مجله دیابت و لیپید ایران. مهر- آبان ۱۳۹۰؛ دوره ۱۱ (شماره ۱) ۵۳-۴۰

بررسی نقش ۳-۳-۱۴، ماتریکس متالوپروتئینازها و مهارکننده‌های آنها در پاتوژنز زخم پای دیابتی

سیدعلیرضا مهاجرانی[۱]، باقر لاریجانی[۱*]

چکیده

هیپرگلیسمی که عارضه اصلی بیماری دیبات می باشد با تأثیر بر بسیاری از فرآیندهای درون و برون سلولی منجر به ایجاد عوارض اغلب بازگشت ناپذیر دیابت می‌شود که منجر به اختلال عملکردهای ارگان‌های مختلف از جمله قلبی و عروقی، کلیوی، عصبی و جلدی می‌شود. یکی از شایع‌ترین و دردسرسازترین عوارض دیابت زخم پای دیابتی است که به علت ترمیم مختل و عفونت عوارض زیادی برای بیماران ایجاد می‌کند. در این مقاله ضمن توضیح در مورد ساختار و چگونگی عملکرد مهمترین آنزیم‌های دخیل در ماتریکس بین سلولی یعنی MMP ها و نیز آنزیم‌های تحریک و مهار کننده آنها، سعی شده تا با بررسی چگونگی انجام ترمیم زخم در شرایط طبیعی و نیز مقایسه آن با شرایط همراه با قند بالا، نحوه تأثیرگذاری این آنزیم‌ها و نقش آنها در پاتوژنز دیابت را مورد بررسی قرار دهیم.

واژگان کلیدی: زخم پای دیابتی، پاتوژنز دیابت، آنزیم‌های تحریک و مهار

۱- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* ***نشانی:*** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد پستی ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷ تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷ ، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲ ، پست الکترونیک: emrc@tums.ac.ir

تاریخ دریافت:۹۰/۰۴/۱۳ **تاریخ درخواست اصلاح: ۹۰/۰۵/۲۲** **تاریخ پذیرش: ۹۰/۰۵/۲۸**

مقدمه

دیابت که شامل گروهی از اختلالات متابولیک می‌باشد، با عارضه اصلی هیپرگلیسمی معرفی می‌شود [۱] که در نهایت می‌تواند باعث مشکلات وسیع از جمله اختلالات حسی، حرکتی، عصبی، عدم خون‌رسانی به ارگان‌های انتهایی مانند کلیه، چشم و اندام‌های انتهایی شود که درگیری هر کدام از این اعضا گاه منجر به از کار افتادن آنها می‌گردد [۲،۳].

شناخت عوامل مولکولی دخیل در ایجاد عوارض دیابت امکان این را فراهم می‌کند که درمان عوارض آن ریشه‌ای‌تر و کارآمدتر گردد. MMPs (Matrix metalloproteinase) و مهارکننده‌ها و محرک‌های آنها از جمله ۳-۳-۱۴ نقش اصلی را در تغییرات پاتولوژیک بافت‌ها در بسیاری از بیماری‌ها از جمله در دیابت بر عهده دارند [۴].

زخم پای دیابتی از شایع‌ترین عوارض بیماری دیابت بوده که به علت اختلالات متعددی که در عملکرد بیماران ایجاد می‌کند مطالعات بسیاری بر روی آن انجام شده است [۵]. شناخت اختلالات ماتریکس بین سلولی که منجر به بروز آن شده است راه را برای درمان و پیشگیری از گسترش زخم پای دیابتی هموار می‌کند.

۳-۳-۱۴

پروتیین‌های ۳-۳-۱۴ خانواده بزرگی از پروتیین‌ها را تشکیل می‌دهند که در تمامی یوکاریوت‌ها کشف شده است و نام آتیپیک آن به دلیل موقعیت آنها در ژل الکتروفورز و نیز شکست‌های بعد از DEAE سلولز کروماتوگرافی می‌باشد. این خانواده اخیراً توجه زیادی را به خود جلب کرده است زیرا در سازوکارهای حساس درون سلولی دخیلند و هر روز ابعاد تازه‌تری از نقش‌های مختلف این پروتیین‌ها شناخته می‌شود. یکی از علل این همه گوناگونی در تأثیرات درون و برون سلولی این خانواده کشف حدود ۲۰۰ مولکول باند شده با این پروتیین است که تفاوت نقش آفرینی را در آن موجب شده است به نحوی که ابعاد گوناگون کاربردی آن هنوز به طور دقیق و کامل شناخته نشده است [۶،۷].

۳-۳-۱۴ها پروتیین‌های اسیدی دایمریک با وزن تقریبی KD ۳۰ هستند که به نحو شگفت‌انگیزی در طول تاریخ ساختار خود را حفظ کرده‌اند. این پروتیین‌ها در سال ۱۹۶۷ در حین دسته‌بندی پروتیین‌های مغز یافت شدند و اعداد آن مربوط به موقعیت آنها در ژل الکتروفورز و نیز شکست‌های بعد از DEAE سلولز کروماتوگرافی می‌باشد [۸] عملکرد این پروتیین‌ها ۲۰ سال بعد شناخته شد. در آنجا که به عنوان فعال کننده آنزیم تیروزین و تریپتوفان هیدروکسیلاز شناخته شد [۹]. این خانواده در تمام جانداران از پستانداران تا مخمرهای ساکارومایسس سرویاسه وجود دارد [۱۰،۱۱] اما در هر کدام از این ارگانیسم‌ها ایزوفرم‌های مختلفی از آن دیده شده است. در پستانداران ۷ ایزوفرم ($\beta,\varepsilon,\eta,\zeta,\sigma,\tau,\gamma$) به همراه گونه‌های فسفریله شده آنها وجود دارد که در سلول‌های انسانی پروتیین‌های بسیاری کشف شده‌اند که قابلیت باند شدن به ۳-۳-۱۴را دارند [۱۲].

۳-۳-۱۴ها معمولا در اکثر مواقع به پروتیین‌هایی وصل می‌شوند که شکل فسفریله دارند و بدین وسیله در مکانیسم‌هایی همچون انتقال سیگنالها، کنترل سیکل سلولی، آپوپتوز، پاسخ به استرس و نیز تغییرات منجر به بدخیمی و شکل‌دهی اسکلت سلولی دخیل می‌شوند [۱۳]. در ابتدا این پروتیین‌ها به خاطر نقش آفرینی در انتقال سلولی و بعد به خاطر نقش فعال کننده برای تریپتوفان و تیروزین هیدروکسیلاز [۱۴] و نیز مهار کننده PKC (Protein kinase C) [۱۵] مورد بررسی قرار گرفتند. البته با آنکه ابتدا ۳-۳-۱۴در داخل سلول کشف شد اما در ادامه نشان داده شد که این پروتیین می‌تواند در CSF بیماران کروتسفلد ژاکوب [۱۶] در بیماری‌های ویروسی حاد مثل آنسفالیت [۱۷] به عنوان یک فاکتور تشخیصی و یک عامل شناسایی پاتوژنز در منتژیت [۱۸]، پاتوژنز بیماری‌های روانی [۱۹] و سرم و مایع سینوویال بیماران مبتلا به آرتریت [۲۰] وجود داشته باشد.

