

'n Lokaal-aangewende blaarekstrak van *Terminalia sericea* (Combretaceae) en terminoïese suur wat op geïnfekteerde wonde aangebring is, lei tot beter wondgenesing as gentamisien in 'n dieremodel

Author:

Dr Johann Kruger¹
Prof David Katerere²
Prof Jacobus Nicolaas Eloff³

Affiliations:

¹ Owner of a series of Pharmacies in Pretoria
johann@edna.co.za
082 357 1351

² Tshwane University of Technology

David.Katerere@tut.ac.za
084 633 0215

³ Universiteit van Pretoria
kobus.eloff@up.ac.za
083 627 0098

Corresponding author:

Prof Jacobus Nicolaas Eloff
kobus.eloff@up.ac.za
083 627 0098

Dates:

Received: 27/10/2017
Accepted: 01/10/2018
Published: 05/11/2018

How to cite this article:

Dr Johann Kruger, Prof David Katerere en Prof Jacobus Nicolaas Eloff, 'n Lokaal-aangewende blaarekstrak van *Terminalia sericea* (Combretaceae) en terminoïese suur wat op geïnfekteerde wonde aangebring is, lei tot beter wondgenesing as gentamisien in 'n dieremodel, *Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Natuurwetenskap en Tegnologie* 37(1) (2018)

An English copy of this paper is available online at <http://www.satnt.ac.za/index.php/satnt/article/view/666>

Copyright:

© 2018. Authors.
Licensee: *Die Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns*. This work is licensed under the Creative Commons Attribution License.

Plante is bekende bronne van verbindings met 'n biologiese aktiwiteit en is gevolglik al vir eeue deur die mens as medisyne gebruik. *Terminalia sericea* kom wydverspreid voor in Suider Afrika, veral in sanderige grond. Dit is tradisioneel gebruik om absesse en wonde mee te behandel.

Hierdie studie ondersoek die antibakteriële eienskappe en wondgenesingsvermoë van 'n blaarekstrak van *Terminalia sericea* en terminoïese suur wat as 'n antibakteriese verbinding uit 'n blaarekstrak geïsoleer is. Dele van die rûe van 10 Wistar rotte is kaal geskeer en snitte is gemaak op 4 verskillende plekke. Die wonde is met *Staphylococcus aureus* geïnfekteer. Die wonde is na 48 uur met die ekstrak, die geïsoleerde verbinding (terminoïese suur), 'n positiewe kontrole (gentamisien) en 'n negatiewe kontrole (geen behandeling) behandel nadat die wonde oppervlakkig besmet is. Die wonde is daarna daaglik ondersoek vir eksudaatvorming, eriteem en die wondgrootte vir 5 dae lank. Eriteem is gekies as aanwyser omdat daar met 'n wond of met irritasie 'n oppervlakkige rooi verkleuring van die vel ontstaan as gevolg van die verwyding van kapillêre vaatjies. Eksudaatvorming is as die ander aanwyser gebruik omdat wonde 'n vloeistof wat ryk aan proteïene en witbloedselle uitskei wat, indien dit aan lug blootgestel word, 'n kors vorm.

Die blaarekstrak en terminoïese suur ekstrak het 'n groter positiewe effek op die eksudaatvorming, eriteem sowel as die wondgrootte gehad as gentamisien en die negatiewe kontrole. Alle behandelings het 'n effek op wondgrootte gehad oor die 5 dae periode. Die effek van die behandeling mag toegeskryf word aan die modulering van wondgenesing deur weë anders as, of aanvullend tot die antibakteriële aktiwiteit van die plantbestanddele. Die studie bewys dat die blaarekstrakte die potensiaal het om farmaseuties geformuleer te word tot 'n plaaslike aanwending vir moontlike wondgenesing.

Topically applied *Terminalia sericea* (Combretaceae) leaf extract and terminoic acid on infected wounds lead to better wound healing outcomes than gentamicin in an animal model: Plants are well-known sources of compounds with biological activity and thus have been used by mankind for centuries as medicines. *Terminalia sericea* occurs widely in southern Africa in sandy soils. It has been used traditionally to treat abscesses and wounds.

