

Učinak kemferola na zacjeljivanje rana

Grigić Škrlec, Ivana

Postgraduate specialist thesis / Završni specijalistički

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:070304>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Grigić

UČINAK KEMFEROLA NA ZACJELJIVANJE RANA

Specijalistički rad

Zagreb, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Grigić

UČINAK KEMFEROLA NA ZACJELJIVANJE RANA

Specijalistički rad

Zagreb, 2024.

PSS studij: Dermatofarmacija i kozmetologija

Mentor rada: prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić

Specijalistički rad obranjen je dana 28. studenog 2024. godine, na Farmaceutko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić
2. prof. dr. sc. Anita Hafner
3. dr. sc. Zdenka Kalodžera prof. emerita

Rad ima 54 lista.

Specijalistički rad je izrađen pod vodstvom prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić na Farmaceutsko- biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Na tržištu raste interes za pripravcima biljnog porijekla za liječenje različitih oboljenja, uključujući i dermatološke probleme. Kemferol je dobro poznati flavonoid prisutan u brojnim biljnim vrstama koje se tradicionalno koriste u cijeljenju rana. Cilj ovog rada bio je napraviti pregled istraživanja kemferola kao aktivne biljne sastavnice ekstrakata koji se primjenjuju kao pomoć u cijeljenju rana te istražiti njihove mehanizme djelovanja i potencijalnu učinkovitost.

Materijal i metode

U izradi specijalističkog rada korištena je elektronička baza podataka PubMed. Radom su obuhvaćene znanstvene studije koje su ispitivale učinak kemferola i njegovih derivata na cijeljenje rana, uključujući i učinak ekstrakata biljnih vrsta koji ih sadržavaju. U pretraživanju su korištene ključne riječi: zacjeljivanje rana (engl. *wound healing*) i kemferol. Pretragom baze PubMed 3. srpnja 2024. godine dobivena su 94 rada od kojih je 45 odgovaralo temi rada.

Rezultati

Kemferol i biljni ekstrakti koji ga sadrže pospješili su cijeljenje rana i smanjili stvaranje ožiljaka. Učinak kemferola temeljio se na regulaciji upalnih čimbenika, pojačanoj migraciji stanica, inhibiciji metaloproteinaza i povećanoj sintezi kolagena. Usporedbe sa standardnom terapijom pokazale su da biljni ekstrakti s kemferolom djeluju jednako dobro ili bolje od konvencionalnih terapija poput Madecassol®-a, fusidatne kiseline, indometacina ili hidrokortizona. Također pokazuju bakteriostatski učinak na mikroorganizme poput *Bacillus cereus* i *Staphylococcus* vrste, te antifungalni učinak na *Candida* vrste. Inovativne obloge za rane s kemferolom i biljnim ekstraktima pokazale su dobru biokompatibilnost, povećale su proliferaciju fibroblasta, te pokazale protuupalni i antioksidacijski učinak. Ispitani pripravci pokazali su i značajnu učinkovitost u zacjeljivanju dijabetičkih rana. S obzirom na to da biljni

ekstrakti sadržavaju brojne sastavnice, opaženi učinak je vjerojatno posljedica synergizma među sastavnicama. No studije provedene s čistim kemferolom ukazuju na važnu ulogu koju taj flavonoid ima u ukupnom učinku ispitanih ekstrakata.

Zaključak

Kemferol i biljni ekstrakti koji ga sadrže pozitivno su utjecali na cijeljenje rana u provedenim studijama. Unatoč tome, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se dobio bolji uvid u učinkovitost, mehanizam djelovanja i sigurnost primjene.

SUMMARY

Objectives

There is an increasing interest in preparations of plant origin in the market. Kaempferol is a well-known flavonoid present in plants traditionally used in wound healing. The aim of this work was to review the research on the topic of kaempferol and the plants containing it, and to investigate their mechanisms of action and potential efficacy in wound healing.

Material and Methods

In the research, the electronic database PubMed was utilized. The work included scientific studies that examined the effect of kaempferol on wound healing including the effects of the plant extracts containing this flavonoid or its derivatives. The keywords used in the search were: wound healing, kaempferol. The PubMed database search on 3th of July 2024 resulted in 94 papers, out of which 45 met the selected criteria.

Results

Kaempferol and plant extracts containing it promoted wound healing and reduced scar formation. The effect of kaempferol was based on the regulation of inflammatory factors, enhanced cell migration, inhibition of metalloproteinases, and increased collagen synthesis. Comparisons with standard therapy indicated that the investigated samples performed equally or better than the conventional treatments such as Madecassol[®], fusidic acid, indomethacin or hydrocortisone. They also exhibited bacteriostatic effects against microorganisms such as *Bacillus cereus* and *Staphylococcus* species, as well as antifungal effects against *Candida* species. Innovative wound dressings containing kaempferol and plant extracts demonstrated good biocompatibility, increased fibroblast proliferation, reduced inflammation, and displayed antioxidant effects. The investigated samples also showed significant efficacy in healing diabetic wounds. Given that plant extracts contain numerous constituents, the observed effect

is probably due to the synergism between the extracts' components. However, studies conducted with pure kaempferol indicate the important role that this flavonoid plays in the overall effect of the tested extracts.

Conclusions

Kaempferol and plant extracts containing it improved wound healing in the performed studies. Despite this, further research is needed to gain a better understanding of their efficacy, mechanism of action and safety of use.

Table of Contents

SAŽETAK.....	IV
SUMMARY	VI
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Građa i funkcija kože.....	1
1.2. Rane i cijeljenje rana	2
1.3. Modeli za ispitivanje cijeljenja rana	4
1.4. Kemferol.....	7
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	10
3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI	11
3.1. Pregled baze podataka	11
3.2. Rezultati studija na <i>in vitro</i> modelima.....	11
3.3. Rezultati studija provedenih na <i>in vivo</i> modelima	23
4. RASPRAVA	35
5. ZAKLJUČAK.....	38
6. LITERATURA.....	39
7. ŽIVOTOPIS	Error! Bookmark not defined.

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Građa i funkcija kože

Koža, najveći organ ljudskog tijela, ključna je za brojne fiziološke procese i zaštitne funkcije. Sastoji se od tri osnovna sloja, svaki s različitim značajkama i ulogama. Površinski sloj kože, epidermis, pretežno se sastoji od keratinocita koji sintetiziraju protein keratin koji ima važnu ulogu u održavanju kožne barijere. Ovaj sloj također uključuje melanocyte, odgovorne za proizvodnju pigmenta, Langerhansove stanice, koje su dio imunskog sustava; i Merkelove stanice, povezane sa senzornim funkcijama. Epidermis se sastoji od nekoliko slojeva: *stratum corneum* (vanjski sloj), *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* i *stratum basale* (unutarnji sloj) (1,2). Ispod epidermisa nalazi se dermis, deblji sloj prvenstveno sastavljen od gustog vezivnog tkiva. Pruža strukturnu potporu i hrani epidermis. Sastoji se od fibroblasta, vezivnih stanica koje sintetiziraju proteinska vlakna, a prisutni su i mastociti te makrofagi, stanice bitne u imunološkim reakcijama. Dermis je bogat vlaknima kolagena i elastina, koji koži daju čvrstoću i elastičnost. Sinteza kolagena zbiva se intracelularno (fibroblasti), dok se organizacija i razgradnja kolagena (proteaze, kolagenaze) zbivaju ekstracelularno. Dermis sadrži krvne i limfne žile, živce i kožne dodatke (folikuli dlake i znojne žlijezde). Ove komponente ključne su za termoregulaciju, osjet i imunski odgovor (1). Ispod dermisa nalazi se hipodermis koji se prvenstveno sastoji od masnog tkiva i funkcionira kao amortizirajući i izolacijski sloj. Također služi kao rezerva energije i pomaže u pričvršćivanju kože za tkiva koja se nalaze ispod nje. Debljina ovih slojeva značajno varira ovisno o lokaciji na tijelu. Kapci, na primjer, imaju najtanji epidermis, debljine manje od 0,1 mm, dok dlanovi i tabani imaju najdeblji sloj, otprilike 1,5 mm. Dermis je najdeblji na leđima, gdje je otprilike 30-40 puta deblji od epidermisa (1,2).

Koža obavlja nekoliko ključnih funkcija. Prvenstveno djeluje kao zaštitna barijera, štiteći tijelo od mehaničkih utjecaja, patogena i štetnih čimbenika iz okoliša poput UV zračenja. Također igra ključnu ulogu u regulaciji tjelesne temperature putem proizvodnje znoja i regulacije protoka krvi. Koža je dio imunosnog sustava koji predstavlja i fizičku i imunosnu prepreku infekciji. Nadalje, sadrži golemu mrežu živčanih završetaka čime omogućuje osjetilnu percepciju na dodir, temperaturu i bol. Doprinosi sintezi vitamina D koja se odvija pod utjecajem sunčeve svjetlosti (3,4).

1.2. Rane i cijeljenje rana

Rana je puknuće ili drugo oštećenje kože uzrokovano traumom, medicinskim ili fiziološkim stanjima. U takvim okolnostima često dolazi do oštećenja anatomske strukture kože i gubitka fizioloških funkcija kože. Prema dubini, rane se mogu klasificirati u tri vrste: površinske rane (gube samo dio epidermisa), rane djelomične debljine (zahvaćeni su epidermis i dublji slojevi kože) i rane pune debljine (zahvaćeni su potkožno masno tkivo i dublja tkiva) (5). Cijeljenje rana složen je i dinamičan fiziološki proces koji uključuje različite stanice, medijatore, komponente izvanstaničnog matriksa, čimbenike rasta i proteinaze. Odvija se u nekoliko preklapajućih faza: hemostaza i koagulacija, upalna faza, proliferativna faza i faza reepitelizacije/remodeliranja.

Odmah nakon ozljede, tijelo započinje proces koagulacije i hemostaze kako bi spriječilo pretjerani gubitak krvi i održalo funkcije vitalnih organa. Mikrovaskularna ozljeda i ekstravazacija krvi pokreću vazokonstrikciju, privremeno smanjujući krvarenje. Istodobno se aktivira koagulacijska kaskada, što dovodi do agregacije trombocita i stvaranja ugruška čime se zaustavlja krvarenje (6). U upalnoj fazi dolazi do razgradnje nastalog krvnog ugruška kako bi se omogućila migracija stanica. Trombociti otpuštaju faktore rasta kao što su epidermalni faktor rasta (EGF), faktor rasta sličan inzulinu 1 (IGF-1), faktor rasta porijeklom iz trombocita

(PDGF), fibroblastni faktor rasta (FGF) te transformirajući faktori rasta (TGF- α i TGF- β). Ovi faktori aktiviraju i privlače neutrofile, makrofage, endotelne stanice i fibroblaste. Trombociti sadrže i vazoaktivne amine poput serotonina koji povećavaju vaskularnu permeabilnost, potičući edem i upalu. Neutrofili i makrofagi fagocitozom uništavaju i uklanjaju bakterije i oštećeno tkivo. Ova faza je ključna u cijeljenju jer rane koje nemaju bakterijsku ravnotežu neće zacijeliti (5,6).

Proliferativna faza karakterizirana je proliferacijom i migracijom stanica. Potaknuti proangiogenim čimbenicima kao što je PDGF, nove krvne žile i kapilare postupno poprimaju oblik. Angiogenezu također stimulira i hipoksija, niska razina kisika koja se javlja kao posljedica ozljede. Istodobno s angiogenezom, događa se migracija fibroblasta, potaknuta faktorima PDGF-om i FGF-om, čime se počinje stvarati granulacijsko tkivo. Akumulacijom i proliferacijom fibroblasta stvara se novi izvanstanični matriks sastavljen od kolagena, proteoglikana i elastina. Dio fibroblasta diferencira se u miofibroblaste, čijom kontrakcijom dolazi do kontrakcije, tj smanjenja veličine rane (5).

Faza reepitelizacije i remodeliranja završna je faza cijeljenja. Podrazumijeva obnavljanje površine rane novim epitelom i sastoji se od migracije i proliferacije keratinocita na periferiji rane (7). Kolagen III u novosintetiziranom izvanstaničnom matriksu postupno se zamjenjuje kolagenom I, a novonastala kolagenska vlakna evoluiraju u organiziraniju rešetkastu strukturu, povećavajući vlačnu čvrstoću (mjera koliko je dobro tkivo u području rane oporavilo svoj strukturni integritet i snagu) zacijeljene kože. Aminokiselina neophodna za sintezu kolagena je hidroksiprolin. Prisutnost hidroksiprolina često se koristi kao biomarker za sadržaj kolagena, stoga mjerenje razine hidroksiprolina može ukazati na stupanj sinteze i taloženja kolagena u području rane, pružajući vrijedne informacije o procesu cijeljenja. Također, faza remodeliranja uključuje stvaranje ožiljaka (5).

Kada je zacjeljivanje rana predvidljivo i pravovremeno te dovodi do obnove anatomskog i funkcionalnog integriteta, govorimo o akutnim ranama. S druge strane, kronične rane ne uspijevaju napredovati kroz normalne faze cijeljenja unutar očekivanog vremenskog okvira. Dolazi do poremećaja u izvornoj strukturi tkiva i homeostaze uz popratne komplikacije kao što su infekcija, bol i kontinuirano stanje upale koje opetovano dovodi ranu u početnu fazu cijeljenja (5,8). Prevalencija osoba s kroničnim ranama u naglom je porastu posljednjih godina, zbog dramatično rastuće učestalosti pretilosti i kroničnih bolesti poput dijabetesa, venske i arterijske insuficijencije (5). U 25% pacijenata oboljelih od dijabetesa se zbog hiperglikemijskog okruženja koje ometa normalne procese cijeljenja razvije dijabetički ulkus tijekom života. Rane se najčešće javljaju na stopalima i poznate su pod nazivom „dijabetičko stopalo” (9). Dijabetički ulkus predstavlja ozbiljan zdravstveni problem uzrokujući produljenu upalu, povećanu osjetljivost na infekcije i slabu regeneraciju tkiva (10).