این مولکول در ترشحات خارج سلولی که توسط کراتینوسیت‌ها ترشح شده نیز قابل ردیابی است [۲۱]. نشان داده شده است که در پیری پوست مقادیر بالایی از این آنزیم در کراتینوسیت‌ها وجود دارد [۲۲]. اولین بار Leffers و Aitken فرم قابل ترشح ۳-۳-۱۴ از کراتینوسیت‌های پوست

را کشف کردند [۲۳،۲۴]. در همین ارتباط نتایج مطالعات بعدی نشان می‌دهد که ۳-۳-۱۴ مولکول واسط بین کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌های درم است و در نتیجه در فضای بین سلولی پیش قراول بسیاری از سازوکارهاست. از سوی دیگر در تنظیم مهاجرت کراتینوسیت‌ها در بازسازی و ترمیم آسیب نیز نقش تنظیم کننده دارد [۲۵،۲۶]. در کل نتایج مطالعات جدید نشان می‌دهد که ۳-۳-۱۴ بیشتر از کراتینوسیت‌های تمایز یافته ترشح شده و با interaction با فیبروبلاست‌ها اجزای ماتریکس بین سلولی را برای تغییر ساختارآماده می‌کنند [۲۷].

ماتریکس متالولوپروتئینازها و مهارکننده‌های آنها

یکی از مهمترین آنزیم‌هایی که تحت تأثیر ۳-۳-۱۴ هستند پروتئینازهای ماتریکس خارج سلولی می‌باشند که در بسیاری از روندهای سازنده ساختارهای بدن و شکل‌دهی آنها نقش اساسی دارند [۲۸،۲۹،۳۰]. ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) دسته‌ای از اندوپپتیدازها هستند که توانایی تجزیه تمام اجزای مختلف ماتریکس را دارند و برای فعالیت به صورت زایموژن یا پروآنزیم به محیط خارج ترشح می‌شوند. برای مثال MMP-1 (52KD) در اپیتلیالیزه شدن پوست مؤثر است، MMP-2(72KD) در تجدید ساختار ماتریکس و آنژیوژنز و MMP-3(54KD) به وسیله شبکه اکتین در بسته شدن زخم مؤثر است. این پروتئین‌ها از نظر ساختار در محل فعال خود واجد یک اتم Zn می‌باشند که برای فعالیت کاتالیتیک آنزیم ضروری است. این مولکول‌ها توسط مهارکننده اختصاصی خود Tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) مهار می‌شوند [۳۱،۳۲]. MMPs از سلول‌های زیادی ترشح می‌گردند: کراتینوسیت، فیبروبلاست، سلول‌های اندوتلیال، ماکروفاژها، نوتروفیل، ماست سل و ایوزینوفیل و در بسیاری از اتفاقات دخیلند مانند: embryonic development, morphogenesis, reproductive processes, bone remodeling, wound healing, cancer, atherosclerosis, arthritis و ... [۳۳،۳۵].

برخی از این MMPs که در روند ترمیم زخم بیشتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند در جدول ۱ نشان داده شده است. به دلیل فعالیت‌های فوق‌العاده گسترده‌ای که این پروتئینازها انجام می‌دهند ترشح آنها به شدت در بدن کنترل می‌شود. به نحوی که این مهار کننده‌ها در سرم تقریباً ۱۰ درصد کل پروتیین‌ها را تشکیل می‌دهند. اصلی‌ترین مهار کننده‌ها TIMPs و α_2 ماکروگلوبین‌ها هستند. معمولاً از TIMPs برای نشان دادن نقش MMPs در تومور و تهاجم آن به ماتریکس میان بافتی، آنژیوژنز، متاستاز و تخریب مفصل استفاده می‌شود اما نشان داده شده که TIMP 1&2 در رشد سلول و تولید RBC نیز نقش دارند و در واقع نقشی همانند فاکتور رشد از خود نشان می‌دهد [۳۷،۳۶].

در منطقه آسیب با تحریک IL-1، IL-6 و TNF-α بر روی ۳-۳-۱۴ ترجمه و تولید MMPs آغاز می‌شود. با بالا رفتن غلظت ۳-۳-۱۴تولید MMPs بالا رفته و کلاژن‌هایی که در جای مناسب نیستند تخریب می‌شوند. اما در برخی از بیماری‌ها عدم کنترل ۳-۳-۱۴منجر به تولید بیش از حد MMPs شده که تخریب بیش از حد کلاژن‌های ماتریکس، کلاژن‌های غشای سلولی، کلاژن‌های دناتوره شده و ژلاتین‌ها را در پی دارد و مانع بازسازی بافت می‌شود [۳۸].

بیشترین تحقیقات در مورد MMPs بر روی مسایل قلبی عروقی همچون دخالت در روند آترواسکلروز و آنژیوژن [۳۹]. سرطان‌ها در شروع کارسینوژنز و افزایش آنژیوژنز تومور و تخریب ساختمان بافت‌های اطراف [۴۰،۴۱] و در بیماری‌های مزمن ریوی در تخریب ECM انجام شده است. همچنین MMPs نقش مهمی را در بازسازی بافت همبند پوست ایفا می‌کند، چه در حالت نرمال و چه در گرفتاری‌های پاتولوژیک. در کنار اینها بر اثر تحریک GH، سیتوکین‌ها و رسپتورهای آنها، که همه با دخالت ۳-۳-۱۴انجام می‌شود، تکثیر سلولی، مهاجرت، آپوپتوز و واکنش‌های التهابی اتفاق می‌افتد. ماتریکس متالوپروتئینازها (از ۱ تا ۲۶) در بیماری‌های تاولیِ پوستی، پیری زودرس پوست بر اثر نور خورشید، زخم‌های مزمن، اختلالات گرانولوماتوز پوستی، فیبروز جلدی، پسوریازیس، تومورهای پوستی و تهاجم و متاستاز سلولی نقش اصلی را دارند [۴۲].

جدول ۱- برخی از MMPs که در ترمیم زخم بیشتر مورد مطالعه قرار گرفتند [۴۵-۴۳].

آنزیم	ماتریکس متالوپروتئیناز	سوبسترا	اثرات بیولوژیک
Insterstitial collagenase; Collagenase 1	MMP-1	Collagen I, II, II, VII, VIII, X, aggrecan, gelatin, pro-MMP-2, pro-MMP-9	Keratinocyte migration and reepithelialization, cell migration, Platelet aggregation, Pro-inflammatory
Collagenase 3	MMP-13	Collagen I, II, III, aggrecan, gelatin	Enhanced collagen affinity Generation of vasoconstrictor
Gelatinase A	MMP-2	Collagen I, II, III, IV, V, VII, X, XI, XIV, gelatin, elastin, fibronectin, aggrecan	Enhanced collagen affinity, cell migration, Increased bioavailability of IGF1 and cell proliferation
Gelatinase B	MMP-9	Collagen IV, V, VII, X, XIV, gelatin, pro-MMP-9, pro-MMP-13, elastin, aggrecan	Enhanced collagen affinity, Pro-inflammatory
Stromelysin 1	MMP-3	Collagen II, III, IV, IX, X, XI, elastin, pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13	cell migration, Epithelial-mesenchymal conversion, Mesenchymal cell differentiation, Enhanced collagen affinity

در برخی بیماری‌های جلدی، غلظت این آنزیم‌ها کمتر از سطح نرمال است. به عنوان مثال در اثر سوختگی فیبروسیت‌ها از خود واکنش التهابی بیش از اندازه‌ای نشان داده و با تولید بیش از حد کلاژن‌ها و عدم مهار از طریق MMPs منجر به ایجاد اسکار هیپرتروفیک در محل آسیب دیده شده که چه از نظر زیبایی و چه از نظر عملکردی عوارض زیادی را برای بیمار ایجاد می‌کند [۴۶]. در بیماران مبتلا به سیستمیک اسکلرودرمی که بافت‌های فیبروز نا بجا و ضخیم‌تر از حد معمول دارند غلظت MMP-1&13 به عنوان یک کلاژناز پایین‌تر از گروه کنترل بوده است. این امر نشان می‌دهد که با تحریک کمتر ترشح این آنزیم‌ها بیماری فوق در فرد مبتلا ایجاد شده است و رابطه معکوس بین غلظت MMPs و افزایش حجم بافت همبند وجود دارد [۴۷،۴۸]. در نتیجه شاید بتوان در آینده از آن به عنوان یک نشانگر برای شدت بیماری فوق استفاده کرد.