This study investigated the antibacterial properties and wound healing activity of an acetone leaf extract of *Terminalia sericea* and terminoic acid, an isolated compound. The backs of 10 Wistar rats were shaved and incisions made in four different areas to which the two treatments, a positive control (gentamicin) and no treatment, were applied 48 hours after the wounds were superficially infected with *Staphylococcus aureus*. The wounds were monitored for exudate formation, erythema and size, daily for five days. The leaf extract and terminoic acid treatment had positive effects on the exudate production and erythema, superior to gentamicin treatment and the negative control over the treatment period. All treatments had an effect on the size of the wounds after five days. The effects of the treatment may be attributed to the modulation of wound healing by pathways other than, or in addition to, antibacterial action of phytochemical constituents. This study shows that the extracts have the potential for pharmaceutical development into topical formulations for possible use in wound treatment.

Inleiding

Die verskyning van antimikrobiese weerstand (AMW) word erken as 'n openbare gesondheidsrisiko deur die Verenigde Nasies se Interagentskaps-koördinerings groep vir antimikrobiese middels. In die orde van 25,000 mense sterf jaarliks weens een of ander vorm van antibiotika weerstandigheid (Control and Agency, 2009), terwyl in die Verenigde State 90,000 infeksies deur metisillien weerstandige *Staphylococcus aureus* (MRSA) aangeteken word met 21% van die pasiënte wat jaarliks hierdeur sterf (Carlet, Jarlier et al. 2012).

Antimikrobiese weerstandigheid ontstaan as gevolg van verkeerde voorskryf en gebruik van antibiotika (Weber 2005), en die gebruik van antimikrobiese middels om voedingseffektiwiteit in diere te verbeter of in stand te hou (McEwen en Fedorka-Cray 2002, Durso en Cook 2014). Die gebrek aan belegging in die antibiotika-ontdekkings-pyplyn speel dalk ook 'n rol hier (Spellberg, Powers et al. 2004).

Daar is dus 'n behoefte aan nuwe antimikrobiese middels. Bakteriële infeksies ontstaan wanneer 'n wond geïnfekteer word. Wonde is 'n ontwrigting van die normale velanatomie en-funksie en mag ontstaan as gevolg van fisiese, chemiese, termiese, mikrobiese of immunologiese toestande (Strodtbeck 2001).

Chroniese wonde is wêreldwyd 'n groeiende las op gesondheidsorgstelsels (veral as gevolg van die verhoogde voorkoms van diabetes, obesiteit en kanker) en put gesondheidsorgbegrotings uit (Harding, et al. 2002). Kroniese wonde wat nie gesond word sonder gespesialiseerde behandelings nie, affekteer mense wat alreeds siek is. In die 1990's is daar in die Verenigde Koninkryk ongeveer 24 000 mense in hospitale opgeneem weens diabetiese voetsere teen 'n koste van £17m (Harding, Morris et al. 2002). In die VSA lei 6.5 miljoen mense aan chroniese wonde en die chroniese wondsondorgemark word geraam op US\$15.3 biljoen in 2010 (Sen, Gordillo et al. 2009). Wonde is 'n groot oorsaak van 'n verhoging in morbiditeit en mortaliteit.

Wondgenesing is 'n komplekse proses wat deur verskeie faktore beïnvloed word, insluitende bakteriese kolonisasie en infeksies wat geneig is om die helingsproses te vertraag (Edwards en Harding 2004).

Die genus *Terminalia* beslaan wêreldwyd uit omtrent 250 spesies waarvan 11 in Suider-Afrika voorkom (Carr 1988). *T. sericea* Burc. Ex DC is dominant in Suider-Afrika. Bekend as die Vaalboom, (Afrikaans), Silver cluster-leaf, (Engels) en Mokono (Shona), word dit gebruik as tradisionele medisyne vir die behandeling van verskillende toestande, insluitende absesse en wonde, abdominale pyn, intestinale wurms, diarree, seer keel en verwyding van die geboorte kanaal (Arnold and Gulumian 1984, Tshikalange, Meyer

et al. 2005). In hierdie studie word die ekstrak sowel as terminoïese suur wat uit *T. sericea* geïsoleer is, aan wonde gesmeer wat vooraf geïnfekteer is met *Staphylococcus aureus*. *Terminalia sericea* is gekies omdat die antibakteriese aktiwiteit van die aseton blaarekstrakte beter was as die van *T. phanerophlebia*, *T. gazensis*, *T. sambesiaca*, *T. mollis* en *T. brachystema* (Kruger, 2004).