1.3. Modeli za ispitivanje cijeljenja rana

Za proučavanje i bolje razumijevanje pojedinih faza cijeljenja rana razvijeni su različiti modeli za rane. Ovi modeli su podijeljeni u *in vitro* i *in vivo* modele. *In vitro* modeli koriste se za simulaciju procesa cijeljenja rana u kontroliranom laboratorijskom okruženju, osiguravajući etički i financijski učinkovitu alternativu testiranju na životinjama. Koriste se uzgojene kulture stanica fibroblasta, keratinocita i endotelnih stanica. Rana se najčešće simulira metodom „grebanja“ („*scratch*“ test) pri čemu se stvara praznina u monosloju stanica te se prati zatvaranje te praznine. Pri procjeni zacjeljivanja, promatra se migracija i proliferacija stanica. *In vitro* modeli pružaju vrijedne uvide, međutim, nedostaje im složenost živih organizama. Stoga se rezultati dobiveni *in vitro* istraživanjima kasnije potvrđuju *in vivo* modelima (11). Najvažniji *in vitro* modeli su:

1. *Modelna rana nastala namjernim oštećivanjem konfluentnog sloja stanica* – jedna od najjednostavnijih metoda. Omogućuje kvantitativno praćenje dinamike prekrivanja praznine nastale oštećenjem monosloja stanica.
2. *Kolagenski matriks s uklopljenim fibroblastima* – koristi se za proučavanje stvaranja granulacijskog tkiva i stvaranja ožiljkastog tkiva.
3. *Model kokulture stanica* – omogućuje proučavanje međustaničnih interakcija te se koristi za istraživanje promjena u diferencijaciji keratinocita.
4. *Kultiviranje eksplantirane kože* – predstavlja *in vitro* model cjelovite kože (11).

Napredni *in vitro* modeli uključuju 3D bioprinting. To je tehnologija koja omogućava stvaranje preciznih i reproducibilnih modela ljudske kože i tkiva uključenih u zacjeljivanje. Željeni model se dizajnira računalno, a zatim se priprema biotinta. Ona se sastoji od različitih tipova stanica (npr. keratinociti, fibroblasti), hidrogela (npr. kolagen, hijaluronska kiselina), koji imitira ekstracelularni matriks, i faktora rasta, citokina i ostalih faktora koji potiču staničnu proliferaciju i diferencijaciju (12,13). 3D bioprinteri zatim slojevito slažu biotintu kako bi konstruirali modele kože koji oponašaju prirodnu strukturu kože. Nakon izrade modela, mogu se simulirati različite vrste rana (npr. incizijske, ekscizijske, opekline) za proučavanje procesa cijeljenja (14). Ovi modeli omogućavaju detaljno proučavanje staničnih odgovora, dinamike izvanstaničnog matriksa te učinkovitosti novih lijekova i terapija u procesu cijeljenja rana. Na primjer, 3D bioprinting se koristi za ispitivanje novih lijekova, biomaterijala za zavoje te za razvoj personaliziranih terapija prilagođenih specifičnim potrebama pacijenata. Također, tehnologija omogućava stvaranje modela kroničnih rana, poput dijabetičkih ulkusa (13). Zanimljivo je da, osim kao istraživački model, 3D bioprinting ima potencijalnu primjenu kao tretman u cijeljenju rana. Bioprintana koža mogla bi se koristiti za pokrivanje velikih rana i ubrzavanje procesa cijeljenja. Autologni graftovi, izrađeni od pacijentovih vlastitih stanica, smanjuju rizik od odbacivanja i infekcije (15).

In vivo (animalni) modeli cijeljenja rana ključni su za proučavanje složenih bioloških procesa uključenih u proces cijeljenja rane. Ovi modeli koriste životinje za imitiranje ljudskih uvjeta cijeljenja. Uobičajeno korištene životinje uključuju miševe, štakore i kuniće, a izbor ovisi o specifičnom aspektu cijeljenja koji se proučava. Na koži životinja stvaraju se kontrolirane rane kako bi oponašale različite vrste rana u ljudi. Metode indukcije rana mogu biti razne, npr. rezovi ili opekline. Ovakvi modeli mogu biti jednostavni te uključuju izravnu indukciju rane i praćenje cijeljenja. Složeni modeli uključuju fizičke, kemijske ili biološke promjene okruženja rane, poput infekcije ili ishemije, kako bi se proučilo kako ti čimbenici utječu na cijeljenje. Također, mogu se koristiti genetski modificirane životinje za oponašanje određenih ljudskih stanja poput dijabetesa, pretilosti ili specifičnih genetskih poremećaja. Praćenje uključuje promatranje stope zatvaranja, histoloških promjena te staničnih i molekularnih promjena unutar područja rane (11). Najvažniji *in vivo* modeli su:

1. *Ekscizijska rana* - rana pune debljine. Nastaje kirurškim odstranjivanjem svih dijelova kože. Cijeljenje uključuje i kontrakciju i reepitelizaciju. Rana se zatvara pomicanjem okolne kože prema središtu rane (kontrakcija) i rastom novih stanica kože na području rane (reepitelizacija). Ovaj model koristi se u istraživanjima usmjerenim na kronične rane, opekline i razvoj terapije za cijeljenje rana.
2. *Incizijska rana* – rana koja ne zahvaća punu debljinu kože. Nastaje kirurškim rezom na koži, bez uklanjanja ikakvog tkiva, što rezultira ranom djelomične debljine. Cijeljenje uključuje ponovno spajanje (približavanje) reznih rubova kroz stvaranje novog granulacijskog tkiva i stvaranje ožiljka. Ovi modeli koriste se za proučavanje vlačne čvrstoće rane koja zacjeljuje i procesa stvaranja ožiljka. Korisni su u procjeni cijeljenja kirurških rana i učinkovitosti terapija usmjerenih na poboljšanje zatvaranja rana i smanjenje stvaranja ožiljaka.

3. *Punkcijska rana* – rana u punoj dubini na ušima kunića, inducira se biopsijskom iglom, a rezultira narušavanjem integriteta epidermisa, dermisa i hrskavice uha.
4. *Mjehurić induciran usisnom silom* – pomoću usisne snage vakuuma, odvaja se epidermis i dermis u području bazalne membrane.
5. *Opeklina izazvana vrućom vodom* – nastaje otvorena rana odstranjivanjem mjehurića koji se stvori primjenom vruće vode na površini kože.
6. *Termalna opeklina* – inducira se ugrijanom metalnom pločicom koja se prisloni na kožu tijekom određenog vremena nakon čega nastaje mjehurić. Odstranjivanjem mjehurića se stvara otvorena rana (11).

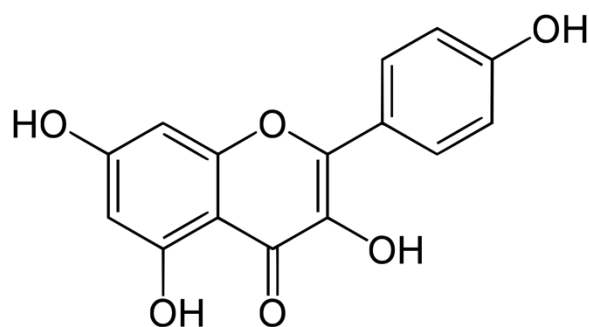
1.4. Kemferol

Konvencionalne terapije općenito uključuju skupe i dugotrajne tretmane sa stopom relapsa kroničnih ulkusa iznad 70%. Rastući broj pacijenata željnih bolje kvalitete liječenja i velik budžet utrošen na liječenje rana, značajno pokreću istraživanja u područjima zacjeljivanja rana i regeneracije kože (5). Trenutno dostupno lokalno liječenje rana često je skupo i neučinkovito te može uzrokovati nuspojave. U novije vrijeme raste zanimanje za učinak različitih prirodnih produkata i biljnih ekstrakata na cijeljenje rana. Stoga bi razvoj terapija za cijeljenje rana korištenjem prirodnih produkata dobivenih iz biljaka mogao biti od velikog značaja (16).

Flavonoidi predstavljaju značajnu skupinu spojeva biljnog podrijetla poznatih po svojim opsežnim učincima na zdravlje. Ovi polifenolni spojevi igraju ključnu ulogu u biologiji biljaka, pomažući u stimulaciji rasta, regulacijskim i obrambenim mehanizmima. U biljkama su flavonoidi odgovorni za boju i aromu cvijeta i ploda, odnosno posljedično za privlačenje oprašivača i raspršivanje plodova. Osim toga flavonoidi štite biljke od različitih biotičkih i abiotičkih stresova i djeluju kao jedinstveni UV filtri, signalne molekule, detoksikacijski agensi

i antimikrobni obrambeni spojevi. Na temelju kemijskog sastava, postoji nekoliko skupina flavonoida: flavonoli, flavanoni, izoflavanoidi, neoflavanoidi, flavan-3-oli, antocijani te kalkoni (17). Flavonoidi imaju protuupalna, antioksidacijska i antimikrobna svojstva te tako djeluju kao agensi u cijeljenju rana. Također, mogu stimulirati proliferaciju stanica, diferencijaciju keratinocita i dermalnih fibroblasta te igraju bitnu ulogu u sintezi kolagena što dovodi do ubrzanja procesa cijeljenja rana (18). Među flavonoidima kemferol se ističe po potencijalno snažnom učinku na cijeljenje rana, što ga čini zanimljivim kandidatom za razvoj novih terapija (19).

Kemferol je prirodni flavonoid koji pripada skupini flavonola, a prisutan je u brojnim biljnim izvorima kao što su: kapar, kelj, brokula, rajčice, hmelj, crveno grožđe, grejp, jagode, jabuke i ginko. Može se naći i u medu, zelenom i crnom čaju (20). Kemferol je poznat po antioksidacijskom, protuupalnom, antimikrobnom i kardioprotektivnom djelovanju. Modulira različite biološke putove, što doprinosi njegovom terapijskom potencijalu. Pokazano je da potiče apoptozu i zaustavljanje staničnog ciklusa u stanicama raka pluća, jednjaka, leukemije, raka usne šupljine, prostate, debelog crijeva te osteosarkoma (20,21). Jedna studija je istaknula kemferol kao potencijalni fitoestrogen za terapiju raka endometrija (22).



Slika 1. Prikaz strukturne formule kemferola (preuzeto s:

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Kaempferol.svg>).

Antioksidacijska svojstva kemferola posebno su značajna. Kemferol uklanja slobodne radikale, štiteći stanice od oštećenja. Uz hepatoprotektivni učinak kemferol ima potencijal u liječenju neurodegenerativnih bolesti te dijabetesa. Navedno se može objasniti moduliranjem signalnih puteva unutar stanica koje štite neurone i reguliraju razine šećera u krvi (23). U kontekstu cijeljenja rane, protuupalno i antimikrobno djelovanje kemferola od presudne je važnosti. Sposobnost poticanja sinteze kolagena i promicanja angiogeneze dodatno podržava popravak i regeneraciju tkiva. Osim toga, kemferol može modulirati imunosni odgovor, što je važno za pravilno cijeljenje rane i sprečavanje kronične upale (21,24).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Financijska preopterećenost zdravstvenog sustava, nezadovoljavajuća učinkovitost postojeće terapije za određena stanja, rastući broj pacijenata s kroničnim ranama kao i rastuća prevalencija infekcija otpornih na antibiotike neki su od razloga povećanja zanimanja za prirodno liječenje rana. Kemferol je dobro poznati flavonoid prisutan u brojnim biljnim vrstama koje se tradicionalno koriste u cijeljenju rana, a koje su sve češće predmetom znanstvenih istraživanja. Unatoč tome, sistematizacija rezultata tih znanstvenih studija do sad nije provedena. Stoga je cilj ovog rada napraviti pregled dosadašnjih znanstvenih studija o utjecaju kemferola i biljnih ekstrakata koji ga sadrže na zacjeljivanje rana te istražiti njihove mehanizme djelovanja.

3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

3.1. Pregled baze podataka

Za pisanje ovog specijalističkog rada pretražena je elektronička baza podataka PubMed. Radom su obuhvaćene znanstvene studije koje su ispitivale učinak kemferola i njegovih derivata na cijeljenje rana, uključujući i učinak ekstrakata biljnih vrsta koji ih sadržavaju. U pretraživanju su korištene ključne riječi: zacjeljivanje rana (engl. *wound healing*) i kemferol. Pretragom baze PubMed (zadnje pretraživanje provedeno na dan 3. srpnja 2024. godine) dobivena su 94 rada od kojih je 45 odgovaralo odabranoj temi. Za odabrane znanstvene radove bili su dostupni cjeloviti tekstovi ili iznimno sažeci na engleskom jeziku. Radovi su obrađeni neovisno o datumu objave.

3.2. Rezultati studija na *in vitro* modelima

Jedna studija istraživala je utjecaj tri glikozida kemferola na migraciju keratinocita pomoću modela ljudskih keratinocita (HaCaT). Glikozidi kemferol-3-*O*-arabinozid, kemferol-3-*O*-glukozid i kemferol-3-*O*-rutinozid izolirani su iz etilacetatnog ekstrakta lista biljne vrste *Afgekia mahidoliae*. Za evaluaciju učinka korišten je „*scratch*“ test te su stanice tretirane s 0,5 μ M kemferol-3-*O*-arabinozida, kemferol-3-*O*-glukozida i kemferol-3-*O*-rutinozida. Migracija stanica preko ogrebotine pratila se 6, 12, 18 i 24 sata nakon tretmana. Kemferol-3-*O*-rutinozid pokazao je izraženiji učinak na zatvaranje rane u odnosu na druge glikozide. Analiza morfologije stanica i Western blot analiza otrila je mehanizam kojim je kemferol-3-*O*-rutinozid pojačao migraciju stanica, a on je uključivao indukciju formiranja filopodija i lamelipodija, povećanje stanične razine fosforilirane fokalne adhezijske kinaze (FAK) (Tyr 397) i fosforilirane protein kinaze B (PKB ili Akt) (Ser 473) te pojačanu regulaciju aktivnog Rac1-gvanozin-trifosfat-a (GTP) (25).