از سوی دیگر اختلال ارتباط سلول‌های اپیدرمال با مزانژیال موجب تاخیر در اپیتلیالیزه شدن و نیز گسترش بیش از اندازه بافت فیبرو در پوست می‌شود. MMP-2 &9 دو آنزیم مهم در ترمیم زخم و ساختارسازی بافتی هستند. تعادل ترشح TIMP-1&2 از فیبروبلاست‌ها و TIMP-۳ از کراتینوسیت‌ها منجر به تنظیم ترشح MMPs شده و ترمیم زخم را تنظیم می‌کنند [۴۹]. نکته جالب‌تر در مورد این دو MMP این که در بافت‌های ایسکمیک در مقایسه با بافت‌های برخوردار از اکسیژن مناسب غلظت TIMP-2 افزایش داشته در حالی که MMP-۹ تغییری نداشته است که این ایجاد بافت فیبرو و غیر عملکردی را در بافت‌های ایسکمیک تایید می‌کند [۵۰].

این آنزیم‌ها در بیمارانی که اختلالات کلاژنی دارند از سطوح غیرطبیعی برخوردار است و در برخی بالاتر از سطح نرمالند. به عنوان مثال در سلول‌های جلدی که در معرض نور خورشید قرار داشته‌اند MMP-1,2,3 و همین طور TIMP-1 بیشتر تولید شده و موجب تخریب Basement Membrane و پیری زودرس پوست می‌شوند. اما در مقابل استفاده از TIMP-1 می‌تواند از آسیب BM جلوگیری کند [۵۱].

زخم‌ها وتاول‌ها نیز از دخالت MMPs و ۳-۳-۱۴در امان نیستند. در بیماران پمفیگوسی با تاول‌های متعدد در پوست، MMPها نسبت به پوست نرمال از غلظت بسیار بالاتری به خصوص در مایع تاولی برخوردار بوده‌اند. در یکی از مطالعات دیده شده که MMP-2,9,13 هم در مایع تاولی وجود دارد و هم از سلول‌های T و هم از ایوزینوفیل‌ها ترشح می‌شود. در واقع به دلیل غلظت بالای این MMPs لایه اپیدرم به هم پیوستگی خود را از دست داده و تاول به صورت جداشدگی لایه‌های اپیدرم خود را نشان می‌دهد [۵۲]. در لیکن پلان نیز افزایش ترشح MMP 2&9 به همراه فیبرونکتین از T cellها دیده شده که در نتیجه موجب تخریب درم شده و درماتیت ایجاد می‌کند [۵۳].

در مطالعات مختلف نشان داده شده است که بعد از آسیب میزان MMP-1 و MMP-9 و MT1-MMP بلافاصله افزایش می‌یابد. مثلاً در مطالعه Soo و همکاران مشخص شد که ۱۲ ساعت بعد از آسیب حاد MMP-1، MMP-9 و TIMP-1 به صورت واضحی افزایش می‌یابند که پیشینه آن بین روزهای اول تا سوم بوده و همزمان با پروسه Re-

epithelialization بافت آسیب دیده بوده و بعد از روز چهاردهم به خط زمینه نزدیک می‌شوند اما MT1-MMP تا یک هفته از سطح بالایی برخوردار است [۵۴].

در زخم‌های مزمن سطوح بالایی از سلول‌های التهابی، پروتیازها، هورمون رشد و گیرنده‌های ECM وجود دارد که در التیام زخم دخیلند [۵۵]؛ زخم پای دیابتی هم یکی از آنهاست. یافته‌هایی وجود دارد که نشان از دخالت بی چون و چرای MMPs در عدم ترمیم زخم دارد. برای مثال MMP-2 به عنوان یک اندیکاتور در ترمیم زخم و امکان موفقیت آن معرفی شده است به نحوی که با اعمال درمان‌های خاص برای ترمیم زخم‌های مزمن از غلظت MMP-2 در نمونه‌های بیوپسی کاسته می‌شود تا التیام زخم به حالت طبیعی درآید [۵۶].

ماتریکس متاولوپروتئینازها، ۳-۳-۱۴ و دیابت

در سال‌های اخیر در مطالعات متعددی به ارتباط ۳-۳-۱۴و دیابت اشاره شده است که از تاثیرگذاری در آثار خارج سلولی قند بالا تا تنظیم اثرات داخل سلولی انسولین توسط ۳-۳-۱۴مورد تاکید و بررسی قرار گرفته است.

در مطالعات بسیاری بیان شده که انسولین و ۳-۳-۱۴ ارتباط تنگاتنگی با یکدیگر دارند. انسولین محرک بسیاری از فعالیت‌های درون سلولی است و همانند هورمون رشد بسیاری از مولکول‌ها را فسفریله می‌کند. انسولین برای رساندن پیغام خود به درون سلول نیاز به تعدادی پروتئین‌های واسطه‌ای دارند که بسیاری از آنها در حالت فسفریله به ۳-۳-۱۴ باند شده و عمل می‌کنند یا غیر فعال می‌گردند [۵۹،۵۷].

جرج رام و همکاران در مطالعه خود به این نکته اشاره کرده‌اند که ۳-۳-۱۴در ساخته شدن GLUT4 که یک Insulin-regulated glucose transporter است نقش مهمی دارد به نحوی که با تحریک انسولین بر روی ۳-۳-۱۴و اثرگذاری آن بر روی AS160 اثر مهار کننده آن بر روی GLUT4 را خنثی می‌کند و در نتیجه با تولید داخل سلولی این ترانسپورتر و رفتن آن به سطح سلول موجب ورود قند به داخل سلول شده که این امر در سلول‌های چربی واضحاً به اثبات رسیده است. با همراهی و باند شدن ۳-۳-۱۴با AS160 که از پروتئین‌های اصلی در تنظیم تولید ترانسپورتر گلوکز به داخل سلول است اثر انسولین درون سلول تحریک می‌شود [۶۰]. در جهت دیگر انسولین با فسفریله کردن برخی عوامل که با دخالت ۳-۳-۱۴ انجام می‌شود منجر به trafficking مولکول GLUT در سلول‌های چربی خواهد شد [۶۱]. پس ۳-۳-۱۴ واسطه انتقال ترانسپورتر گلوکز به سطح سلول و در نتیجه کاهش قند پلاسما می‌باشد. همچنین در سلول‌های جزیره‌ای پانکراس زمانی که قند خون بالا می‌رود ۳-۳-۱۴ از یکی از Coactivator های تولید انسولین جدا شده تا در نهایت انسولین تولید و ترشح گردد [۶۲].