Materiaal en metodes

Etiese goedkeuring is deur die Navorsing en Diergebruik en Omgeekomitee by die Onderstepoort Veeartsenykundigenstituut (OVI) gegee. Die studie is ontwerp as 'n volledige eksperimentele ontwerp met self-kontrole. Hierdie eksperiment is in 2004 uitgevoer (Kruger, 2004) en dieselfde metode met sekere verbeterings is gebruik deur Masoko et al (2010) op fungus wond infeksies. Die rede vir die vertraging in publikasie was omdat een van ons (JPK) 'n formulering ontwikkel het uit die kru-blaarekstrak en dit suksesvol gepatenteer, geregistreer en as 'n produk (Phytobiotic) bemark het.

Elf *Rattus norvegicus* Wistar rotte is deur die Departement Toksikologie van die Onderstepoort Veeartsenykundige Instituut van die Landbou Navorsings Raad (LNR) aangehou. Die hare op 'n area van die rûe van elke rot is verwyder deur dit eers met 'n skêr te knip en daarna met 'n chirurgiese lemmetjie te skeer. Die area is met 70% alkohol gesteriliseer en tyd is toegelaat vir die alkohol om te verdamp. Die rotte is gesedeer met 'n binnespiëse inspuiting van 'n bensodiasepien en 15 minute is toegelaat vir die middel om ten volle aktief te wees.

Wonde is veroorsaak deur vier min-of-meer ronde areas met 'n skêr toe te dien en die toetsorganisme (*Staphylococcus aureus*, ATCC 29213) is op die wonde geplaas (genoeg om die wond ten volle te bedek).

Die area is daarna bedek met wonddekking (Transpore[®]) en gelaat om vir 48 uur te inkubeer waarna die kru-ekstrak en terminoïese suur en die positiewe kontrole (gentamisien) aangewend is en die negatiewe kontrole net so gelaat is. Elke proefdier het aldus as hulle eie kontrole gedien. (Figuur 1).

Die behandelings was 'n aseton ekstrak van *T. sericea* blare wat in 'n 20% (w/w) room geformuleer is met gemulsifiseerde room (BP) (TA) en geïsoleerde terminoïese suur, die suiwer ekstrak (Figuur 2) wat uit die blare van *T. sericea* uit 'n vroeëre studie (Kruger, 2004) geëkstraheer is en toe geformuleer is in 'n 1% (w/w) room met gemulsifiseerde room (BP) en word hierna as TSE aangedui. 'n 1% Gentamisien room (Garamycin[®]) is gebruik as die positiewe kontrole. Die negatiewe kontrole was deur bloot die wond onbehandeld te laat. Elke dier is daagliks opnuut behandel nadat die verskillende evaluasies gedoen is en die wonde is dan weer bedek.

Die effekte van die behandelings is daagliks bepaal deur die vermindering in eriteem (rooi verkleuring van die wond-area), eksudaatvorming (wondetter) en die fisiese grootte van die wond oor 'n 5 dag periode aan te teken. Vir die



FIGUUR 1: Die rot soos geïdentifiseer en behandel gedurende die eksperiment.

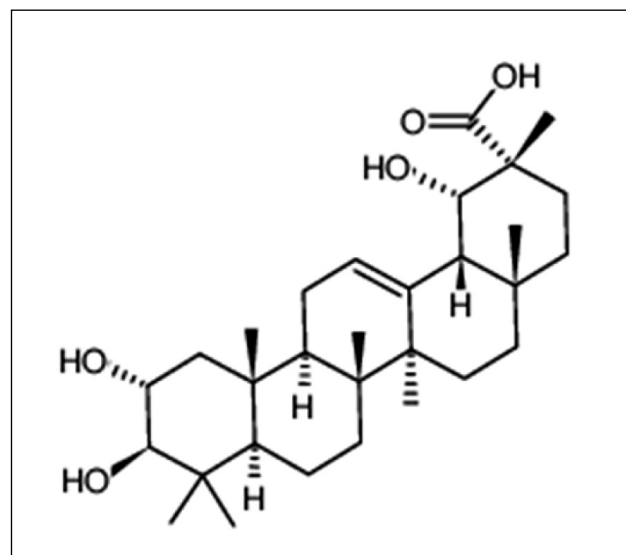
eritrem en eksudaat bepaling is 'n arbitrêre skaal van 0 tot 5 gebruik, met 0 die laagste graad van eriteem of eksudaat en 5 die hoogste graad van eriteem of eksudaat. Dit is as bepalende faktore beskou omdat 'n geïnfekteerde wond tot eriteem en eksudaatvorming sal lei. Aan die einde van die eksperiment is genadedood op die diere toegepas ten einde 'n volledige toksikologiese eksaminering te kon doen.