Etanolski ekstrakt rizoma biljne vrste *Boesenbergia rotunda* sadrži kemferol kao jedan od glavnih kemijskih spojeva. Studija je koristila „scratch“ test na HaCaT staničnoj liniji za definiranje potencijalnih molekularnih mehanizama ekstrakta u poboljšanju cijeljenja rana. „Scratch“ test je pokazao da ispitani ekstrakt pri koncentraciji od 15 µg/mL značajno ubrzava migraciju stanica nakon samo 6 sati inkubacije u usporedbi s kontrolnom skupinom tretiranom čistim medijem bez ekstrakta. Također se pokazalo povećanje broja stanica i površine pokrivene stanicama nakon tretmana sa 7,5 i 15 µg/mL ekstrakta tijekom 48 sati u usporedbi s kontrolnom skupinom. Učinak je objašnjen sposobnošću ekstrakta da inducira proliferaciju stanica. Ekstrakt je brzo aktivirao protein kinaza ERK1/2-a i Akt-a fosforilaciju nakon njegova dodatka. Dodatno, studija je potvrdila da *B. rotunda* pojačava proliferaciju stanica i cijeljenje rana stimuliranjem putova prijenosa signala protein kinaza MAPK-a i PI3K/Akt-a (26).

Studija provedena na vodenom ekstraktu meda jele (fir honeydew honey, *Abies alba*) istraživala je njegov učinak na faktor nekroze tumora- α (TNF- α) induciranu sekreciju i ekspresiju matriksne metaloproteinaze-9 (MMP-9) koja se smatra odgovornom za degradaciju matriksa i faktora rasta u kroničnim ranama. Učinak ekstrakta na TNF- α -om induciranu sekreciju MMP-9-a ispitan je korištenjem testa želatinske zimografije. Tretiranje HaCaT stanične linije s TNF- α -om (10 ng/mL) tijekom 24 sata rezultiralo je povećanjem izlučivanja MMP-9-a u izvanstanični prostor. Tretiranje keratinocita s ispitivanim ekstraktom, 24 sata prije i tijekom izlaganja TNF- α -om tijekom 24 sata, smanjilo je izlučivanje MMP-9-a iz stanica ovisno o dozi. Pri najvišoj koncentraciji ekstrakta (2,5 mg/ml), aktivnost MMP-9-a smanjena je gotovo do razine u kontrolnim stanicama koje nisu tretirane s TNF- α -om. RT-PCR-om (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) i Western blot analizom potvrđeno je da se inhibicija MMP-9-a odvija na razini mRNA i proteina. Testovi su pokazali smanjene razine mRNA i proteina u keratinocita tretiranih ekstraktom meda jele, ovisno o dozi. Nadalje, spojevi identificirani u ekstraktu su podvrgnuti istim testovima. Apigenin i kemferol izrazito su

inhibirali proizvodnju MMP-9-a iz keratinocita, za razliku od kvercetina i ostalih identificiranih flavonoida (27).

In vitro antioksidacijski testovi, potvrdili su da metanolni ekstrakt sjemenki biljne vrste *Moringa oleifera* ima snažnu sposobnost uklanjanja slobodnih radikala. *In silico* studije pokazale su da se neki metaboliti iz ispitivanog ekstrakta mogu vezati na aktivna mjesta proteina važnih za cijeljenje rana poput TNF- α -a, TGFBR1-a (receptor tip-1 transformirajućeg faktora rasta- β) i IL-1 β -a (interleukin-1 β). Kvercetin, kavena kiselina i kemferol pokazali su najveću povezanost s navedenim proteinima. Koncentracije IL-6-a, MMP-1-a i MMP-2-a mjerene su ELISA metodom kako bi se procijenio protuupalni učinak i inhibicija enzima koji razgrađuju izvanstanični matriks. Kemferol je inhibirao aktivnost MMP-1-a za 60% te MMP-2-a za 67%. Također, kemferol je smanjio koncentraciju IL-6-a za 76%, dok su kvercetin i kavena kiselina smanjili koncentraciju IL-6-a za 56%, odnosno 53%. Kao pozitivna kontrola korišteni su lipopolisaharidi koji potiču upalni odgovor (28,29).

Još jedna studija provedena je na vrsti *Moringa oleifera*, no usmjerena na formuliranje ekstrakta *M. oleifera* u funkcionalnu oblogu za rane. Najprije su listovi *M. oleifera* ekstrahirani u različitim otapalima (vodeni, 50%, 70% i 100%-tni etanolni ekstrakti). Utvrđeno je da svi ekstrakti sadrže vicenin-2, klorogensku kiselinu, galnu kiselinu, kvercetin, kemferol, ružmarinsku kiselinu i rutin. Testiran je utjecaj ekstrakata na staničnu migraciju i proliferaciju pomoću *in vitro* „scratch“ testa na ljudskim dermalnim fibroblastima (HDF). Test je pokazao da je vodeni ekstrakt *M. oleifera* u koncentraciji od 12,5 $\mu\text{g/mL}$ značajno poboljšao zatvaranje ogrebotine unutar 48 sati, što sugerira učinkovitu migraciju i proliferaciju stanica. Više koncentracije (25-100 $\mu\text{g/mL}$) bile su manje učinkovite. Kontrolne skupine uključivale su medij bez ekstrakta. Među svim ispitivanim ekstraktima, vodeni ekstrakt lista pokazao je najveći utjecaj na proliferaciju i migracijska svojstva fibroblasta. Vodeni ekstrakt lista *M. oleifera* je ugrađen u filmski premaz na bazi alginata-pektina (SA-PC). Uspješno je napunjen

u alginatnu SA-PC film-oblogu u različitim jačinama od 0,1% do 1% *m/V* te su postignuta zadovoljavajuća mehanička i fizikalno-kemijska svojstva prikladna za primjenu u vidu obloge za rane (30).

Ispitan je učinak etanolnog ekstrakta sjemenki *Lepidium sativum* napunjenih na nanovlakna od polivinilalkohola (PVA) kao obloge za cijeljenje rana. Identificirani spojevi u ekstraktu su: galna kiselina, katehin, rutin, kemferol-3-*O*-rutinozid, kvercetin-3-*O*-ramnozid, kemferol-3-*O*-ramnozid, kvercetin i kemferol. Ispitivani ekstrakt je pokazao učinkovitost kao antioksidans s IC_{50} $82,6 \pm 8,35$ $\mu\text{g/mL}$ na DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilhidrata) testu. Indeks bubrenja ekstrakta u pripremljenim nanovlaknima pokazao je prikladnost za upotrebu u vidu obloga za rane. Proveden je „scratch“ test na stanicama fibroblasta majmuna kako bi se razumio učinak pripremljenih nanovlakana u ubrzavanju ili usporavanju cijeljenja rana *in vitro*. Nakon 24 sata tretmana nanovlaknima, oko 35% ogrebanog područja je zacijelilo u kontrolnoj skupini (stanice tretirane samo medijem). Ugradnja etanolnog ekstrakta *L. sativum* u nanovlakna povećala je učinkovitost zatvaranja pukotina i sposobnost cijeljenja na oko 63% u 24 sata. Nakon 48 sati, postotak zatvaranja rane dosegnuo je 63%, 69% i 90% za kontrolu, čisti PVA i 0,6% (w/v) etanolni ekstrakt-PVA (31).

Učinak ekstrakata vrste *Spirulina platensis* priređenih pomoću različitih otapala na cijeljenje rana ispitana je pomoću *in vitro* „scratch“ testa na ljudskim dermalnim fibroblastima (HDF). Različitim ekstraktima cijele biljke (metanolni, etanolni i vodeni) u koncentraciji 50 $\mu\text{g/mL}$ tretirane su HDF stanice. Alantoin je korišten kao pozitivna kontrola, a stanice bez tretmana kao negativna kontrola. Zatvaranje rane je praćeno nakon 24 sata. Vodeni ekstrakt stimulirao je proliferaciju i migraciju HDF stanica i povećavao brzinu zatvaranja područja rane unutar 24 sata nakon tretmana. Učinak je usporediv s alantoinom. Metanolni i etanolni ekstrakti pokazali su proliferativni učinak, no ovi ekstrakti nisu pomogli u migraciji i zatvaranju područja rane u usporedbi s vodenim ekstraktom (32).

Dobro zatvaranje rana pokazano je „*scratch*“ testom i za ekstrakt listova biljne vrste *Lawsonia inermis*. Prah osušenih i usitnjenih listova autoklaviran je na 10 min pri temperaturi od 100 °C. Druga količina praha nije autoklavirana. Obje skupine praha su otopljene u dimetil sulfoksidu (DMSO). HDF stanice su kultivirane na pločama obloženim fibronektinom te je napravljen „*scratch*“ test za procjenu brzine migracije stanica, postotka zatvaranja rana i razlike u površini rane. Ekstrakt netretirane biljke pokazao je značajno bolje rezultate u usporedbi s tretiranom biljkom i kontrolnom skupinom (netretirane stanice). Učinkovite koncentracije za netretirani ekstrakt bile su 57017,33 µg/mL za klorogeničnu kiselinu i 1248,42 µg/mL za kemferol. Migracija stanica iznosila je 14,806 µm za ekstrakt netretiranih listova, 11,360 µm za ekstrakt prethodno tretiranih listova te 11,554 µm za kontrolnu skupinu stanica. Postotak zatvaranja rana bio je 74,938% za netretirani ekstrakt, 59,083% za tretirani ekstrakt te 58,903% za kontrolnu skupinu. Razlika u površini rane bila je 710,667% za netretirani ekstrakt, 545,333% za tretirani ekstrakt i 554,667% za kontrolnu skupinu (33).

Pozitivan učinak na cijeljenje rana i ekstrakta biljne vrste *Achillea kotschy* potvrđen je na stanicama mišjih fibroblasta. U ispitivanju su korišteni nadzemni dijelovi biljke, odnosno listovi, cvjetovi i stabljike. Ovi dijelovi su osušeni, usitnjeni i ekstrahirani metanolom te je ekstrakt otopljen u vodenoj otopini DMSO-a. Kulture fibroblasta su tretirane ekstraktom i čistim otapalom kao kontrolnom skupinom tijekom 24 sata. Ukupni broj stanica i broj stanica pod mitozom su bili parametri proliferacije stanica. Ispitivani ekstrakt *A. kotschy* značajno je povećao ukupni i broj stanica pod mitozom pri koncentracijama od 2,5, 5, 10 i 20 µg/mL u odnosu na DMSO. Ispitana je i sinteza kolagena kao mjera zacjeljivanja. *A. kotschy* je značajno povećao broj kolagenih granula u fibroblastima pri istim koncentracijama u odnosu na DMSO. Osim kemferola, ispitivani ekstrakt je sadržavao klorogensku kiselinu, hiperozid, apigenin, hesperidin, rutin i luteolin (34).

Jedna studija istraživala je učinke metanolnih ekstrakata listova vrste *Carica papaya* priređenih pomoću 3 različite tehnike ekstrakcije: ultrazvučna, refluks i agitacija (35). U listovima papaje su identificirani kavena kiselina, miricetin, rutin, kvercetin, α -tokoferol, papain, benzil izotiocijanat i kemferol (36). Proveden je „scratch“ test na stanicama ljudskih fibroblasta. Područja ogrebotine su tretirana ekstraktima pri koncentracijama u rasponu od 12,5 do 100 $\mu\text{g/mL}$ tijekom 48 sati. Refluksni i ultrazvukom dobiveni ekstrakti potaknuli su rast fibroblasta za 85% (pri koncentraciji 12,5 $\mu\text{g/mL}$) odnosno 41% (pri koncentraciji 6,25 $\mu\text{g/mL}$). Osim toga, tijekom prva 24 sata „scratch“ testa, pri koncentraciji 12,5 $\mu\text{g/mL}$ stopa migracije bila je veća za 30% za refluksni ekstrakt, 27,5% za ekstrakt dobiven agitacijom i 20,7% za ultrazvukom dobiveni ekstrakt u usporedbi s kontrolom (čisti medij za rast stanica). Nakon 48 sati, proliferirane stanice pokrivale su 78,7% površine ogrebotine za ekstrakt priređen metodom refluksa, 63,1% za ultrazvučni, 61% za agitacijom dobiveni ekstrakt i 42,6% za kontrolnu skupinu. Dodatno, sinteza kolagena u fibroblastima bila je poboljšana za 31,6% i 65% nakon 24 i 48 sati tretmana refluksim ekstraktom, za 20% i 60,3% nakon tretmana ekstraktom dobivenim agitacijom te za 0,6% i 36,3% nakon tretmana ultrazvučnim ekstraktom u odnosu na kontrolnu skupinu (35).

Kemferol-3-*O*-soforozid identificiran je kao glavni flavonoid u acetonskom ekstraktu cvijeta vrste *Crocus sativus*. Acetonski ekstrakt cvijeta šafrana i kemferol-3-*O*-soforozid ispitani su na HaCaT staničnim linijama na potencijalne učinke na migraciju stanica, proliferaciju i protuupalna svojstva. Acetonski ekstrakt ovisno o koncentraciji (50-200 $\mu\text{g/mL}$) povećao je staničnu proliferaciju, dok kemferol-3-*O*-soforozid (1-50 μM) nije imao učinka. Migracija stanica određena je mikroskopijom s vremenskim odmakom i modifikacijom „scratch“ testa na ranama u kojem je acetonski ekstrakt značajno poboljšao zatvaranje rana u usporedbi s netretiranom kontrolom. Prekomjerna proizvodnja proupalnih citokina IL-8-a i IL-6-a u HaCaT stanicama inducirana je pomoću TNF- α -a. Kemferol-3-*O*-soforozid (10-50 μM)

inhibirao je TNF- α -om induciranu sekreciju IL-8-a, ali taj učinak nije primijećen kod acetonskog ekstrakta. Učinak je bio usporediv s 10 μ M hidrokortizona (pozitivna kontrola) (37). Potencijalni učinak priređenih hidrogelova kao obloga za rane istražen je na kulturi stanica fibroblasta miševa. Uspoređene su 3 skupine, čisti hidrogel kao kontrolna skupina te hidrogelovi obogaćeni krocinom i kemferolom ekstrahirani iz latica šafrana. Sve tri skupine su pokazale dobru biokompatibilnost s *in vitro* uzgojenim fibroblastima. Hidrogelovi s krocinom i kemferolom pokazali su značajno veću proliferaciju fibroblasta u odnosu na kontrolnu skupinu (38).