در سلول‌های عضلانی نیز ثابت شده که انجام تمرینات ورزشی و فعالیت عضلانی این سیستم اثرگذاری انسولین درون سلول را تحریک می‌کند و این کار را به وساطت ۳-۳-۱۴انجام می‌دهد. در واقع اثر ورزش(چه هوازی و چه بی هوازی) در بهبود دیابت و سطح خونی گلوکز با دخالت ۳-۳-۱۴انجام می‌گیرد [۶۳].

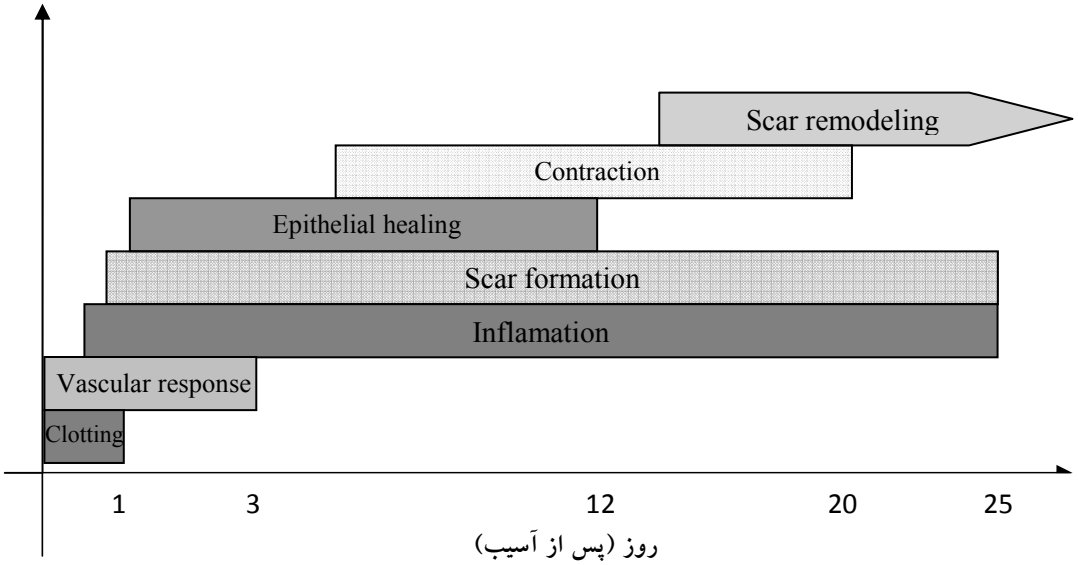
در یکی دیگر از مطالعاتی که درباره متابولیسم قندها و چربی‌ها انجام شده به نقش ۳-۳-۱۴در تنظیم سنتز تری‌گلیسیرید از اسیدهای چرب مصرف شده اشاره شده است. تری‌گلیسیرید در طی روند لیپوژنز از کربوهیدرات مواد غذایی تشکیل می‌شود که این مسیر تحت کنترل برخی آنزیم‌هاست مثلا در کبد تحت کنترل آنزیم WBSCR۱۴ یا همان ChREBP است که ترجمه ژن‌های لیپوژنیک را آغاز می‌کند. کنترل تولید WBSR14 توسط ۴ ایزوفرم از ۳-۳-۱۴می‌باشد و در واقع با کمبود ۳-۳-۱۴در سلول و عدم تولید WBSR14 اختلالات متابولیسم قند و چربی در مبتلایان به وجود می‌آید [۶۴]. در مطالعه دیگر نیز اشاره شد است که ۳-۳-۱۴برای باند شدن به مولکول‌های لازم برای پاسخ‌دهی ChREBP به گلوکز الزامی است [۶۵].

نقش ماتریکس متاولوپروتئینازها و ۳-۳-۱۴ در پاتوژنز زخم پای دیابتی

عارضه بسیار شایع دیابت ترمیم ناکافی زخم یا زخم پای دیابتی است که بیشترین بستری و نیاز به درمان مکرر را در

بیماران به همراه دارد [۶۶،۶۷]. نوروپاتی [۶۸]، ایسکمی و عفونت شایع‌ترین دلایل منجر به زخم پای دیابتی هستند [۶۹،۷۰]. برای شناخت بهتر پاتوفیزیولوژی این عارضه ابتدا به مراحل ترمیم زخم اشاره کرده سپس به بررسی اختلالات منجر به زخم پای دیابتی می‌پردازیم.

بعد از یک آسیب به پوست، یکسری پاسخ‌های هماهنگ در مقابل تغییر ایجاد شده آغاز می‌شوند. در زخمی که به صورت حاد ایجاد شده روند ترمیم شامل این مراحل می‌باشد: ۱- هموستاز (شامل clotting و Vascular response)، ۲- التهاب (شامل مهاجرت سلول‌ها)، ۳-تکثیر (شامل شکل‌دهی زخم و Re-epithelialization) و ۴- تجدید ساختار (شامل contraction و remodeling) می‌باشد [۷۱] (شکل ۱).



شکل ۱- مراحل ترمیم زخم حاد. اختلال در هر کدام از این مراحل منجر به اختلال در ترمیم زخم می‌شود. زمان‌های ذکر شده بستگی به سایز و محل زخم دارد [۷۲].

این فازها از نظر هیستولوژیک و عملکرد کاملاً از هم جدا هستند اما از نظر زمانی با یکدیگر همپوشانی داشته و ترمیم کامل نیز به ارتباط گسترده بسیاری از عوامل سلولی و مولکولی بستگی دارد. این عوامل شامل هورمون رشد و سیتوکین‌هایی است که از سلول‌های التهابی فیلتره شده به فضای زخم ترشح می‌گردند و واکنش‌های محل آسیب را با تأثیر بر اجزای ماتریکس خارج سلولی (ECM) کنترل می‌کنند که بسته به شدت آسیب مقادیر متفاوتی دارند [۷۳]. ECM یا همان ماتریکس بین سلولی از اجزای مهمی تشکیل می‌شود که کلاژن، الاستین، فیبرونکتین، گلیکوز آمینوگلیکان و پروتیوگلیکان‌ها از مهمترین آنها در ترمیم زخم می‌باشند [۷۴].