Resultate en bespreking

Die kunsmatige kolonisering van die wonde met *S. aureus* was geag te wees om tot 'n infeksie na 48 uur te lei. Geïnfekteerde wonde vertoon klassieke tekens wat 'n vergrote pynsensasie in die ulkus area insluit, sowel as eriteem, edeem, eksudaatvorming (beide purulente en sereuse) en 'n verlangsaamde genesing, onder andere (Cutting 2004). In hierdie studie het ons na eksudaatvorming, eriteem en wondgrootte gekyk as aanwysers vir behandelingsdoeltreffendheid.

Die TSE en TA behandelings het tot soortgelyke sterk afname oor die behandelingsperiode in eksudaatvorming gelei (Tabel 1, Fig. 1).

Hierdie behandelings was meer effektief as beide die positiewe en negatiewe kontroles. Op dag 5 van die behandeling het die kru-ekstrak en die terminoiese suur onderskeidelik waardes van (TSE) 0.18 en die TA (0.36) vergeleke met 0.91 vir gentamisien en 1.00 vir die negatiewe kontrole getoon.



FIGUUR 2: Chemiese struktuur van terminoiese suur.

TABEL 1: Invloed van behandelings op die eksudaatvorming (Gemiddelde van 10 waardes)

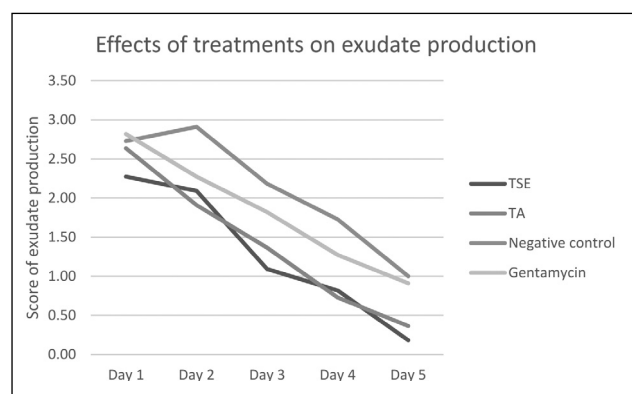
	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 5
Blaar ekstrak 20%	2,27	2,09	1,09	0,82	0,18
1% terminoiese suur	2,64	1,91	1,36	0,73	0,36
Negatiewe kontrole	2,73	2,91	2,18	1,73	1,00
1% gentamisien	2,82	2,27	1,82	1,27	0,91

TABEL 2: Effekte van behandeling op eritrem

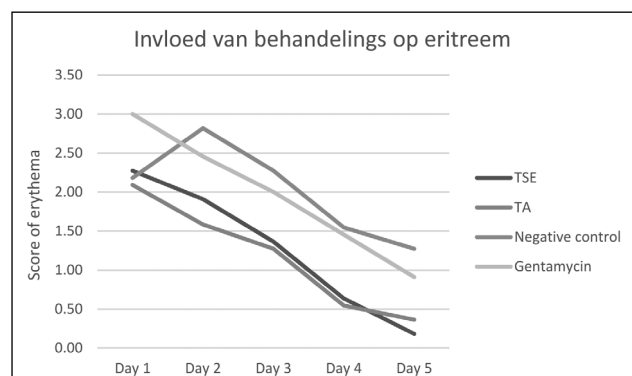
	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 5
Leaf extract 20%	2,27	1,91	1,36	0,64	0,18
Terminoic acid 1%	2,09	1,58	1,27	0,55	0,36
Negative control	2,18	2,82	2,27	1,55	1,27
Gentamicin 1%	3,00	2,45	2,00	1,45	0,91