Jedna studija ispitala je učinak ekstrakta listova vrste *Aloe vera* uklopljene u nanovezikule na cijeljenje opeklinских rana. Nanovezikule s ekstraktom *A. vera* značajno su smanjile izlučivanje proupalnih citokina TNF- α -a, IL-1 β -a i IL-6-a u makrofagima i keratinocitima stimuliranim lipopolisahardima (LPS), glavnim biološkim endotoksinom koji može povećati proizvodnju NO-a. Također, inhibirale su diferencijaciju miofibroblasta i značajno smanjile njihov kontraktilni potencijal u kolagenskim matricama čime je smanjeno stvaranje ožiljaka pri cijeljenju opeklinских rana (39).

Studija rađena na metanolnom ekstraktu sjemenki genetski modificiranog lana, *Linum usitatissimum*, pokazala je povećanje udjela ferulične, *p*-kumarinske kiseline i kavene kiseline te njihovih glukozidnih derivata, kemferola i kvercetina, u usporedbi s kontrolnim nemodificiranim biljkama. Pokazano je da sjemenke genetski modificiranog lana potiču proliferaciju i migraciju ljudskih fibroblasta u „scratch“ testu. Izuzetan učinak ekstrakta na migraciju fibroblasta uočen je nakon 24-satnog tretmana. Test iritacije na modelu ljudske kože pokazao je da genetski modificirane sjemenke nemaju štetan učinak na ljudsku kožu. Studija je također pokazala inhibitorna svojstva ekstrakta prema bakterijskom soju koji često inficira kronične rane, *Staphylococcus aureus* (40).

Jedna studija istražila je učinak sjemenih ovojnica vrste *Lecythis pisonis* na cijeljenje rana. U ekstraktu je identificirano ukupno 19 spojeva, kao što su proantocijanidin A1, procijanidini A1, B2 i C1, epigalokatehin i kemferol glikozid. Jaka antioksidacijska snaga ekstrakta potvrđena je DPPH testom ($IC_{50} = 0,99 \mu\text{g/mL}$) i testom redukcije željeza ($IC_{50} = 1,09 \mu\text{g/mL}$). Ekstrakt je značajno pospješio migraciju stanica i proliferaciju fibroblasta. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) stimuliran je ovisno o dozi pri $6 \mu\text{g/mL}$ ($167,13 \pm 8,30 \text{ pg/mL}$), $12,5 \mu\text{g/mL}$ ($210,3 \pm 14,2 \text{ pg/mL}$) i $25 \mu\text{g/mL}$ ($411,6 \pm 29,4 \text{ pg/mL}$). PDGF ($0,002 \mu\text{g/mL}$) stimuliran je na $215,98 \text{ pg/mL}$. *Staphylococcus aureus* bio je osjetljiv na ekstrakt, s minimalnom inhibitornom koncentracijom od $31,25 \mu\text{g/mL}$ (41).

Ispitivanje učinkovitosti u zacjeljivanju rana i mehanizam djelovanja biljne vrste *Lafoensia pacari* provedeno je na hidroetanolnom ekstraktu lista *L. pacari*. Fitokemijskim analizama potvrđena je prisutnost flavonoida, od kojih su najistaknutiji kemferol, elagična kiselina, punikalagin, punikalin, kvercetin-3-*O*-ksilopiranozid i kvercetin-3-*O*-ramnopiranozid. Studija je obuhvatila *in vitro* ispitivanje citotoksičnosti na CHO-K1 i L929 staničnim linijama, u kojem ispitivani hidroetanolni ekstrakt nije pokazao toksičnost. U *in vitro* „scratch“ testu na L929 staničnim linijama, hidroetanolni ekstrakt *L. pacari* pri koncentracijama $0,03$ i $0,1 \mu\text{g/mL}$ pokazao je povećanu brzinu proliferacije i migracije fibroblasta za $23,1\%$ i $35,3\%$ u usporedbi s kontrolnom skupinom (čisti medij). Western blot analizom se potvrdilo povećanje ekspresije proteina p-ERK1/2-a (eng. *phosphorylated Extracellular signal-Regulated Kinases 1 and 2*) bitnog za diferencijaciju stanica za $99,8\%$ i $133,8\%$ pri koncentracijama ekstrakta od $0,01$ i $0,3 \mu\text{g/mL}$ u usporedbi s kontrolnom skupinom. Također, ispitivanje protuupalne aktivnosti provedeno je na kulturama makrofaga RAW 264.7 aktiviranim LPS-om, gdje je potvrđen protuupalni učinak smanjenjem proizvodnje dušikovog oksida. U DPPH i FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) testovima, potvrđena je i antioksidacijska aktivnost ispitanog ekstrakta (42).

Etanolni ekstrakt lista vrste *Gynura procumbens* ispitan je *in vitro* na staničnim linijama fibroblasta, keratinocita i endotelnih stanica. Istraživanje je obuhvatilo normalne i dijabetičke uvjete koji su postignuti tretiranjem staničnih linija glukozom ili manitolom tijekom 24 sata. Stanice su zatim tretirane ispitivanim ekstraktom u koncentraciji 50 µg/mL ili 0,1% DMSO-om kao kontrolnom skupinom. Stanična proliferacija je ispitana MTT kolorimetrijskim testom. Rezultat je pokazao 12 puta veću proliferaciju keratinocita i u normalnim i u dijabetičkim uvjetima u stanica tretiranih *G. procumbens* u odnosu na kontrolnu skupinu. U odnosu na kontrolnu skupinu proliferacija fibroblasta u normalnim uvjetima bila je dvostruko veća, i čak trostruko veća u dijabetičkim, dok je proliferacija endotelnih stanica bila dvostruko veća u obje vrste uvjeta. Također, pomoću „scratch” testa ispitana je migracija stanica u dijabetičkim i normalnim uvjetima. Ekstrakt *G. procumbens* značajno je povećao migraciju keratinocita, fibroblasta i endotelnih stanica pri koncentraciji 50 µg/mL u odnosu na kontrolnu skupinu. Migracija je bila izraženija u dijabetičkim uvjetima (43).

Sedum telephium je sukulent koji se često koristi u tradicionalnoj talijanskoj medicini za lokalne upalne procese poput opekline, bradavica i rana. Jedna studija usporedila je učinak cijedenog soka listova biljaka uzgojenih *in vivo*, kao i iz nediferenciranih kalusa i suspenzija stanica. Fitokemijska analiza pokazala je da je ispitivani materijal sadržavao značajne količine kvercetina i kemferola. Istraživanje učinka na cijeljenje rana provedeno je na kulturama stanica ljudskih fibroblasta i makrofaga koristeći „scratch” test za ispitivanje zacjeljivanja rana te ELISA test za procjenu protuupalnih svojstava. „Scratch” test pokazao je da ekstrakti C1-J (sok dobiven iz kalusa uzgojenog u S10 mediju koji sadrži hormone), S1-J (sok dobiven iz staničnih suspenzija kalusa uzgojenih u S10 mediju), i S2-J (sok dobiven iz staničnih suspenzija kalusa uzgojenih u SH mediju) značajno potiču zatvaranje rana u kulturi fibroblasta u usporedbi s kontrolnim uzorcima tretiranim čistim medijem. Postotak zatvaranja rana iznosio je 81,7% (C1-J), 79,1% (S1-J) i 68,7% (S2-J), nasuprot 28,7% u kontrolnim uzorcima. Protuupalna

svojstva testirana su na kulturi ljudskih makrofaga stimuliranih LPS-om. Ekstrakti C1-J, S1-J, i S2-J smanjili su produkciju proupalnih citokina TNF- α -a i IL-1 β -a. Povećana je bila produkcija IL-8-a koji ima važnu ulogu u privlačenju imunskih stanica i cijeljenju rana (44).

Učinak metanolnog ekstrakta korijena biljne vrste *Astragalus microcephalus* na cijeljenje rana ispitan je “*scratch*” testom na humanim fibroblastima kože. Tekućinskom kromatografijom s detekcijom masenom spektrometrijom (LC/MC) utvrđena je prisutnost 11 flavonoida u ekstraktu, pri čemu su se u najvišoj koncentraciji nalazili kemferol i formononetin. Nakon 8 sati testa, ogrebotina tretirana ispitivanim ekstraktom bila je znatno zatvorenija u odnosu na onu kod netretiranih stanica. Najveća proliferacija je postignuta pri koncentracijama 250 i 500 μ g/ml ekstrakta nakon 24 i 48 sati (45).

U okviru studije u kojoj je proučavana paprat *Ophioglossum vulgatum*, iz nadzemnih dijelova izolirana su dva flavonola, kvercetin-3-*O*-[(6-kaveoil)- β -glukopiranozil (1 $\rightarrow$ 3) α -ramnopiranozid]-7-*O*- α -ramnopiranozid i kemferol-3-*O*-[(6-kaveoil)- β -glukopiranozil (1 $\rightarrow$ 3) α -ramnopiranozid]-7-*O*- α -ramnopiranozid, te kvercetin-3-*O*-metil eter. Otopine navedenih spojeva priređene u 2-propanolu ispitane su „*scratch*“ testom na HaCaT keratinocitima tijekom 24 sata. Sva tri izolirana spoja pokazala su poboljšano zatvaranje ogrebotinskih rana u usporedbi s kontrolnom skupinom (netretirane stanice). Kemferol-3-*O*-[(6-kaveoil)- β -glukopiranozil (1 $\rightarrow$ 3) α -ramnopiranozid]-7-*O*- α -ramnopiranozid bio je najučinkovitiji, pokazujući maksimalnu učinkovitost pri koncentraciji od 20 μ M (46).

Iz ekstrakta listova i stabljika biljne vrste *Elaeagnus umbellata* priređenog pomoću 70%-tnog acetona izolirani su flavonoidi, a njihova struktura određena je pomoću NMR i masene spektrometrije. Identificirani su derivati kemferola kemferol-3-*O*- β -D-ksilopiranozil(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-galaktopiranozid-7-*O*- α -L-ramnopiranozid (1), kemferol-3-*O*- β -D-galaktopiranozid-7-*O*- α -L-ramnopiranozid (2), kemferol-3-*O*- α -L-ramnopiranozil (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-galaktopiranozid-7-*O*- α -L-ramnopiranozid (3), kemferol-3-*O*- β -D-ksilopiranozil (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-galaktopiranozid (4),

kemferol-3-*O*-rutinozid (5) i kemferol-3-*O*- β -D-glukopiranozil (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-galaktopiranozid-7-*O*- α -L-ramnopiranozid (6). Ispitani su proliferativni učinci izoliranih spojeva „*scratch*“ testom na HaCaT staničnoj liniji. Kontrolne skupine su tretirane čistim otapalom, DMSO-om, i čistim kemferolom. Ispitivanje je pokazalo da spojevi 1-5 značajno potiču proliferaciju keratinocita. Spojevi 2 i 3 pokazali su visoku aktivnost pri koncentracijama od 1, 5 i 10 μ M, a njihov proliferacijski učinak bio je značajno veći od DMSO-a i čistog kemferola. Stopa rasta HaCaT stanica nakon tretiranja spojem 2 iznosila je 174,14%, 181,48% i 193,94% pri koncentracijama od 1, 5 i 10 μ M, dok je spoj 3 pokazao proliferacijske učinke od 181,82%, 180,47% i 197,98% pri istim koncentracijama (47,48).

Studija provedena na ekstraktu listova i cvjetova vrste *Anchusa strigosa* identificirala je najvažnije sastavnice te istražila učinak istih na cijeljenje rana. Iz ekstrakta je izolirano nekoliko flavonoida, uključujući kvercetin 3-*O*-rutinozid, kemferol, kemferol 3-*O*- β -ramnopiranozil (1 $\rightarrow$ 6)- β -glukopiranozid, kemferol 3-*O*- α -ramnopiranozil (1 $\rightarrow$ 6)- β -galaktopiranozid i elagičnu kiselinu. Ispitivanje na metanolnom ekstraktu *A. strigosa* je provedeno „*scratch*“ testom na HDF modelu. Ekstrakt je pokazao značajno poboljšanje cijeljenja rana pri koncentraciji od 50 μ g/mL, dok su pojedinačni izolirani spojevi u istim koncentracijama pokazali manju učinkovitost. Kombinacije testiranih spojeva, uključujući kemferol, kvercetin 3-*O*-rutinosid i elagičnu kiselinu, pokazale su sinergistički učinak, što je rezultiralo boljim zacjeljivanjem rana u usporedbi s kontrolnom skupinom (netretirane HDF stanice) (49).

Uvid u potencijalni učinak cvjetova biljne vrste *Allium scorodoprasum*, pružila je studija provedena na HaCaT staničnim linijama pomoću „*scratch*“ testa. Keratinociti su tretirani s 9 različitih ekstrakata *A. scorodoprasum* u koncentraciji 200 μ g/mL tijekom 24 sata. Za pripremu ekstrakata su korištena različita otapala: E10: 100% etanol; EW7.5: 75% etanol, 25% voda; EW5: 50% etanol, 50% voda; EW2.5: 25% etanol, 75% voda; W10: 100% voda; B10: 100%

butanol; BE7.5: 75% butanol, 25% etanol; BE5: 50% butanol, 50% etanol; BE2.5: 25% butanol, 75% etanol. Ekstrakti su bili bogati glikozidima kemferola, poput kemferol 3-*O*-glukozida. Najbolji proliferacijski učinak imali su ekstrakti EW5, kojima je postignuto 100% zatvaranje rana nakon 48 sati, te E10 s 81% cijeljenja. Ostali ekstrakti bili su manje učinkoviti, ali su svi ubrzavali cijeljenje u odnosu na kontrolnu skupinu (netretirane stanice) kod koje je postotak cijeljenja bio tek 0,83%. Također, ispitan je antimikrobni učinak na patogenima koji inficiraju rane. Učinak je ispitan koristeći kliničke izolate bakterija i kvasaca, izoliranih s ljudske kože. Ekstrakt E10 djelovao je antimikrobno na vrstu *Candida albicans* s minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIC) od 0,06 mg/mL. Ekstrakti EW7.5 i EW5 bili su učinkoviti protiv *Staphylococcus epidermidis* i *lugdunensis* (MIC 0,5 mg/mL), dok je ekstrakt W10 bio učinkovit protiv *Staphylococcus epidermidis* i *Proteus vulgaris* (MIC 0,5 mg/mL) (50).