بسیاری از عوامل ترمیم توسط فیبروبلاست‌های مهاجرت کرده به بافت آسیب دیده و نیز کراتینوسیت‌های اطراف زخم ساخته می‌شوند [۷۵]. به طور معمول در زخم‌های کوچک فیبروبلاست‌ها به عنوان سربازهای تازه نفس از لبه‌های بافت سالم شروع به ساخت پروتیین‌های خارج سلولی همچون کلاژن تیپ I و III (که حدوداً ۹۵٪ انواع کلاژن‌ها از این دو نوع هستند) و همین طور فیبرونکتین و پروتیوگلیکان می‌کنند که باعث تقویت روند ترمیم می‌شوند [۷۶]. در واقع راز کنترل میزان ترمیم در گرو شناخت بیشتر عملکرد فیبروسیت‌ها و نیز یافتن راه‌هایی برای کنترل آن می‌باشد [۷۷]. اگر این تحریک بیش از حد باشد و یا مهار کننده‌ها به خوبی ترشح نشوند یا عمل نکنند و یا اصلا پروسه ترمیم به اندازه کافی تقویت نشود ما با زخم‌های هایپر تروفیک و یا با عدم ترمیم زخم و بسته نشدن لبه‌های آن روبه رو می‌شویم [۷۸،۷۹]. همان طور که به کار بردن بیش یا کمتر از حد قیچی در آرایش

موی سر موجب نابسامانی در آرایش موها می‌شود تعادل بین تولید و تخریب اجزای ECM نیز لازمه یکپارچگی پوست نرمال است. آنچه تاکنون به اندازه کافی روشن نشده این است که دلیل این پرکاری در عمل ترمیم زخم و تولید بیش از اندازه کلاژن در زخم‌های سوختگی که منجر به زخم‌های هایپر تروفیک می‌شود چیست؟

آنچه که در ارتباط با ترمیم زخم‌های دیابتی دیده شده این است که در دیابت تمام مراحل فوق به طور غیر طبیعی انجام می‌شوند به نحوی که پاسخ التهابی، شکل‌دهی ساختاری کلاژن‌ها در بستر زخم، انقباض مکانیکی زخم‌های سطحی و داخلی و مراحل انتهایی ترمیم زخم همگی در زمان استفاده از انسولین به حالت طبیعی برگشته‌اند [۸۰،۸۱،۸۲]. به عنوان مثال نشان داده شده که فیبروبلاست‌ها که سازنده کلاژن و در نتیجه سازنده زیرساخت‌های بافت جدید هستند در مجاورت با قند بالا با سرعت کمتری تکثیر می‌یابند [۸۳]. همین طور آنژیوژنز نیز در دیابت مختل می‌شود مطالعات میکروسکوپی نشان داده است که در بیماران با کنترل نا مطلوب قند خون، خون‌رسانی کاپیلاری بسیار ضعیف‌تر بوده و در زخم‌های پای دیابتی ایسکمی ایجاد می‌کند [۸۴]. پس می‌توان گفت که اختلال در تکثیر و تمایز فیبروبلاست به معنای عدم ترمیم زخم می‌باشد و نتیجتاً ترمیم زخم به یک بالانس خوب بین ساخته شدن و تخریب کلاژن‌ها نیاز دارد تا تشکیل ساختار درم به درستی انجام شود. مهمترین عامل در تخریب کلاژن‌ها برخی از انواع MMPs هستند که به عنوان کلاژنازها عمل کرده و مانع شکل‌گیری اسکار می‌شوند. این MMP ها در سازوکارهایی که توسط ۳-۳-۱۴ کنترل می‌شود تولید شده و ترجمه کمتر یا بیشتر آن موجب عدم ترمیم زخم و یا زخم‌های هایپرتروفیک می‌شود [۸۵].

در یکی از مطالعات انجام شده توسط دکتر قهاری و همکاران با تهیه یک سیستم Co-Culture تعامل بین کراتینوسیت‌ها به عنوان سلول‌های اپیدرم و فیبروبلاست‌ها به عنوان سلول‌های درم در ترشح MMPs و تخریب کلاژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این بین مشخص شد که یک نوع استراتیفین قابل ترشح به فضای خارج سلولی که نام آنرا در این تحقیق در ابتدا KDAF (Keratinocyte-Drived-Stimulating-Collagenase-Factor) گذاشتند و در ادامه معلوم شد که همان ۳-۳-۱۴سیگما بوده، نقش اصلی را در تحریک کلاژن ازها ایفا می‌کند. در واقع با ترشح ۳-۳-۱۴از کراتینوسیت‌ها و عبور آن از غشای پایه، کلاژنازها (MMPS) فعال شده و کلاژن‌ها تخریب می‌شوند [۸۶]. در برخی مطالعات جنس MMP های هدف از نوع MMP-1 و MMP-3 بوده است [۸۷]. به عنوان مثال نشان داده شد که استراتیفین ترشحی از کراتینوسیت‌ها (۳-۳-۱۴) می‌تواند منجر به تولید و ترشح MMP-1 از فیبروبلاست‌ها گردد [۸۸]. البته در این سیستم سایر MMPs هم بر اثر ۳-۳-۱۴ ترجمه می‌گردند از جمله MMP-10 (stromelysin-2) MMP-3 (stromelysin-1) و MMP-8 (neutrophil collagenase).[۸۹]. این نکات نشان دهنده ارتباط برخی MMPs با ترشح ۳-۳-۱۴ در ترمیم زخم می‌باشد.

در مطالعه Lam و همکاران ۳۶ ساعت بعد از تزریق انسولین در بیماران با قند بالا، استراتیفین ترشحی از کراتینوسیت‌ها (۳-۳-۱۴) مهار شده که در نتیجه کاهش MMP-1 expression را به دنبال دارد [۹۰]. با کم شدن تولید MMPs تخریب کلاژن در درم کاهش یافته و محصولات فیبروبلاست‌ها در فضای درم باقی خواهند ماند و ترمیم زخم انجام خواهد شد. این مطلب نشان دهنده اثر انسولین در کاهش تخریب کلاژن‌های درم بوده که ثابت می‌کند وجود انسولین پایداری ساختارهای زیر اپیدرم را تضمین می‌کند و کمبود آن موجب عدم ترمیم مناسب خواهد شد. همان طور که پیش از این اشاره شد MMPs منجر به تخریب کلاژن‌ها و از بین رفتن بافت فیبرو محل آسیب شده و در مقابل TIMPs با مهار MMPs باعث پایداری آن می‌شود که این کار توسط ۳-۳-۱۴ رهبری می‌شود [۹۱].

در زخم‌های مزمن در مقایسه با زخم‌های با ترمیم نرمال تفاوت‌های ثابت شده‌ای بین دو گروه دیده شده است به نحوی که در ترشحات زخم بیماران دیابتی آنزیم‌های مخرب از غلظت بالاتری برخوردارند [۹۲]. MMPs بالا (MMP-2 & 9 در همراهی با پایین بودن مهارکننده‌های

آنها در بافت‌های زخم پای دیابتی گزارش شده است [۹۳،۹۴]. در بسیاری از زخم‌های پوستی بیماران دیابتی این نکته دیده شده که MMP-1,2,8,9 بالا رفته و در مقابل از غلظت TIMP-2 کاسته شده است [۹۵،۹۶،۹۷]. پس ۳-۳-۱۴یک فاکتور منفی در ترمیم زخم بوده به نحوی که از طریق تاثیر بر روی ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP) به خصوص MMP-1 به عنوان یک کلاژناز مانع ایجاد بافت کلاژنی در محل آسیب شده و یا با تحریک تولید MMP-3 از بسته شدن لبه‌های زخم جلوگیری می‌کند. در واقع طبق پیش‌بینی MMP-1 اولین خط ارتباطی ۳-۳-۱۴با خارج از سلول جهت اثر بر روی فیبرو بلاست‌هاست [۹۸].