Die eksudaatproduksie het ook met die negatiewe kontrole oor die tydperk verminder. (1.00 op Dag 5) en was slegs effens hoër (0.91) as die gentamisienbehandeling. Die vermindering met die “geen behandeling” dui heelwaarskynlik op die inherente vermoë van die rot se immuunstelsel om infeksies te beveg. Eksudaatvorming is ‘n belangrike proses om ‘n vogtige omgewing te skep vir wondgenesing. Oormatige eksudaatvorming kan egter die genesingsproses vertraag wat die lewenskwaliteit van pasiënte negatief kan beïnvloed (Dowsett 2011).

Die kru-ekstrak en die terminoïese suur het dieselfde effek gehad en het albei beter as die positiewe- en negatiewe kontrole vertoon (Tabel 2). Daar moet egter op gelet word dat, anders as met die eksudaat, die gentamisien behandelde wonde hoër eritremtellings gehad het op dag 1(3) wat verminder het na 1 op dag 5, terwyl al die ander wonde met ‘n gemiddelde telling van 2.1 begin het. Op dag 5 was die TSE waarde 0.18 vergeleke met 0.36 vir die TA. Die verhoging in eritrem op dag 2 mag die gevolg wees van inflammasie as gevolg van die infeksie.



FIGUUR 3: Invloed van behandelings op eksudaat produksie (TSE = *T. sericea* asetoon blaarekstrak (20% massa basis), TA = terminoïese suur (1% massa basis), gentamisien (1% massabasis), Negatiewe kontrole – geen behandeling).



FIGUUR 4: Effekte van behandeling op eritrem

TABEL 3: Effekte behandeling van wondgrootte

	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 5
Leaf extract 20%	3,36	4,09	3,00	2,82	2,50
Terminoic acid 1%	3,73	3,55	2,82	2,27	2,45
Negative control	4,18	4,36	3,55	2,73	2,64
Gentamicin 1%	4,36	3,91	3,45	3,18	2,82

Daar was geen noemenswaardige verskille in die wondgrootte teen dag 5 tussen die verskillende behandelings en die kontrole nie (Tabel 3). Die terminoïese suur-behandeling (geïsoleerde ekstrak) het egter tot beter wondverkleining gelei van dag 1 tot dag 4.

Die wondverkleining was vir alle praktiese doeleindes dieselfde in die negatiewe, die positiewe kontrole en die twee behandelings. Dit mag wees as gevolg van die hoë immuniteit van die rotte wat relatief gesond was. In opvolgende eksperimente deur Masoko et al (2010) in dieselfde laboratorium, is rotte met ‘n immuunonderdrukker behandel om ‘n immuunonderdrukte pasiënt met wonde na te boots. ‘n Nadoodse ondersoek van die rotte het geen onderhuidse letsels of absesse in die areas waar behandeling toegepas is, aangetoon nie. Dit dui daarop dat die behandelings nie sistemies toksies was nie.

Wondgenesing is ‘n komplekse fisiologiese proses met die interaksies van dermale en epidermale selle, die ekstraselulêre matriks, angiogene en plasma-verworwe proteïene wat gemoduleer word, verskeie sitokiniene en groeifaktore betrek (Harding, Morris et al. 2002). Die proses behels oorspronklike fases, naamlik. inflammasie, angiogenese, kollageen neerlegging, her-epitelisering en weefselopbouing (Martin 1997).

In hierdie studie het beide die geïsoleerde bestanddeel sowel as die kru-ekstrak beter aktiwiteit vertoon as die gentamisienroom positiewe kontrole. Die geïsoleerde bestanddeel en die asetoon kru-ekstrak mag dalk meer as een meganisme van aktiwiteit hê gedurende die wondgenesingsproses. Dit mag byvoorbeeld benewens antimikrobiële aktiwiteit, anti-inflammatoriese aktiwiteit gehad het of sel-proliferasie of angiogenese geïnduseer het. Die spesifieke meganismes van aktiwiteit tesame met die moontlike anti-inflammatoriese eienskappe behoort in die toekoms ondersoek te word.