Ispitan je inhibicijski učinak etilacetatnog ekstrakta listova, stabljike i cvjetova vrste *Epilobium angustifolium* na kolagenazu, hijaluronidazu i elastazu, enzime važne za cijeljenje rana. Iz ekstrakta je izolirano nekoliko flavonoida: hiperozid, kemferol, kemferol-3-*O*- α -L-ramnospiranozid, kvercetin-3-*O*- α -L-ramnospiranozid i kvercetin-3-*O*- α -L-arabino piranozid. Inhibicijski testovi pojedinačnih izoliranih spojeva su pokazali da su hiperozid i kemferol bili najučinkovitiji. Hiperozid je pri koncentraciji od 100 μ g/mL pokazao značajnu inhibiciju kolagenaze (30,1%) i hijaluronidaze (40%), dok je inhibicija elastaze bila relativno niska (19,9%). Kemferol je pri istoj koncentraciji inhibirao 25,9% kolagenaze, 21,6% hijaluronidaze i 15,3% elastaze. Ostali izolirani spojevi nisu pokazali značajnu inhibicijsku aktivnost na ove enzime u usporedbi s referentnim spojevima, epigalokatehin galatom za kolagenazu i elastazu, te taninskom kiselinom za hijaluronidazu (51).

Inhibicijski učinak na hijaluronidazu pokazao je i vodeni ekstrakt nadzemnih dijelova (listovi, cvjetovi i stabljike) biljne vrste *Thymus serpyllum*. Među glavnim sastavnicama ekstrakta identificirani su luteolin, apigenin, kemferol i derivati kvercetina. U inhibicijskim

testovima vodeni ekstrakt *T. serpyllum* snažno je inhibirao hijaluronidazu (71,7% pri koncentraciji od 150 µg/mL). Inhibicija je bila ovisna o dozi, a vrijednost IC₅₀ (koncentracija ekstrakta koja izaziva 50% maksimalne inhibicije) bila je 118,1 µg/mL (52).

3.3. Rezultati studija provedenih na *in vivo* modelima

Proveden je veći broj *in vivo* istraživanja kako bi se utvrdio utjecaj kemferola na zacjeljivanje rana. Jedno od njih je provedeno na štakorima sa i bez dijabetesa, na incizijskim i ekscizijskim modelima rana. Dijabetes je izazvan streptozotocinom. Kemferol je pripremljen u obliku masti s mješavinom glikol stearata, propilen glikola i tekućeg parafina u omjeru 3:6:1 kao podlogom. Mast je pripremljena u koncentracijama kemferola od 0,5% i 1%. Topikalno je aplicirano 0,5 g masti na rane jednom dnevno tijekom 7 i 14 dana. Makroskopskim pregledom rana utvrđen je najbolji učinak zacjeljivanja rana kod dijabetičkih ekscizijskih (92,12%) i nedijabetičkih incizijskih rana (94,17%) tretiranih s 1%-tnom kemferol masti. Nedijabetičke ekscizijske (14. dan) i incizijske (7. dan) rane tretirane s 1%-tnom kemferol masti pokazale su više razine hidroksiprolina u usporedbi s kontrolnim skupinama. Nadalje, rezultati reepitelizacije dijabetičkih i nedijabetičkih ekscizijskih rana 7. i 14. dan te incizijskih rana 14. dan bili su značajno viši od kontrolnih. Najbolja vlačna čvrstoća zabilježena je u skupinama nedijabetičkih (0,92 g/s) i dijabetičkih štakora (0,82 g/s) tretiranih s 0,5%-tnom kemferol masti tijekom 14 dana (53).

Analizom *Zizhu masti* (ZZO), tradicionalnog kineskog lijeka, identificirani su aktivni spojevi izovaleril shikonin, mandenol, daidzein, kemferol i formononetin. Studija je ispitala potencijal zacjeljivanja rana na miševima sa i bez dijabetesa. Rane na koži pune debljine (1 × 1 cm, s dubinom do fascijalnog sloja) kirurški su stvorene na leđima miševa podizanjem kože pincetom. Rana je previjena gazom od 1 cm² impregniranom fosfatnim puferom pH 7.4 ili ZZO masti (50 mg/cm²). Miševi su nasumično raspoređeni u 3 skupine, uključujući skupinu bez

dijabetesa i skupinu s dijabetičkim ulkusom (DU) bez ili sa ZZO terapijom. ZZO je značajno pospješio cijeljenje rana u DU skupini nakon 7 i 14 dana liječenja. Stopa zacjeljivanja rana bila je brža u skupini liječenoj ZZO-om nego u netretiranoj DU skupini. Dodatno, hematoksilinsko-eozinsko (H&E) bojanje tkiva rane otkrilo je smanjenje upalnih stanica i više integralnog epitela u ZZO skupini. Stvoreno je više kolagena, a novostvorena kolagena vlakna bila su izrazito deblja u skupini liječenoj ZZO-om. Nadalje, količina novostvorenih krvnih žila i kolagenih vlakana bila je znatno veća u skupini ZZO u usporedbi s netretiranom DU skupinom. mRNA ekspresija α -aktin glatkih mišića (α -SMA), kolagena I, kolagena III i VEGF-a bila je veća u skupini liječenoj ZZO-om. Rezultati su pokazali da je liječenje ZZO-om potaknulo cijeljenje rana protuupalnim djelovanjem, proangiogenezom i profibrozom područja rane u DU miševa (54).

Vrsta *Teucrium polium* poznata je po svom antioksidacijskom, protuupalnom i antimikrobnom učinku. Jedna studija istražila je utjecaj kitozanskoga nanosustava s ekstraktom vrste *Teucrium polium* (TP-NP) na cijeljenje rana u štakora kod kojih je dijabetes induciran streptozotocinom. Ekstrakt je sadržavao $7,85 \pm 0,022$ mg/g kemferola kao glavne sastavnice, te po $0,140 \pm 0,00105$ mg/g, i $0,102 \pm 0,0005$ mg/g galne kiseline, odnosno apigenina. Rane su napravljene metodom ekscizije, a štakori su podijeljeni u 5 skupina s po 10 štakora u svakoj. Skupina 1 (netretirani kontrolni štakori) primila je obični hidrogel lokalno na ranu; skupina 2 tretirana je kitozanskim nanogelom (CS-NG); skupina 3 tretirana je s 0,5 g ekstrakta TP-a pripremljenog u hidrogelu; skupina 4 primila je 0,5 g TP-NP-a te skupina 5 predstavljala je pozitivnu kontrolu tretiranu s 0,5 g Mebo[®] masti (0,25% β -sitosterol). Svi tretmani primjenjivani su svaki dan tijekom tri tjedna. Lokalna primjena TP-NP-a pokazala je postupno smanjenje rana počevši od 7. dana. Na dan 21, TP-NP je značajno ubrzao cijeljenje rana u odnosu na netretirane skupine i skupine tretirane nosačem, pokazujući gotovo potpuno zacjeljivanje. Zanimljivo je da je pripremljena TP-NP formula otkrila znatno bolji utjecaj na

zacjeljivanje u usporedbi s običnom TP skupinom. Primjena TP-NP-a na dijabetičke rane ubrzala je proces cijeljenja regeneracijom epitela, stvaranjem granulacijskog tkiva te epidermalnom proliferacijom, zajedno s keratinizacijom što je potvrdilo H&E bojanje tkiva. Potvrđena je pojačana sinteza kolagena, prikazana povećanjem sadržaja hidroksiprolina. Štoviše, TP-NP je značajno smanjio oksidacijski stres te ekspresiju upalnih biomarkera. Imunohistokemijskim bojanjem pokazana je povećana ekspresija TGF- β 1-a te angiogenih markera VEGF- α i receptora PDGF- α . Zaključno, učinak TP-NP-a na poboljšano zacjeljivanje dijabetičkih rana objašnjen je ublažavanjem oksidativnog stresa i upale zajedno s proangiogenim sposobnostima (55).

I druge studije pokazale su pozitivan utjecaj nanotehnoloških pripravaka s kemferolom na cijeljenje rana. Priređena su svileni fibroinska nanovlakna. Vlakna su bila obložena kolagenom te su sadržavala i kemferol hidrat kao aktivnu tvar. Utjecaj na cijeljenje rana procijenjen je *in vivo*. Priređena nanovlakna pokazala su dobre antioksidacijske značajke i pospješila su cijeljenje rana smanjujući upalu i povećavajući taloženje kolagena (56). Učinak etanolno-etilacetatnog ekstrakta sjemenke vrste *Cuscuta chinensis* uklopljenog u nanoemulziju ispitan je na ekscizijskom modelu rana štakora. Štakori su nasumično podijeljeni u tri skupine (n = 21). U negativnoj kontrolnoj skupini korištena je 0,9% fiziološka otopina (n = 7); u tretiranoj skupini nanoemulzija s ekstraktom *C. chinensis* u obliku gela (n = 7); a u pozitivnoj kontrolnoj skupini 2% Fucidin krema (n = 7). Rane su tretirane jednom dnevno tijekom 21 dana. Skupina tretirana nanoemulzijskim gelom pokazala je značajan utjecaj na proces cijeljenja rana u odnosu na netretiranu skupinu (negativna kontrola). Također, nanoemulzijski gel povećao je postotak kontrakcije rane više od Fucidin kreme u svim vremenskim intervalima (1., 6., 12., 18. i 21. dan). Ekstrakt je bio učinkovit pri koncentracijama od 50 i 100 μ g/mL (57).

Etanolni ekstrakt lista biljne vrste *Gynura procumbens* bogat kemferolom ispitan je *in vivo* na zdravim i dijabetičkim miševima kojima su stvorene rane pune debljine. Rane su tretirane topikalno s 0,5%-tnim ispitivanim ekstraktom, dok je kontrolna skupina tretirana vazelinom. Rezultati su pokazali značajno poboljšanje zacjeljivanja kod miševa tretiranih ekstraktom *G. procumbens*. Ekstrakt je skratio vrijeme zacjeljivanja za 30% kod zdravih i 40% kod dijabetičnih miševa. Kod zdravih miševa, potpuni oporavak rana zabilježen je unutar 16 dana, u usporedbi s 26 dana kod kontrolne skupine. Kod dijabetičnih miševa, potpuni oporavak zabilježen je unutar 22 dana kod tretiranih miševa, dok je kontrolnoj skupini trebalo 35 dana za potpuno zacjeljivanje. Histološke analize otkrile su povećanu proliferaciju keratinocita, fibroblasta i endotelnih stanica. Ekstrakt je također inducirao ekspresiju različitih angiogenih faktora kao što su angiogenin (ANG), EGF, FGF, TGF- β i VEGF (43).

Na štakorima je provedeno istraživanje kako bi se ispitaio učinak listova *Eugenia pruniformis* na zacjeljivanje rana te identificirali i kvantificirali njihovi glavni flavonoidi. Korišten je model ekscizije rana te hidroetanolni i etilacetatni ekstrakti ispitivane biljne vrste. Histološke analize pokazale su značajno poboljšanje u epitelizaciji i reorganizaciji dermisa u skupini tretiranoj etilacetatnim ekstraktom u odnosu na skupinu tretiranu hidroetanolnim ekstraktom i netretiranu skupinu (kontrolna skupina) 8. i 15. dan ispitivanja. Skupina tretirana etilacetatnim ekstraktom imala je kompletnu remodelaciju epidermisa 15. dan ispitivanja. Za kvantifikaciju kolagena, korištena je metoda određivanja hidroksiprolina. Skupina tretirana etilacetatnim ekstraktom pokazala je povećanje razine hidroksiprolina za 100% u odnosu na kontrolu, dok je skupina tretirana hidroetanolnim ekstraktom pokazala povećanje od 34%. Etilacetatni ekstrakt bio je bogat flavonoidima, uključujući kvercetin, kemferol i hiperozid, s ukupnim udjelom flavonoida od 43%. Ovaj ekstrakt je također pokazao i visoku antioksidacijsku aktivnost u DPPH testu s EC₅₀ vrijednošću od $7,05 \pm 0,09$ $\mu\text{g/mL}$, što može pridonijeti procesu cijeljenja kontrolom oksidativnog stresa (58).

Metanolni ekstrakt sjemenki *Moringa oleifera* pokazao je pozitivan učinak na cijeljenje ekscizijskih rana na modelu albino kunića. Kunići su podijeljeni u 3 skupine: kontrolna skupina bez tretmana, skupina tretirana ekstraktom *M. oleifera* te skupina tretirana s Mebo® masti (pozitivna kontrola). Praćena je stopa zacjeljivanja tijekom 14 dana. Primjena ispitivanog ekstrakta značajno je ubrzala proces zacjeljivanja rana u usporedbi s netretiranom skupinom. Nakon 7. dana tretmana, stopa zacjeljivanja rana u skupini tretiranoj ekstraktom iznosila je 45%, što je bilo znatno više nego u netretiranoj skupini. Na 10. dan, stopa zacjeljivanja iznosila je 70% u skupini tretiranoj ekstraktom, u usporedbi s 37% u netretiranoj skupini. Na 14. dan, rana u skupini tretiranoj ekstraktom bila je gotovo potpuno zacjeljena (96%), dok je u skupini tretiranoj Mebo® masti zacjeljivanje iznosilo 91%. Histopatološki pregled uzoraka tkiva s mjesta rana podržao je ove nalaze, pokazujući značajnu reepitelizaciju, punjenje granulacijskim tkivom i formiranje snopova kolagena u ranama tretiranim ekstraktom. Dodatno, ekspresija TGF- β -a, VEGF-a i kolagena tipa I bila je značajno povećana, dok su razine IL-1 β -a i TNF- α -a bile smanjene, što ukazuje na smanjenje upale i poboljšanje zacjeljivanja (29).

