |
|---|--|-----------------|
| 1 | <a href="http://fedorakg.kg.ac.rs">fedorakg.kg.ac.rs</a><br>Internet             | 1471 words — 5% |
| 2 | <a href="http://www.mdpi.com">www.mdpi.com</a><br>Internet                       | 626 words — 2%  |
| 3 | <a href="http://casopisi.junis.ni.ac.rs">casopisi.junis.ni.ac.rs</a><br>Internet | 347 words — 1%  |
| 4 | <a href="http://nardus.mpn.gov.rs">nardus.mpn.gov.rs</a><br>Internet             | 221 words — 1%  |
| 5 | <a href="http://ouci.dntb.gov.ua">ouci.dntb.gov.ua</a><br>Internet               | 193 words — 1%  |

EXCLUDE QUOTES OFF

EXCLUDE BIBLIOGRAPHY OFF

EXCLUDE SOURCES < 1%

EXCLUDE MATCHES < 9 WORDS