Terminalia sericea is ryk aan polifenoliese bestanddele en tanniene, maar hierdie bestanddele is dalk nie deur asetoon ge-ekstraheer nie. Polifenoliese verbindings fasiliteer wondgenesing deur die modulering van induseerbare endoteliële groeifaktore (IEGF) wat tot wondangiogenese kan lei. (Sen, Khanna et al. 2002) het bevind dat tanniene wat uit ‘n verwante spesie, *T. chebula* geëkstraheer is, antibakteriese aktiwiteit gehad het teen *Klebsiella pneumonia* en *Staphylococcus aureus* en ‘n sterk angiogeniese effek gehad het wat uiteindelik uitgeloop het op wondverkleining by die granulasievorming sowel as letsel herstel fases (Li, Diao et al. 2011).

Omdat die terminoïese suur sowel as die kru-ekstrak aktief was, dui dit aan dat dit nie noodwendig tanniene of polifenole is wat verantwoordelik is vir die wondgenesing nie. Terminoïese suur is ‘n oleaniese triterpenoïed en die verwante verbinding, lupeol, veroorsaak ‘n versnelde epitelisasie met ‘n gepaardgaande versnelde tempo van wondkontraksie en kollageenvorming (Harish, Krishna

et al. 2008) Triterpenoïede van *Calendula officinalis* stimuleer die proliferasie en migrasie van fibroblaste teen lae konsentrasies wat aandui dat triterpenoïede hulle wondgenesingseffekte op 'n ander wyse as polifenoliese verbindings uitoefen (Fronza, Heinzmann et al. 2009).

'n Aantal probleme is geïdentifiseer in hierdie eksperiment wat verbeter is in navorsing wat daarna gedoen is op verskeie ekstrakte op rotte in ons laboratorium (Masoko et al., 2010). Dit sluit in om die rotte se immuniteit te onderdruk deur subkutane inspuiting met 500 mikrogram estradiolvaleraat, aanvanklik deur 0.5% chloorheksidien te gebruik om die veloppervlak te steriliseer, die diere in 'n bio-veiligheidskabinet te hanteer, die diere se temperatuur te monitor, korsvorming te meet, die diere drie keer per week te behandel, die eksperiment na 17 dae te verleng, die massa van die diere te bepaal gedurende die eksperiment, 'n meer volledige patologiese ondersoek teen die einde te doen en die *in vitro* sellulêre toksisiteit van die ekstrakte en die geskeide verbindings te toets. Masoko et al. (2010) het ook bevind dat daar geen verskille in die wondgenesing aan die einde van die eksperiment was nie, alhoewel daar verskille in die tempo van wondgenesing was.

Dit wil voorkom asof die hoof funksie van die kru-ekstrak soortgelyk was aan die geïsoleerde terminoïese suur. Die resultate wat verkry is met eksudaatvorming en veral eriteem was beter as met die positiewe kontrole met Gentamisien.

Samevatting

Alhoewel tradisionele genesers nie asetoon as ekstraksiemiddel beskikbaar het nie en water nie die antimikrobiële verbindings in *Combretum microphyllum* blare (Kotze en Eloff, 2004), ekstraheer nie, bevestig die resultate die gebruik van *T. sericea* in die behandeling van wonde.

Omdat *T. sericea* wyd voorkom in Suidelike Afrika se sanderige grond en omdat slegs die blare as plant materiaal gebruik word, behoort die kommersialisering hiervan vir die farmaseutiese industrie haalbaar te kan wees. Asetoon is boonop 'n lae koste ekstraksiemiddel – dus behoort die potensiaal om 'n kommersiële produk hieruit te ontwikkel groot te wees.

Toekomstige werk behoort die anti-biofilm aktiwiteit van die ekstrakte te ondersoek aangesien bakterieë in kroniese wonde in 'n biofilm lewe wat die ontwikkeling van weerstandigheid aanhelp (Edwards and Harding, 2004).

Erkennings

Befondsing is voorsien deur die Nasionale Navorsings Stigting aan JNE. Dr JPJ Joubert van die Onderstepoort Veeartsenykundige Instituut waar die studie gedoen is, het advies verskaf oor die eksperimente en die toksikologie van die middels en het die kwantifisering van die verskillende behandelings behartig.