Ispitan je učinak masti s 1,5%-tnim udjelom metanolnog ekstrakta vrste *Astragalus microcephalus* na štakorima tretiranim tijekom 21 dan. Ispitivanje je rađeno na ranama pune debljine, a kontrolne skupine uključivale su srebrov sulfadiazin, vazelin i netretirane skupine. Mjerenje zatvaranja rana pokazalo je značajno poboljšanje u skupini tretiranoj ekstraktom *A. microcephalus* u usporedbi s kontrolnim skupinama. Skupina tretirana ispitivanim ekstraktom je 7. dan ispitivanja imala 73,8% zatvorenost rana, dok je skupina tretirana vazelinom imala 66,7%, srebrovim sulfadiazinom 54% te netretirana skupina 55,1%. Svi tretirani štakori imali su preko 90% zacjeljivanje rane nakon 14 dana, pri čemu je skupina tretirana ekstraktom (93,3%) pokazala bolje rezultate u usporedbi s kontrolnim skupinama (srebrov sulfadiazin 91,3%, vazelin 89,7%, netretirana skupina 85,6%). Također, histopatološki rezultati potvrdili

su da su smanjeni upalni faktori, a da je povećana proliferacija fibroblasta i epitelizacija u skupini tretiranoj ekstraktom *A. microcephalus* (45).

Provedeno je istraživanje metanolnog ekstrakta listova biljne vrste *Malva neglecta* koristeći životinjske modele. Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s nizom dioda (HPLC-DAD) i plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom (GC-MS) potvrđeno je nekoliko fenolnih spojeva prisutnih u većoj količini, među kojima su bili i kemferol i kvercetin. Učinak je ispitan na štakorima koristeći ekscizijske rane mjerenjem postotka kontrakcije i epitelizacije rane. Ekstrakt je formuliran u obliku masti te primjenjivan topikalno na površinu rane jednom dnevno tijekom 15 dana u različitim dozama. Promjene u veličini rane mjerene su i bilježene svakog trećeg dana do potpune epitelizacije i potpunog zatvaranja rane. Ispitivanje je pokazalo značajnu tendenciju zacjeljivanja rana u svim koncentracijama (1 g, 1,5 g, 2 g ekstrakta na 10 g masti) smanjujući period zacjeljivanja proporcionalno s koncentracijom masti. Gotovo potpuno zacjeljivanje (99,6%) uočeno je nakon primjene masti koncentracije 2 g/10 g masti 15. dan od početka ispitivanja. Tretirane skupine su pokazale značajno kraći period epitelizacije (12-15 dana) u usporedbi s netretiranom skupinom kojoj je trebalo 18-20 dana za potpuno zacjeljivanje (59).

U studiji na hidroetanolnom ekstraktu lista *Curatella americana* (HECA) identificirano je ukupno 13 spojeva, uglavnom derivata kvercetina i kemferola. Za ispitivanje je pripremljena vodena otopina hidroetanolnog ekstrakta *C. americana* te ekstrakt u formi gela. Učinak zacjeljivanja ispitan je na miševima korištenjem modela ekscizijske rane. Rane su tretirane 0,5% i 1% HECA otopinom, 0,5% i 1% HECA gelom te baznim gelom bez ekstrakta. Sve skupine tretirane HECA ekstraktom imale su značajno veću stopu kontrakcije rana u usporedbi s kontrolnom skupinom na 7. dan ispitivanja. Skupina tretirana 0,5%-tnom otopinom imala je kontrakciju rana od 73%, 1%-tnom otopinom 85%, 0,5%-tnim gelom 74% te 1%-tnim gelom

75%, dok je kontrolna skupina imala kontrakciju od 61%. 14. dan ispitivanja su sve tretirane skupine postigle gotovo potpunu kontrakciju rana (60).

In vivo istraživanje etanolnog ekstrakta sjemene ljuske vrste *Castanea mollissima* rađeno je na štakorima pomoću ekscizijskih i incizijskih modela. Rane su tretirane etanolnim ekstraktom u obliku masti (1%, 3% i 5%, *m/m*) tijekom 20 dana. Kontrolna skupina je tretirana baznom masti bez ekstrakta. Mjera cijeljenja je bio postotak zatvaranja rane te period epitelizacije. Najučinkovitije su bile 3% i 5%-tna mast koje su 20. dan pokazale potpuno zatvaranje rane, dok je 1%-tna mast imala 95,3% i kontrolna skupina 88,5% kontrakciju rana. Dodatno, histopatološki pregledi tkiva rana su potvrdili najbolju učinkovitost 3% i 5%-tne masti pokazujući potpunu epitelizaciju, gustu mrežu kolagenih vlakana i obilnu vaskularizaciju za razliku od skupine tretirane 1%-tnom masti i kontrolne skupine koje nisu imale dobre rezultate (61).

Slično istraživanje rađeno je i na etilacetatnoj frakciji lista *Dodonaea viscosa*. Sposobnost zacjeljivanja rana etilacetatne frakcije masti *D. viscosa* (DVFO) ispitivana je na štakorima na incizijskim i ekscizijskim ranama. Skupine su tretirane s 2,5% i 5% *m/m* DVFO-om, povidon jodidom (5% *m/m*) i baznom masti kao kontrolom. Rezultati su pokazali značajno ubrzanje cijeljenja rana u skupinama tretiranim DVFO-om u usporedbi s kontrolom. Skupina tretirana s 5% DVFO-om pokazala je zatvaranje rana od 94,9% do 15. dana liječenja, u usporedbi s 73,9% u kontrolnoj skupini. Razine hidroksiprolina bile su značajno povećane u DVFO tretiranim skupinama (73,5 mg/g) te slične onima tretiranim pozitivnom kontrolom, povidon jodidom (79 mg/g). Histopatološka analiza pokazala je poboljšanu reepitelizaciju, formaciju kolagena i vaskularizaciju u tretiranim skupinama. Na 7. dan ispitivanja, u DVFO tretiranim skupinama zabilježeno je više kapilara i fibroblasta u granulacijskom tkivu u usporedbi s kontrolom. Mjerenje 15. dan pokazalo je da su liječene rane imale značajno više kolagenih vlakana i dermalnih krvnih žila u usporedbi s kontrolnom skupinom. Western blot

analiza je pokazala pojačanu ekspresiju kolagena tipa 3, osnovnog faktora rasta fibroblasta (bFGF) i VEGF-a u granulacijskom tkivu rana u skupinama liječenim DVFO-om (62).

Frakcija obogaćena polifenolima iz kore biljne vrste *Annona crassiflora* (PEF-Ac) koja sadrži klorogensku kiselinu, epikatehin, procijanidine B2 i C1, kvercetin-glukozid, kemferol i kaveoil-glukozid ispitana je zbog potencijala u cijeljenju kožnih rana. Za ispitivanje je korištena kombinacija etilacetatne i n-butanolne frakcije dobivene iz etanolnog ekstrakta kore ploda ispitivane biljke. Istraživanje je rađeno na miševima na ekscizijskim ranama pune debljine koje su tretirane vazelinom i lanolinom kao kontrolnom skupinom te PEF-Ac-om u koncentracijama od 2%, 4% i 6% tijekom 4 i 7 dana. Rezultati su pokazali da su sve koncentracije PEF-Ac-a značajno poboljšale cijeljenje rana u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nakon 4 dana tretmana, postotak kontrakcije rana iznosio je 32% za 2%-tni PEF-Ac, 38% za 4%-tni PEF-Ac i 36% za 6%-tni PEF-Ac, dok je u kontrolnoj skupini iznosio 20%. Nakon 7 dana, 2% PEF-Ac je pokazao bolju zatvorenost rana (84%) u usporedbi s približno 75% u kontrolnoj skupini i ostalim koncentracijama PEF-Ac-a. Histološka analiza tkiva rana je pokazala povećanu sintezu kolagena tipa I i III u PEF-Ac skupinama, što je koreliralo s poboljšanim cijeljenjem rana. PEF-Ac u koncentraciji 4% i 6% povećao je taloženje kolagena nakon 4 dana, dok su sve koncentracije pokazale značajna povećanja nakon 7 dana. S druge strane, PEF-Ac nije pokazao učinkovito proangiogeno djelovanje, s privremenim povećanjem razine hemoglobina i broja krvnih žila samo pri koncentraciji od 6% nakon 4 dana (16).

Učinak ekstrakta listova vrste *Lafoensia pacari* na cijeljenje rana procijenjen je *in vivo* testovima na ekscizijskim i incizijskim modelima rana u štakora. Rane su tretirane svaki dan hidroetanolnim ekstraktom *L. pacari* u obliku gela u različitim koncentracijama (10, 30 ili 100 mg/g gela) tijekom 24 dana. Kontrolna skupina je tretirana baznim gelom, a skupina liječena standardnom terapijom Madecassol® (*Centella asiatica* ekstrakt 10 mg/g) je služila kao pozitivna kontrola. U ekscizijskom modelu, površina rane praćena je kroz vrijeme, mjerena je

stopa kontrakcije rane i period epitelizacije. U incizijskom modelu, mjerena je čvrstoća kože kao mjera zacjeljivanja. Gel ispitivanog ekstrakta pokazao je značajnu učinkovitost u povećanju stope kontrakcije rane i ubrzavanju perioda reepitelizacije. Primjena gela u koncentracijama od 10 mg/g i 30 mg/g pokazala je potpunu reepitelizaciju rane za 22 dana i 21,7 dana. Pri koncentraciji od 100 mg/g, također je povećao stopu kontrakcije rane u odnosu na kontrolu, ali nije pokazao linearno povećanje učinkovitosti s povećanjem doze. U incizijskom modelu, primjena gela s ekstraktom u koncentracijama od 10, 30 i 100 mg/g povećala je čvrstoću kože mjerenu tenziometrom, što ukazuje na bolju kvalitetu tkiva i zrele kolagenske depozite. Najviša čvrstoća postignuta je pri dozi od 100 mg/g gela ($62,7 \text{ N/cm}^2$), dok je kontrolna skupina tretirana čistim gelom pokazala značajno nižu čvrstoću ($44,1 \text{ N/cm}^2$). Histopatološka analiza rana pokazala je da gel s ekstraktom smanjuje edem, povećava proliferaciju fibroblasta, kolagenske depozite i neovaskularizaciju, čime se potvrđuje njegovo zacjeljujuće djelovanje. Mjerenje stope kontrakcije rana, perioda cijeljenja, vlačne čvrstoće i histopatološke analize su utvrdile da je učinak *L.pacari* usporediv sa standardnom terapijom Madecassol® (42).

Nadalje, studija rađena na ekstraktu nadzemnih dijelova biljne vrste *Caralluma europaea* također je kao pozitivnu kontrolu koristila Madecassol®. U ovoj studiji ispitivanje je provedeno na opeklinama štakora induciranim aluminijskim štapom zagrijanim na 100°C . Liječenje je počelo 24 sata nakon stvaranja rane i trajalo je 21 dan. Rane su tretirane 10%-tnom mašću od etilacetatnog ekstrakta lista *C. europaea*, pozitivnom kontrolom Madecassol®-om te negativnom kontrolom vazelinom. Luteolin i kemferol glavni su spojevi identificirani u ispitivanom ekstraktu. Mast s ekstraktom postigla je kontrakciju rana od 34,5% 4. dan, 70,7% 8. dan, 85,1% 12. dan, 96,7% 16. dan i 100% 21. dan. Ovi rezultati bili su značajno viši u usporedbi s kontrolnim skupinama. Skupina tretirana vazelinom pokazala je kontrakciju od samo 76,3%, dok je pozitivna kontrola ostvarila 93% 21.dan ispitivanja (63).

Istraživanje biljne vrste *Bergia ammannioides* rađeno je na različitim frakcijama ekstrakta nadzemnih dijelova biljke. Eksperimentalni postupak uključivao je frakcioniranje etanolnog ekstrakta (EtOH) nadzemnih dijelova kako bi se dobile *n*-heksanske (HxFr), kloroformne (ClFr), etil acetatne (EtFr) i *n*-butanolske (BuOH) frakcije. EtOH i njegove frakcije formulirane su u obliku 5 i 10%-tnih masti i testirane su korištenjem modela ekscizije. Mjera zacjeljivanja je bio postotak kontrakcije rane te sadržaj kolagena u ranama. Primjena 10%-tnih masti EtOH-a, HxFr-a i EtFr-a tijekom 10 dana dovela je do 71,77%, 85,62% i 82,29%-tnog zatvaranja rana. Biokemijskim metodama je utvrđeno da su masti s EtOH, HxFr i EtFr frakcijama značajno povećale sadržaj kolagena u tkivu rana 6. i 10. dan u usporedbi s kontrolom, pri čemu je HxFr frakcija pokazala najizraženiju aktivnost. Kvercetin, elagična kiselina, kemferol-3-*O*- α -L-ramnozid i kvercetin-3-*O*- α -L-ramnozid izolirani su iz etilacetatne frakcije, dok su iz *n*-heksanske frakcije izolirani β -sitosterol, lupeol, ciklolaudenol i cikloartenol (64).

Procjena učinka listova, cvjetova i stabljika vrste *Epilobium angustifolium* na cijeljenje rana provedena je *in vivo* na miševima pomoću ekscizijskih i incizijskih modela rana. Rane su tretirane 1%-tnim etilacetatnim ekstraktom u kojem se, između ostalih sastavnica, nalazio kemferol i njegov derivat kemferol-3-*O*- α -L-ramnopiranozid. Istraživanje je trajalo 15 dana. Kontrolne skupine nisu tretirane ili su bile tretirane čistom bazom za pripremu formulacija. Na ekscizijskim ranama je mjereno smanjenje površine rane, a na incizijskim vlačna čvrstoća pomoću tenziometra. *E. angustifolium* značajno je smanjio površinu rane s vrijednošću kontrakcije od 63,8% u 15 dana liječenja što je značajno veće u usporedbi s kontrolnom skupinom tretiranom čistom bazom (11,8%) i netretiranom skupinom (10,8%). Slično, na modelu incizijske rane ispitivani ekstrakt značajno je povećao vlačnu čvrstoću (5269,8 Pa), dok je u netretiranoj skupini (2988,2 Pa) i kontrolnoj skupini tretiranoj bazom (3459,5 Pa) ona bila znatno manja (51).