یافته‌های دیگری نیز در زخم‌های مزمن وجود دارد که نشان از دخالت بی چون و چرای MMPs در عدم ترمیم زخم دارد. برای مثال MMP-2 به عنوان یک اندیکاتور در ترمیم زخم و امکان موفقیت آن معرفی شده است به نحوی که با اعمال درمان‌های خاص برای ترمیم زخم‌های مزمن از غلظت MMP-2 در نمونه‌های بیوپسی کاسته می‌شود [۹۹] و یا نشان داده شده است که افزایش غلظت MMP-9 با شانس بهبود زخم رابطه معکوس دارد و پیش ساز آن یک فاکتور پیش‌گو برای ترمیم زخم دیابتی می‌باشد [۱۰۰]. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که در زخم‌های مزمن سطوح بالایی از سلول‌های التهابی، پروتئینازها، هورمون رشد و گیرنده‌های ECM وجود دارد که در التیام زخم دخیل است و تولید بسیاری از آنها با واسطه ۳-۳-۱۴ انجام می‌شود.

مشکل دیگر بیماران دیابتی اختلالات فراوانی است که در پاسخ‌های سیستم ایمنی این بیماران وجود دارد. برای مثال اختلال در واکنش‌های کموتاکتیک باعث می‌شود سلول‌های کمتری به محل آسیب وارد شده و در نتیجه احتمال عفونت در زخم بالا رود. از طرف دیگر با نیامدن سلول‌های ایمنی و کمبود ترشح ILs و TNF، ترشح MMPs دچار اختلال می‌شده و آغاز ترمیم زخم به تعویق می‌افتد. بعد از مدتی سلول‌های ایمنی به تدریج وارد محل شده و به صورت تاخیری مقادیر زیادی IL-1β و TNF-α ترشح می‌کنند که به صورت جبرانی غلظت MMPs بالا رفته و منجر به تخریب بسیاری از پروتیین‌های ماتریکس می‌شود. در نتیجه ترمیم‌های ابتدایی نیز بی اثر شده و زخم بهبود نمی‌یابد [۱۰۱،۱۰۲]. از سوی دیگر نشان داده شده است که Staphylococcus aureus در زخم باعث افزایش MMP-1,2,3,7,10,11 and 13 می‌شود در نتیجه عفونت نیز که در زخم پای دیابتی شایع است از طریق افزایش MMPs منجر به تخریب بیشتر می‌شود [۱۰۳].

از طرف دیگر قند بالا در این دسته از بیماران باعث گلیکاسیون پروتیین‌های ماتریکس شده و مانع عملکرد صحیح آنها می‌شود. برای مثال با گلیکاسیون FGF-۲ مهار بر روی ترجمه و تولید برخی از مسیرها برداشته می‌شود و یا باعث تولید بیش از حد مسیرهای مقابل کلاژن می‌شود که در ترمیم غشای پایه عروق نقش اساسی را دارد [۱۰۴،۱۰۵]. در مقابل، دیده شده که بلاک کردن این محصولات گلیکاسیون شده، منجر به کاهش IL، TNF و MMPs و افزایش غلظت Vascular endothelial growth factor)VEGF) وPDGF (Platelet-derived growth factor) می‌شود [۱۰۶].

Muller و همکاران در مطالعه خود نشان داده‌اند که نسبت MMP-1/TIMP-1، می‌تواند به عنوان یک پیشگویی کننده برای ترمیم زخم در بیماران دیابتی عمل کند به نحوی که اگر در هفته دوم بعد از آسیب این نسبت بالای ۳۹٪ باشد به معنای ترمیم مناسب زخم پای دیابتی نوروپاتیک است [۱۰۷].

روش‌های درمانی جدید در مهار ماتریکس متالولوپروتئینازها

درمان زخم پای دیابتی به عنوان یکی از پرطرفدارترین برنامه‌های مراکز تحقیقاتی بوده که در سال‌های اخیر به پیشرفت‌های خوبی دست یافته است اما هنوز روشی که به طور کامل سبب بهبود این زخم‌ها شود مورد تأیید قرار نگرفته است [۱۰۸].

همان طور که ذکر شد MMPs و ۳-۳-۱۴ در بسیاری از سازوکارهای سلولی مولکولی نقش پایه‌ای دارند و این طیف گسترده عملکرد نشان از اهمیت توجه به این مولکول‌هاست. در حال حاضر بیشترین توجه به این نکته جلب شده است که شاید بتوان با دخالت در ترجمه و

تولید این آنزیم‌ها بیماری‌ها را به صورت ریشه‌ای درمان کرد. نقش‌های این مولکول‌ها در عوارض دیابت بسیار قابل توجه است و در بسیاری از این عوارض اختلال مشابه اتفاق افتاده است. خط مشی‌های جدیدی برای مهار MMPs در حال بررسی است تا بتوان با راهبردهای نوین، مهار این آنزیم‌ها را در بیماری‌ها پیاده کرد [۱۰۹]. در مطالعاتی که بر پایه اطلاعات به دست آمده فعلی انجام شده اثرات استفاده از داروهای حاوی مهارکننده‌های MMPs بررسی شده است به نحوی که امید این می‌رود با استفاده از ترکیبات TIMPs بتوان پروفایل ماتریکس بین سلولی را به نفع بهبود زخم تغییر داد [۱۱۰]. اما برای درمان عوارض دیابت توجه کمتری به توانایی مهار کننده‌های این آنزیم‌ها شده است.

درمان‌های مهاری بر روی ۳-۳-۱۴ برای اختلالات fibroproliferative منجر به کاهش ترشح MMP-1 و MMP-3 می‌شود [۱۱۱] که به خصوص در ترمیم Non healing wound از نقاط روشن برای آینده زخم پای دیابتی است.

مهار کردن MMPs اولین بار در درمان کانسر استفاده شد که موفقیت‌آمیز نبود که احتمالاً به خاطر نقش گسترده مهارکننده در بدن بود [۱۱۲]. اما در سال‌های اخیر با اختصاصی‌تر کردن روند مهاری راه‌های جدیدتری پیش روی ما قرار گرفته است. یکی از این راه‌ها مسدود کردن مسیرهای mitogen activated protein kinase (MAPK)، nuclear factor (NF)-jB یا activator protein(AP)-1 می‌باشد که برای درمان آرتریت توصیه شده‌اند و می‌توان برای درمان عوارض دیابت نیز به آن فکر کرد [۱۱۳]. یکی دیگر از درمان‌های نوین تولید آنتی‌بادی مهارکننده MMPs توسط فاژها در آزمایشگاه است. این دست آورد می‌تواند بسیاری از آنزیم‌های متالوپروتئیناز را مهار کند و حتی در نشان دادن محل اثر MMPs نیز کمک کننده است [۱۱۴]. به کار بستن reagents زیستی برای بلوک سایتوکین‌های التهابی در بسیاری از موارد بروز متالوپروتئینازها را محدود کرده است. برای مثال تتراسیکلین که یک مهارکننده ضعیف فعالیت‌های کتالیتیک MMPs است بر روی سنتز آنها نیز تأثیرگذار بوده و در درمان آرتریت از آن استفاده شده است [۱۱۵].

از سوی دیگرترجمه بیش از حد[1] TIMPs یا به کار بردن cytokines/growth factors در مدل‌های آزمایشگاهی نیز موفقیت‌آمیز بوده است [۱۱۶].

از راه‌های شایع‌تر که در حال استفاده است باید به Negative pressure wound therapy اشاره کرد که می‌تواند با مکش ترشحات موجود در زخم منجر به MMPs sequestration شده و خون‌رسانی زخم را افزایش دهد [۱۱۷]. معمولاً بعد از زخم‌های جراحی استفاده شده و طبق مطالعات بهبودی نسبتاً کاملی ایجاد می‌کند [۱۱۸].