Skrywers se bydrae

JPK het die eksperimente behartig, DRK het ge-adviseer oor die fitochemiese ekstraksie en was mede-toesighouers van JPK. JNE het die projek gekonseptualiseer en was die projekteier. Al die outeurs was mede-verantwoordelik vir die skryf van die artikel.

Verwysings

- World Health Organization: Department of Communicable Disease Surveillance and Response: WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. WHO/CDS/DRS/2001_1.2. [http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/en/EGlobal_Strat.pdf].
- Arnold, H.-J. and M. Gulumian (1984). "Pharmacopoeia of traditional medicine in Venda." *Journal of Ethnopharmacology* 12(1): 35-74.
- Carlet, J., V. Jarlier, S. Harbarth, A. Voss, H. Goossens and D. Pittet (2012). "Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action." *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 1(1): 11.
- Carlet, J. and J. L. Mainardi (2012). Antibacterial agents: back to the future. Can we live with only colistin, co-trimoxazole, and fosfomycin. *Clin Microbiol Infect.*
- Carr, J. D. (1988). *Combretaceae in Southern Africa*. Johannesburg, Tree Society of Southern Africa,
- Control, E. C. f. D. P. a. and E. M. Agency (2009). The bacterial challenge: time to react.
- Cutting, K. F. (2004). "Defined and refined: criteria for identifying wound infection revisited." *WoundCare*.
- Dowsett, C. (2011). "Moisture in wound healing: exudate management." *British Journal of Community Nursing*.
- Durso, L. M. and K. L. Cook (2014). "Impacts of antibiotic use in agriculture: what are the benefits and risks?" *Current opinion in microbiology* 19: 37-44.
- Edwards, R. and K. G. Harding (2004). "Bacteria and wound healing." *Current Opinion in Infectious Diseases* 17(2): 91-96.
- Fronza, M., B. Heinzmann, M. Hamburger, S. Laufer and I. Merfort (2009). "Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts." *Journal of Ethnopharmacology* 126(3): 463-467.
- Harding, K. G., H. L. Morris and G. K. Patel (2002). "Healing chronic wounds." *BMJ : British Medical Journal* 324(7330): 160-163.
- Harish, B. G., V. Krishna, H. S. Santosh Kumar, B. M. Khadeer Ahamed, R. Sharath and H. M. Kumara Swamy (2008). "Wound healing activity and docking of glycogen-synthase-kinase-3- β -protein with isolated triterpenoid lupeol in rats." *Phytomedicine* 15(9): 763-767.
- Li, K., Y. Diao, H. Zhang, S. Wang, Z. Zhang, B. Yu, S. Huang and H. Yang (2011). "Tannin extracts from immature fruits of Terminalia chebula Fructus Retz. promote cutaneous wound healing in rats." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11(1): 86.
- Martin, P. (1997). "Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration." *Science* 276(5309): 75-81.
- McEwen, S. A. and P. J. Fedorka-Cray (2002). "Antimicrobial Use and Resistance in Animals." *Clinical Infectious Diseases* 34(Supplement_3): S93-S106.
- Sen, C., S. Khanna, G. Gordillo, D. Bagchi, M. Bagchi and S. Roy (2002). "Oxygen, Oxidants, and Antioxidants in Wound Healing. An Emerging Paradigm." *Annals of New York Academy of Science* 957: 239-249.
- Sen, C. K., G. M. Gordillo, S. Roy, R. Kirsner, L. Lambert, T. K. Hunt, F. Gottrup, G. C. Gurtner and M. T. Longaker (2009). "Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy." *Wound Repair and Regeneration* 17(6): 763-771.
- Spellberg, B., J. H. Powers, E. P. Brass, L. G. Miller and J. J. E. Edwards (2004). "Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the Future." *Clinical Infectious Diseases* 38(9): 1279-1286.
- Strodtbeck, F. (2001). "Physiology of wound healing." *Newborn and Infant Nursing Reviews* 1(1): 43-52.
- Tshikalange, T. E., J. J. M. Meyer and A. A. Hussein (2005). "Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases." *Journal of Ethnopharmacology* 96(3): 515-519.
- Weber, J. (2005). "Appropriate use of antimicrobial drugs: A better prescription is needed." *JAMA* 294(18): 2354-2356.