Provedeno je ispitivanje lista biljne vrste *Aerva javanica* na zacjeljivanja rana u konja. Konji imaju problem s prekomjernim stvaranjem granulacijskog tkiva koje usporava cijeljenje rane i potiče stvaranje velikih ožiljaka, što se može usporediti s keloidima u ljudi. Studija je uključivala topikalnu primjenu ekstrakata *A. javanica* na rane konja s poviješću izostanka odgovora na konvencionalne tretmane te vizualno praćenje promjena u veličini granulacijskog tkiva. Glavni testirani ekstrakti bili su WEM2 (vodeni ekstrakt pripremljen metodom frakcioniranja i kromatografijom sa silicijevim gelom), WEM2F2 (pročišćeni frakcijski ekstrakt dobiven daljnjom obradom WEM2 ekstrakta) i E III (ekstrakt dobiven metanolnom ekstrakcijom i daljnjim pročišćavanjem). Navedenim ekstraktima tretirano je 15 kliničkih slučajeva prekomjernog stvaranja granulacijskog tkiva kod konja. Ekstrakti su topikalno primijenjeni kao sprej u koncentraciji od 1 mg/mL dnevno do suzbijanja rasta granulacijskog tkiva. Kontrolne skupine uključivale su konje s neliječenim ranama. Primjena WEM2-a i WEM2F2-a pokazala je značajno smanjenje veličine granulacijskog tkiva. Ovo djelovanje je pripisano antiangiogenetskom učinku kemferola. Tretman je doveo do obnove normalne funkcije kože, pri čemu je histopatološka analiza otkrila minimalne upalne stanice i normalizirano taloženje kolagena. Ovo je u oštroj kontrastu s neliječenim skupinama, koje su pokazale trajno granulacijsko tkivo i upalu (65).

Upala je važna faza u cijeljenju rana, međutim, prekomjerna upala uzrokuje otežano zacjeljivanje. Protuupalni učinak vodenog ekstrakta nadzemnih dijelova biljne vrste *Scutellaria brevibracteata*, te iz njega izoliranog 3-*O*-metil kemferola, ispitan je na edemu šape kod miševa. Ekstrakt je davan oralno u dozama od 100 i 200 mg/kg, dok je 3-*O*-metil kemferol, davan u dozama od 25 i 50 mg/kg. Indometacin u dozi od 20 mg/kg korišten je kao referentni lijek, a destilirana voda služila je kao kontrola. Vodeni ekstrakti su značajno smanjili edem šape. Derivat kemferola, 3-*O*-metil kemferol, pokazao je nešto manje smanjenje edema u odnosu na vodene ekstrakte, ali usporedivo s indometacinom. Isti spoj u dozi 25 mg/kg smanjio

je edem za 58%. Također, Western blot analizom je utvrđeno da je 3-*O*-metil kemferol smanjio razine upalnih čimbenika ciklooksigenaze-2 (COX-2), inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS) te nuklearnog faktora- κ B (NF- κ B) u usporedbi s netretiranom skupinom. Kontrolna skupina, tretirana destiliranom vodom, nije pokazala smanjenje upale, čime je potvrđena učinkovitost 3-*O*-metil kemferola u testiranim koncentracijama. Studija je pokazala da je 3-*O*-metil kemferol imao protuupalni učinak jednak indometacinu (66).

Kako bi se istražio učinak biljne vrste *Coccinia grandis* na cijeljenje rana, provedena je studija na polifenolima bogatoj frakciji dobivenoj iz metanolnog ekstrakta lista kromatografskim frakcioniranjem. Identificirano je šest flavonoida: rutin, kvercetin-3-*O*-neohesperidozid, kemferol-3-*O*-rutinozid, kemferol-3-*O*-neohesperidozid, kemferol-3-*O*-glukozid i kemferol-heksozid. Učinak ispitivane frakcije lista *C. grandis* ispitan je na ekscizijskim ranama štakora inficiranim bakterijskom vrstom *Bacillus cereus*. Ekstrakt je primijenjen u obliku hidrogela, a kontrolne skupine uključivale su netretirane rane, rane tretirane hidrogel bazom te rane tretirane fucidin kremom kao standardnim lijekom. Testiranje je provedeno primjenom 0,5 g hidrogela dnevno kroz 5 dana. Hidrogel s ekstraktom pokazao je izraženu inhibiciju rasta bakterija (85,08%) u usporedbi s kontrolnom skupinom (16,50%) tretiranom čistim hidrogelom. Antimikrobna aktivnost hidrogela frakcije bila je gotovo jednaka aktivnosti fucidin kreme (90,88%) tijekom svih dana liječenja. Skupina liječena hidrogelom imala je puno bolju sposobnost zacjeljivanja rane u usporedbi s kontrolnom skupinom, što se pratilo smanjenjem veličine rane te ponovnim rastom dlaka. Nadalje, histopatološka analiza potvrdila je puno bolje stvaranje kolagena (18,71%) u skupini tretiranoj *C. grandis* u usporedbi s kontrolnom skupinom (6,84%) (67).

4. RASPRAVA

Rane nastaju kao rezultat razaranja strukture i cjelovitosti kože pod utjecajem različitih unutarnjih ili vanjskih podražaja. Najčešći čimbenici koji pridonose nastanku rana su opekline, traume, kirurški rezovi i dijabetes. Tijelo ima prirodnu sposobnost brzog pokretanja procesa zarastanja rane kako bi se obnovio integritet kože. Međutim, u nekim okolnostima, poput infekcije rane, nekontrolirane upale rane, vaskularne/živčane disfunkcije, proces zacjeljivanja rane može biti usporen te nastaju kronične rane od kojih su najčešće dijabetičke (68).

U ovom radu pregledana su znanstvena ispitivanja utjecaja kemferola i ekstrakata biljnih vrsta koje ga sadrže na cijeljenje rana, dostupna na elektroničkoj bazi PubMed. Nakon pretraživanja u rad je uključeno 45 studija. Većina studija uključenih u rad ispitivanje je provodila korištenjem ekstrakata biljnih vrsta kojima je kemferol bio jedna od sastavnica odgovorna za djelovanje, dok su studije koje su ispitivale učinak čistog kemferola na cijeljenje rana te njegov mehanizam djelovanja bile relativno malobrojne.

Ekstrakti s kemferolom djelovali su bolje ili jednako dobro na zacjeljivanje rana u odnosu na standardnu terapiju poput hidrokortizona, deksametazona, Madecassol®-a (*Centella asiatica* ekstrakt), vazelina, alantoina, fusidatne kiseline i povidon-jod masti (32,37,42,45,62,63,67).

Studije obuhvaćene ovim radom pokazale su da kemferol djeluje na tri faze zacjeljivanja rana, upalnu, proliferativnu te fazu reepitelizacije i remodeliranja. Kemferol pojačava migraciju stanica u proliferativnoj fazi cijeljenja. Migracija stanica je ključna za cijeljenje jer omogućava obnovu tkiva i formiranje novih stanica na mjestu ozljede. Mehanizam uključuje indukciju formiranja filopodija i lamelipodija, povećanje stanične razine fosforilirane fokalne adhezijske kinaze (FAK) (Tyr 397) i fosforilirane protein kinaze B (PKB ili Akt) (Ser 473) te pojačanu regulaciju aktivnog Rac1-GTP-a (25). Nadalje, sami kemferol je pokazao učinak i na fazu reepitelizacije, tj remodeliranja putem inhibicije matriksnih metaloproteinaza MMP-1, MMP-2 i MMP-9 (27,29). Utjecaj kemferola na reepitelizaciju potvrđen je i studijom koja je pokazala

povećanu sintezu i taloženje kolagena u ranama što je važno za strukturnu obnovu i stabilizaciju rane (53).

Upala je važan dio procesa cijeljenja rana jer pokreće ključne procese za obnovu tkiva. Međutim, prekomjerna upala može usporiti proces i dovesti do komplikacija, stoga je protuupalni učinak kemferola i srodnih flavonoida, poput kvercetina, važan segment njihovog djelovanja na cijeljenje rana (69,70). Studije su pokazale da je kemferol inhibirao učinak proupalnih enzima i drugih proteina poput lipoksigenaze, COX-2-a, iNOS-a, NF- κ B-a te IL-6-a, IL-1 β -a te TNF- α -a (29,66,71). Izvrstan protuupalni učinak kemferola bio je usporediv s indometacinom (66).

E. angustifolium, biljna vrsta bogata kemferolom inhibira hijaluronidazu i kolagenazu, enzime čija inhibicija pomaže u održavanju integriteta tkiva, potiče obnovu i ubrzava proces cijeljenja (51). Kako je kemferol poznati inhibitor hijaluronidaze i kolagenaze, izvjesno je da je upravo on jedna od ključnih sastavnica koja doprinosi opaženom učinku (72,73). I drugi flavonoidi mogu inhibirati navedene enzime. Primjerice, kvercetin je izvrstan inhibitor kolagenaze (73). Jedan od načina poboljšanja cijeljenja je i antimikrobni učinak. Brojna znanstvena istraživanja potvrdila su izvrstan antifungalni, antivirusni te antibakterijski učinak kemferola i drugih flavonoida. Primjerice, antibakterijsko djelovanje kvercetina pripisuje se inhibiciji DNA giraze (74). U obrađenim studijama ekstrakti s kemferolom su pokazali učinak na vrste koje inficiraju rane poput *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* vrste te *Candida* vrste (40,41,50,67). Jedan od važnih učinaka ekstrakata s kemferolom je i antioksidacijski učinak (21). Kemferol smanjuje oksidativni stres, štiti stanice, podržava sintezu kolagena, regulira upalni odgovor i poboljšava angiogenezu (45,75).

Poremećaji u cijeljenju rana su jedna od značajki dijabetesa koje značajno smanjuju kvalitetu i životni vijek pogođenih pacijenata. Hiperglikemično okruženje mijenja normalan proces zacjeljivanja i povećava rizik od mikrobne infekcije, što može dovesti do hospitalizacije,

morbiditeta i amputacije. Kemferol i drugi flavonoidi poput kvercetina, hesperidina, rutina i luteolina pokazali su značajan potencijal u zacjeljivanju dijabetičkih rana. Flavonoidi održavaju razinu glukoze u krvi, smanjuju otpornost na inzulin, inhibiraju mikrobni rast i upalu, moduliraju citokine i faktore rasta, stimuliraju angiogenezu i inhibiraju MMP-aze (77). Zahvaljujući svojim učincima flavonoidi izvrsno zacjeljuju rane pa nije nimalo iznenađujuće što i kemferol i ekstrakti koji ga sadržavaju pozitivno utječu na zacjeljivanje dijabetičkih rana (10,44,54–56).

Obloge za rane su vrlo važne u terapiji rana, pogotovo kroničnih kao što su dijabetičke rane. One služe kao fizička barijera, upijaju eksudat te održavaju vlažnost potrebnu za obnovu rane (77). Inovativne obloge često koriste prirodne ekstrakte i nanomaterijale. Primjerice, med se koristi u oblogama za rane zbog dokazanog blagotvornog učinka na zacjeljivanje koje se pripisuje flavonoidima kojim obiluje (78). I biljne vrste bogate kemferolom pokazale su se izvrsnim sastavnicama obloga za rane. *Moringa oleifera* i *Aloe vera* su bile kompatibilne u oblogama i pospješile su zacjeljivanje, a i obloge sa čistim kemferolom su imale izvrsnu učinkovitost (30,38,39,56).

5. ZAKLJUČAK

Provedene studije ističu značajan potencijal kemferola i biljnih ekstrakata koji ga sadrže u pospješivanju cijeljenja rana te smanjenju stvaranja ožiljaka. Učinak kemferola temelji se na regulaciji upalnih čimbenika, pojačanoj migraciji stanica, inhibiciji matriksnih metaloproteinaza te povećanoj sintezi kolagena. Usporedbe sa standardnom terapijom otkrivaju da biljni ekstrakti s kemferolom djeluju bolje ili jednako dobro kao konvencionalna terapija poput Madecassol[®]-a, alantoina, fusidatne kiseline ili hidrokortizona. Biljni ekstrakti s kemferolom pokazuju i bakteriostatski učinak na *Bacillus cereus* te *Staphylococcus* vrste, kao i antifungalni učinak na *Candida* vrste. Inovativne obloge za rane koje integriraju kemferol i biljne ekstrakte s kemferolom pokazuju dobru biokompatibilnost, povećanu proliferaciju fibroblasta, antioksidacijski učinak i smanjenu upalu rane. Kemferol i biljni ekstrakti koji ga sadrže također su pokazali značajnu učinkovitost u cijeljenju dijabetičkih rana. Budući da je dostupan mali broj studija koje su ispitale čisti kemferol, ne možemo sa sigurnošću tvrditi da je zacjeljujući učinak svih ispitivanih ekstrakata posljedica isključivog djelovanja kemferola. Puno je vjerojatnije da je za zacjeljujući učinak zaslužan sinergistički učinak više kemijskih supstanci prisutnih u biljnim ekstraktima, a studije provedene s čistim kemferolom potvrđuju da taj flavonoid zacijelo igra važnu ulogu u opaženoj aktivnosti. Ipak, kako bi se njegova učinkovitost potvrdila u kliničkoj praksi potrebno je provesti i dodatna ispitivanja koja bi potvrdila učinke na pacijentima.

6. LITERATURA

1. Walters KA, Roberts MS. The structure and function of skin. U: Walters KA ur. Dermatological and transdermal formulations. CRC Press, 2002;1-11.
2. Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and physiology of the skin. J Dermatol Nurses Assoc. 2011;3:203.
3. Tobin DJ. Biochemistry of human skin-our brain on the outside. Chem Soc Rev. 2006;35:52-67.
4. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. Exp Dermatol. 2008;17:1063–72.
5. Wang W, Lu K, Yu C, Huang Q, Du YZ. Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration. J Nanobiotechnology. 2019;17:82.
6. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. J Int Med Res. 2009;37:1528–42.
7. Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. Exp Cell Res. 2005;304:274–86.
8. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the treatment of chronic wounds. Adv Wound Care. 2015;4:560-82.
9. Boulton AJM, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. Lancet Lond Engl. 2005;366:1719–24.
10. Daemi A, Farahpour MR, Oryan A, Karimzadeh S, Tajer E. Topical administration of hydroethanolic extract of *Lawsonia inermis* (henna) accelerates excisional wound healing process by reducing tissue inflammation and amplifying glucose uptake. Kaohsiung J Med Sci. 2019;35:24-32.