بنابراین شاید بر پایه برخی شواهد فوق و تحقیقات آینده بتوان ابتدا با برخی درمان‌های موضعی، عوارضی همچون پای دیابتی را درمان کرد اما عوارض پیچیده‌تر همچون درگیری‌های سیستم قلبی عروقی و یا نارسایی‌های دیررس کلیه در بیمارن دیابتی و حتی رتینوپاتی را که دسترسی چندانی نداشته و وسعت تغییرات نیز زیاد است باید با درمان‌های سیستمیک و دخالت در روند تولید و تحریک این مولکول‌ها، اصلاح کرد.

نتیجه‌گیری

توانایی MMPs و کنترل کننده آنها یعنی ۳-۳-۱۴ در دخالت در بافت‌های طبیعی یا در بیماری‌ها، نشان می‌دهد که مطالعه برای به کارگیری مهارکننده آنها می‌تواند در درمان بسیاری از عوارض دیابت کمک کننده باشد. لازمه این امر شناخت کامل MMPs، ۳-۳-۱۴ و عملکردهای آنها در درون و بیرون سلول است تا بتوان با طراحی آنتی‌بادی اختصاصی، مهارکننده لوکال و یا سیستمیک و نیز ژن‌تراپی آینده درمان عوارض دیابت را تضمین کرد.

[1] overexpressing

مأخذ

1. Booya F, Bandarian F, Larijani B, Pajouhi M, Nooraei M, Lotfi J. Potential risk factors for diabetic neuropathy: a case control study. *BMC Neurol* 2005; 5:24.
2. Alvin C Powers. Diabetes Mellitus. in: Braunwald, Fauci, Kasper. Hamsons principles of Internal Medicine. 15th ed. *McGrawHill* 2001. p2109-37
3. Amiri-Moghaddam S, Heshmat R, Larijani B. Iranian national diabetes research network project: background, mission, and outcomes. *Arch Iran Med* 2007; 10(1): 83-87.
4. Han YP. Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 (Suppl 3):S88–91 .
5. Shojaiefard A, Khorgami Z, Larijani B. Independent risk factors for amputation in diabetic foot. *Int J Diabetes Dev Ctries* 2008; 28: 32-7.
6. Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin et al. The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell* 1997; 91: 961-71.
7. Jin J, Smith FD, Stark C, Wells CD, Fawcett JP, Kulkarni S, et al. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol* 2004; 14: 1436-50.
8. Jin J, Smith FD, Stark C, Wells CD, Fawcett JP, Kulkarni S, et al. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol* 2004; 14(16): 1436-1450.
9. Michael R Roberts .14-3-3 Proteins find new partners in plant cell signaling. *TRENDS in Plant Science* 2003; 8: 218-223
10. van Heusden GP, Griffiths DJ, Ford JC, Chin-A-Woeng TF, Schrader PA, Carr AM, et al. The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast Saccharomyces cerevisiae and can be replaced by a plant homologue. *Eur J Biochem* 1995; 229: 45-53.
11. van Heusden GP, Wenzel TJ, Lagendijk EL, de Steensma HY, van den Berg JA. Characterization of the yeast BMH1 gene encoding a putative protein homologous to mammalian protein kinase II activators and protein kinase C inhibitors. *FEBS Lett* 1992; 302: 145-50.
12. Jin J, Smith D, Stark C. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol* 2004; 14: 1436–1450
13. Mackintosh C. Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem J* 2004; 381:329–342
14. Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Takahashi N, Araki K, Kuwano R, et al. Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc Nati Acad Sci USA* 1988; 85: 7084-8.
15. Toker A, Ellis CA, Sellers LA, Atiken A. Protein kinase C inhibitor proteins. Purification from sheep brain and sequence similarity to lipocortins and 14-3-3 protein. *Eur J Biochem* 1990; 191: 421-429.
16. Boston PF, Jackson P, Thompson RJ. Human 14-3-3 protein: radioimmunoassay, tissue distribution, and cerebrospinal fluid levels in patients with neurological disorders. *J Neurochem* 1982; 38, 1475-82.
17. Satoh J, Kurohara K, Yukitake M, Kuroda Y. The 14-3-3 protein detectable in the cerebrospinal fluid of patients with prion-unrelated neurological diseases is expressed constitutively in neurons and glial cells in culture. *Eur Neurol* 1999; 41: 216–225
18. Takeoka T. Cerebrospinal fluid examination in the infectious j meningitis and encephalitis. *Nippon Rinsho* 1997; 55(4):809-14.
19. Wong AH, Likhodi O, Trakalo J, Yusuf M, Sinha A, Pato CN, et al. Genetic and post-mortem mRNA analysis of the 14-3-3 genes that encode phosphoserine/threonine-binding regulatory proteins in schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr Res* 2005; 78: 137-46.
20. Kilani RT, Maksymowych WP, Aitken A, Boire G, St-Pierre Y, Li Y, et al. Detection of high levels of 2 specific isoforms of 14-3-3 proteins in synovial fluid from patients with joint inflammation. *J Rheumatol* 2007; 34: 1650-7.
21. Katz AB, Taichman, LB. A partial catalog of proteins secreted by epidermal keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 818-821.
22. Choi KC, Lee S, Kwak SY, Kim MS, Choi HK, Kim KH, et al. Increased expression of 14-3-3varepsilon protein in intrinsically aged and photo aged human skin in vivo. *Mech Ageing Dev* 2005; 126: 629–636
23. Leffers H, Madsen P, Rasmussen HH, Honoré B, Andersen AH, Walbum E, et al. Molecular cloning and expression of the transformation sensitive epithelial marker stratifin. A member of a protein family that has been involved in the protein kinase C signalling pathway. *J Mol Biol* 1993; 231: 982-98.
24. Aitken A. 14-3-3 proteins on the MAP. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 95-7.
25. Chavez-Muñoz C, Kilani RT, Ghahary A: Profile of exosomes related proteins released by differentiated and undifferentiated human keratinocytes. *J Cell Physiol* 2009; 221: 221-231.
26. Kligys K, Yao J, Yu D, Jones JC. 14-3-3zeta/tau heterodimers regulate Slingshot activity in