11. Blažević F. Razvoj *in vitro* modela rane prikladnog za procjenu učinka nanosustava kitozana i melatonina na migraciju i proliferaciju fibroblasta [Diplomski rad]. Zagreb:Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2015.
12. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 2014;32:773–85.
13. Zhang M, Zhang C, Li Z, Fu X, Huang S. Advances in 3D skin bioprinting for wound healing and disease modeling. *Regen Biomater.* 2023;10:rbac105.
14. Albanna M, Binder KW, Murphy SV i sur. *In situ* bioprinting of autologous skin cells accelerates wound healing of extensive excisional full-thickness wounds. *Sci Rep.* 2019;9:1856.
15. Kang MS, Jang J, Jo HJ i sur. Advances and innovations of 3D bioprinting skin. *Biomolecules.* 2022;13:55.
16. de Moura FBR, Justino AB, Ferreira BA, Espindola FS, Araújo F de A, Tomiosso TC. Pro-fibrogenic and anti-inflammatory potential of a polyphenol-enriched fraction from *Annona crassiflora* in skin repair. *Planta Med.* 2019;85:570-7.
17. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016;5:e47.
18. Mssillou I, Bakour M, Slighoua M i sur. Investigation on wound healing effect of Mediterranean medicinal plants and some related phenolic compounds: a review. *J Ethnopharmacol.* 2022;298:115663.
19. Zulkefli N, Che Zahari CNM, Sayuti NH i sur. Flavonoids as potential wound-healing molecules: emphasis on pathways perspective. *Int J Mol Sci.* 2023;24:4607.
20. Chen HJ, Lin CM, Lee CY i sur. Kaempferol suppresses cell metastasis via inhibition of the ERK-p38-JNK and AP-1 signaling pathways in U-2 OS human osteosarcoma cells. *Oncol Rep.* 2013;30:925-32.

21. Imran M, Salehi B, Sharifi-Rad J i sur. Kaempferol: a key emphasis to its anticancer potential. *Mol Basel Switz*. 2019;24:2277.
22. Yani S, Opik T, Siti R, Ida K, Epa P. *In silico* analysis of kaempferol as a competitor of estrogen on estrogen receptor alpha of endometrial cancer. *J Phys Conf Ser*. 2019;1402:066109.
23. Chen J, Zhong H, Huang Z, Chen X, You J, Zou T. A critical review of kaempferol in intestinal health and diseases. *Antioxid Basel Switz*. 2023;12:1642.
24. Periferakis A, Periferakis K, Badarau IA i sur. Kaempferol: antimicrobial properties, sources, clinical, and traditional applications. *Int J Mol Sci*. 2022;23:15054.
25. Petpiroon N, Suktap C, Pongsamart S, Chanvorachote P, Sukrong S. Kaempferol-3-O-rutinoside from *Afgekia mahidolia* promotes keratinocyte migration through FAK and Rac1 activation. *J Nat Med*. 2015;69:340-8.
26. Ruttanapattanakul J, Wikan N, Okonogi S i sur. *Boesenbergia rotunda* extract accelerates human keratinocyte proliferation through activating ERK1/2 and PI3K/Akt kinases. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. 2021;133:111002.
27. Majtan J, Bohova J, Garcia-Villalba R i sur. Fir honeydew honey flavonoids inhibit TNF- α -induced MMP-9 expression in human keratinocytes: a new action of honey in wound healing. *Arch Dermatol Res*. 2013;305:619-27.
28. Kou X, Li B, Olayanju JB, Drake JM, Chen N. Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients*. 2018;10:343.
29. Shady NH, Mostafa NM, Fayez S i sur. Mechanistic wound healing and antioxidant potential of *Moringa oleifera* seeds extract supported by metabolic profiling, *in silico* network design, molecular docking, and *in vivo* studies. *Antioxid Basel Switz*. 2022;11:1743.

30. Chin CY, Jalil J, Ng PY, Ng SF. Development and formulation of *Moringa oleifera* standardised leaf extract film dressing for wound healing application. J Ethnopharmacol. 2018;212:188-99.
31. Amer AA, Mohammed RS, Hussein Y, Ali ASM, Khalil AA. Development of *Lepidium sativum* extracts/PVA electrospun nanofibers as wound healing dressing. ACS Omega. 2022;7:20683-95.
32. Syarina PNA, Karthivashan G, Abas F, Arulselvan P, Fakurazi S. Wound healing potential of *Spirulina platensis* extracts on human dermal fibroblast cells. EXCLI J. 2015;14:385-93.
33. Alsalamah SA, Alghonaim MI, Jusstaniah M, Abdelghany TM. Anti-yeasts, antioxidant and healing properties of henna pre-treated by moist heat and molecular docking of its major constituents, chlorogenic and ellagic acids, with *Candida albicans* and *Geotrichum candidum* proteins. Life Basel Switz. 2023;13:1839.
34. Agar OT, Dikmen M, Ozturk N i sur. Comparative studies on phenolic composition, antioxidant, wound healing and cytotoxic activities of selected *Achillea* L. species growing in Turkey. Mol Basel Switz. 2015;20:17976-8000.
35. Soib HH, Ismail HF, Husin F, Abu Bakar MH, Yaakob H, Sarmidi MR. Bioassay-guided different extraction techniques of *Carica papaya* (Linn.) leaves on *in vitro* wound-healing activities. Mol Basel Switz. 2020;25:517.
36. Kong YR, Jong YX, Balakrishnan M i sur. Beneficial role of *Carica papaya* extracts and phytochemicals on oxidative stress and related diseases: a mini review. Biology. 2021;10:287.
37. Verjee S, Garo E, Pelaez S, Fertig O, Hamburger M, Butterweck V. Saffron flower extract promotes scratch wound closure of keratinocytes and enhances VEGF production. Planta Med. 2017;83:1176-83.

38. Zeka K, Ruparelia KC, Sansone C, Macchiarelli G, Continenza MA, Arroo RRJ. New hydrogels enriched with antioxidants from saffron crocus can find applications in wound treatment and/or beautification. *Skin Pharmacol Physiol*. 2018;31:95-8.
39. Ramírez O, Pomareda F, Olivares B i sur. *Aloe vera* peel-derived nanovesicles display anti-inflammatory properties and prevent myofibroblast differentiation. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm*. 2024;122:155108.
40. Czemplik M, Kulma A, Bazela K, Szopa J. The biomedical potential of genetically modified flax seeds overexpressing the glucosyltransferase gene. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:251.
41. Pimentel EF, de Oliveira BG, Pereira ACH i sur. Polyphenols, antioxidants, and wound healing of *Lecythis pisonis* seed coats. *Planta Med*. 2024;90:243-51.
42. Pereira LOM, Vilegas W, Tangerina MMP i sur. *Lafoensia pacari* A. St.-Hil.: wound healing activity and mechanism of action of standardized hydroethanolic leaves extract. *J Ethnopharmacol*. 2018;219:337-50.
43. Sutthammikorn N, Supajatura V, Yue H i sur. Topical *Gynura procumbens* as a novel therapeutic improves wound healing in diabetic mice. *Plants Basel Switz*. 2021;10:1122.
44. Dalla Costa V, Piovan A, Filippini R, Brun P. From ethnobotany to biotechnology: wound healing and anti-inflammatory properties of *Sedum telephium* L. *in vitro* cultures. *Mol Basel Switz*. 2024;29:2472.
45. Akbari F, Azadbakht M, Bagheri A, Vahedi L. In silico, in vitro, and in vivo wound healing activity of *Astragalus microcephalus* Willd. *Adv Pharmacol Pharm Sci*. 2022;2022:2156629.
46. Clericuzio M, Tinello S, Burlando B i sur. Flavonoid oligoglycosides from *Ophioglossum vulgatum* L. having wound healing properties. *Planta Med*. 2012;78:1639-44.

47. Lee JH, Lee B, Jeon YD i sur. Inhibitory effect of *Elaeagnus umbellata* fractions on melanogenesis in α -MSH-stimulated B16-F10 melanoma cells. Mol Basel Switz. 2021;26:1308.
48. Paudel SB, Park J, Kim NH i sur. Constituents of the leaves and twigs of *Elaeagnus umbellata* and their proliferative effects on human keratinocyte HaCaT cells. Fitoterapia. 2019;139:104374.
49. Yarmolinsky L, Budovsky A, Khalfin B, Yarmolinsky L, Ben-Shabat S. Medicinal properties of *Anchusa strigosa* and its active compounds. Molecules. 2022;27:8239.
50. Dorđevski N, Uba AI, Zengin G i sur. Chemical and biological investigations of *Allium scorodoprasum* L. flower extracts. Pharm Basel Switz. 2022;16:21.
51. Karakaya S, Süntar I, Yakinci OF i sur. *In vivo* bioactivity assessment on *Epilobium* species: a particular focus on *Epilobium angustifolium* and its components on enzymes connected with the healing process. J Ethnopharmacol. 2020;262:113207.
52. Mainka M, Czerwińska ME, Osińska E, Ziaja M, Bazyłko A. Screening of antioxidative properties and inhibition of inflammation-linked enzymes by aqueous and ethanolic extracts of plants traditionally used in wound healing in Poland. Antioxid Basel Switz. 2021;10:698.
53. Özay Y, Güzel S, Yumrutaş Ö i sur. Wound healing effect of kaempferol in diabetic and nondiabetic rats. J Surg Res. 2019;233:284-96.
54. Wang J, Wang Y, Huang R i sur. Uncovering the pharmacological mechanisms of Zizhu ointment against diabetic ulcer by integrating network analysis and experimental evaluation *in vivo* and *in vitro*. Front Pharmacol. 2022;13:1027677.
55. Algandaby MM, Esmat A, Nasrullah MZ i sur. LC-MS based metabolic profiling and wound healing activity of a chitosan nanoparticle-loaded formula of *Teucrium polium* in diabetic rats. Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother. 2023;168:115626.

56. Selvaraj S, Inbasekar C, Pandurangan S, Nishter NF. Collagen-coated silk fibroin nanofibers with antioxidants for enhanced wound healing. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2023;34:35-52.
57. Nitthikan N, Preedalikit W, Supadej K, Chaichit S, Leelapornpisid P, Kiattisin K. Exploring the wound healing potential of a *Cuscuta chinensis* extract-loaded nanoemulsion-based gel. *Pharmaceutics.* 2024;16:573.
58. de Albuquerque RDDG, Perini JA, Machado DE i sur. Wound healing activity and chemical standardization of *Eugenia pruniiformis* Cambess. *Pharmacogn Mag.* 2016;12:288-94.
59. Saleem U, Khalid S, Zaib S i sur. Phytochemical analysis and wound healing studies on ethnomedicinally important plant *Malva neglecta* Wallr. *J Ethnopharmacol.* 2020;249:112401.
60. Fujishima MAT, Sá DMC, Lima CM de S i sur. Chemical profiling of *Curatella americana* Linn leaves by UPLC-HRMS and its wound healing activity in mice. *PloS One.* 2020;15:e0225514.
61. Luo P, Li X, Ye Y, Shu X, Gong J, Wang J. *Castanea mollissima* shell prevents an over expression of inflammatory response and accelerates the dermal wound healing. *J Ethnopharmacol.* 2018;220:9-15.
62. Subramanian S, Duraipandian C, Alsayari A i sur. Wound healing properties of a new formulated flavonoid-rich fraction from *Dodonaea viscosa* Jacq. leaves extract. *Front Pharmacol.* 2023;14:1096905.
63. Amrati FEZ, Chebaibi M, Galvão de Azevedo R i sur. Phenolic composition, wound healing, antinociceptive, and anticancer effects of *Caralluma europaea* extracts. *Mol Basel Switz.* 2023;28:1780.

64. Ezzat SM, Choucry MA, Kandil ZA. Antibacterial, antioxidant, and topical anti-inflammatory activities of *Bergia ammannioides*: a wound-healing plant. Pharm Biol. 2016;54:215-24.
65. Dedar RK, Kumar N, Narnaware SD, Tripathi BN. Leaf extract of *Aerva javanica* suppresses excessive growth of granulation tissue in horses. J Equine Vet Sci. 2020;93:103193.
66. Dogan Z, Telli G, Tel BC, Saracoglu I. *Scutellaria brevibracteata* Stapf and active principles with anti-inflammatory effects through regulation of NF- κ B/COX-2/iNOS pathways. Fitoterapia. 2022;158:105159.
67. Al-Madhagy SA, Mostafa NM, Youssef FS i sur. Metabolic profiling of a polyphenolic-rich fraction of *Coccinia grandis* leaves using LC-ESI-MS/MS and *in vivo* validation of its antimicrobial and wound healing activities. Food Funct. 2019;10:6267-75.
68. Liu T, Lu Y, Zhan R, Qian W, Luo G. Nanomaterials and nanomaterials-based drug delivery to promote cutaneous wound healing. Adv Drug Deliv Rev. 2023;193:114670.
69. Hassanshahi A, Moradzad M, Ghalamkari S, Fadaei M, Cowin AJ, Hassanshahi M. Macrophage-mediated inflammation in skin wound healing. Cells. 2022;11:2953.
70. Li Y, Yao J, Han C i sur. Quercetin, inflammation and immunity. Nutrients. 2016;8:167.
71. Devi KP, Malar DS, Nabavi SF i sur. Kaempferol and inflammation: from chemistry to medicine. Pharmacol Res. 2015;99:1-10.
72. Lee JH, Kim GH. Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. J Food Sci. 2010;75:H212-217.
73. Lim H, Kim HP. Inhibition of mammalian collagenase, matrix metalloproteinase-1, by naturally-occurring flavonoids. Planta Med. 2007;73:1267-74.
74. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents. 2005;26:343-56.

75. Pedro AC, Paniz OG, Fernandes I de AA i sur. The importance of antioxidant biomaterials in human health and technological innovation: a review. *Antioxid Basel Switz.* 2022;11:1644.
76. Chanu NR, Gogoi P, Barbhuiya PA i sur. Natural flavonoids as potential therapeutics in the management of diabetic wound: a review. *Curr Top Med Chem.* 2023;23:690-710.
77. Obagi Z, Damiani G, Grada A, Falanga V. Principles of wound dressings: a review. *Surg Technol Int.* 2019;35:50-7.
78. Spoială A, Ilie CI, Fikai D, Fikai A, Andronescu E. Synergic effect of honey with other natural agents in developing efficient wound dressings. *Antioxid Basel Switz.* 2022;12:34.