migrating keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 383: 450-454.
27. Kilani RT, Medina A, Aitken A, Jalili RB, Carr M, Ghahary A. Identification of different isoforms of 14-3-3 protein family in human dermal and epidermal layers. *Mol Cell Biochem* 2008; 314:161-9.
28. Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR, Schultz GA. Roles of growth factors during peri-implantation development. *Hum Reprod* 1995; 10(3):712-8.
29. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000; 14: 2123-33.
30. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 221-33.
31. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular Aspects of Medicine* 2008; 29: 290–308
32. Lobmann R, Schultz G, Lehnert H. Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic mplications. *Diabetes Care* 2005; 28: 461–471.
33. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 133-44.
34. Burrage PS, Brinckerhoff CE. Molecular targets in osteoarthritis: metalloproteinases and their inhibitors. *Curr Drug Targets* 2007; 8: 293-303.
35. Milner JM, Cawston TE. Matrix metalloproteinase knockout studies and the potential use of matrix metalloproteinase inhibitors in the rheumatic diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4:363-75.
36. Gasson JC, Golde DW, Kaufman SE, Westbrook CA, Hewick RM, Kaufman RJ, et al. Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature* 1985; 315:768–771.
37. Stetler-Stevenson WG, Bersch N, Golde DW. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity. *FEBS Lett* 1992; 296:231–234.
38. Soo C, Shaw WW, Zhang X, Longaker MT, Howard EW, Ting K. Differential expression of matrix Metalloproteinases and their tissuederived inhibitors in cutaneous wound repair. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105: 638–647.
39. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 2005; 85:1-31.
40. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:463-516.
41. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:161-74.
42. Skoog T, Ahokas K, Orsmark C, Jeskanen L, Isaka K, Saarialho-Kere U. MMP-21 is expressed by macrophages and fibroblasts in vivo and in culture. *Exp Dermatol Journal compilation Blackwell Munksgaard* 2006; 15: 775-783.
43. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 562-73.
44. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 133-44.
45. Woo K, Ayello EA, Sibbald RG. The edge effect: current therapeutic options to advance the wound edge. *Adv Skin Wound Care* 2007; 20: 99-117.
46. Yang L, Scott PG, Dodd C, Medina A, Jiao H, Shankowsky HA, et al. Identification of fibrocytes in postburn hypertrophic scar. *Wound Repair Regen* 2005; 13: 398-404.
47. Toriseva MJ, Ala-aho R, Karvinen J, Baker AH, Marjomäki VS, Heino J, et al. Collagenase-3 (MMP-13) enhances remodeling of three-dimensional collagen and promotes survival of human skin fibroblasts. J *Invest Dermatol* 2007 ; 127: 49-59.
48. Asano Y, Ihn H, Kubo M, Jinnin M, Mimura Y, Ashida R, et al. Clinical significance of serum levels of matrix metalloproteinase-13 in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* 2006; 45: 303-7.
49. Sawicki G, Marcoux Y, Sarkhosh K, Tredget EE, Ghahary A. Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. *Mol cell Biochem* 2005; 269: 209-16.
50. Dalton SJ, Mitchell DC, Whiting CV, Tarlton JF. Abnormal extracellular matrix metabolism in chronically ischemic skin: a mechanism for dermal failure in leg ulcers. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 373-9.
51. Amano S, Ogura Y, Akutsu N, Matsunaga Y, Kadoya K, Adachi E, Nishiyama T. Protective effect of matrix metalloproteinase inhibitors against epidermal basement membrane damage: skin equivalents partially mimic photoageing process. *Br J Dermatol* 2005; 153: 37-46.
52. Niimi Y, Pawankar R, Kawana S. Increased expression of matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-13 in lesional skin of bullous pemphigoid. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 139(2):104-13.
53. Gunduz K, Demireli P, Inanir I, Nese N. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-3, and MMP-9) and fibronectin in lichen planus. *J Cutan Pathol* 2006; 33: 545-50.
54. Soo C, Shaw WW, Zhang X, Longaker MT, Howard EW, Ting K. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105: 638-47.
55. Trengove NJ, Stacey MC, Macauley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F et al . Analysis of the

acute and chronic wounds environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Rep Reg* 1999; 7: 442–452.
56. Karim RB, Brito BL, Dutrieux RP, Lassance FP, Hage JJ. MMP-2 assessment as an indicator of wound healing: A feasibility study. *Adv Skin Wound Care* 2006; 19: 324-7.
57. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, et al. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 2001; 56:127-55.
58. Xiang X, Yuan M, Song Y, Ruderman N, Wen R, Luo Z. 14-3-3 facilitates insulin-stimulated intracellular trafficking of insulin receptor substrate 1. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 552-62.
59. Kino T, De Martino MU, Charmandari E, Ichijo T, Outas T, Chrousos GP. HIV-1 accessory protein Vpr inhibits the effect of insulin on the Foxo subfamily of forkhead transcription factors by interfering with their binding to 14-3-3 proteins: potential clinical implications regarding the insulin resistance of HIV-1-infected patients. *Diabetes* 2005; 54: 23-31.
60. Ramm G, Larance M, Guilhaus M, James DE. A role for 14-3-3 in insulin-stimulated GLUT4 translocation through its interaction with the RabGAP AS160. *J Biol Chem* 2006; 281: 29174-80.
61. Yip MF, Ramm G, Larance M, Hoehn KL, Wagner MC, Guilhaus M, et al. CaMKII-mediated phosphorylation of the myosin motor Myo1c is required for insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. *Cell Metab* 2008; 8: 384-98.
62. Jansson D, Ng AC, Fu A, Depatie C, Al Azzabi M, Screaton RA. Glucose controls CREB activity in islet cells via regulated phosphorylation of TORC2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:10161-6.
63. Howlett KF, Sakamoto K, Garnham A, Cameron-Smith D, Hargreaves M. Resistance exercise and insulin regulate AS160 and interaction with 14-3-3 in human skeletal muscle. *Diabetes* 2007; 56:1608-14.
64. Giuseppe Meria, Cedric Howald, Stylianos E. Antonarakis and Alexandre Reymond, The subcellular localization of the ChoRE-binding protein, encoded by the Williams-Beuren syndrome critical region gene 14, is regulated by 14-3-3. *Human Molecular Genetics* 2004; 14: 1505-1514.
65. Li MV, Chen W, Poungvarin N, Imamura M, Chan L. Glucose-mediated transactivation of carbohydrate response element-binding protein requires cooperative actions from Mondo conserved regions and essential trans-acting factor 14-3-3. *Mol Endocrinol* 2008; 22:1658-72.
66. Fard AS, Esmaelzadeh M, Larijani B. Assessment and treatment of diabetic foot ulcer. *Int J Clin Pract* 2007; 61:1931-8.
67. Levin ME. Prevention and treatment of diabetic foot wounds. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 1998; 25(3):129-46.
68. Forouzandeh F, Aziz Ahari A, Abolhasani F, Larijani B. Comparison of different screening tests for detecting diabetic foot neuropathy. *Acta Neurol Scand* 2005; 112(6):409-13.
69. Unnikrishnan AG. Approach to a patient with a diabetic foot. *Natl Med J India* 2008; 21:134-7.
70. Frykberg RG. Diabetic foot ulcers: pathogenesis and management. *Am Fam Physician* 2002; 66(9):1655-62.
71. Medina A, Scott PG, Ghahary A, Tredget EE, Pathophysiology of Chronic Nonhealing Wounds. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* 2005; 26: 306-319.
72. Toriseva M, Kähäri VM. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(2): 203-24.
73. Lopez-Otin C, Overall CM. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 509–519.
74. Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 2004: 16: 558–564.
75. Martin P. Wound healing. Aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276:75-81.
76. Clark, R. A. F. (Ed.). The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. Vol. XXIII. New York: Plenum Press, 1996. Pp. 3–50.
77. Yang L, Scott PG, Dodd C, Medina A, Jiao H, Shankowsky HA, et al. Identification of fibrocytes in postburn hypertrophic scar. *Wound Repair Regen* 2005; 13(4):398-404.
78. Scott PG, Ghahary A, Tredget EE. Molecular and cellular aspects of fibrosis following thermal injury. *Hand Clin* 2000; 16: 271–287.
79. Tredget EE, Nedelec B, Scott PG, Ghahary A. Hypertrophic scars, keloids, and contractres. The cellular and molecular basis for therapy. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 701–730.
80. Tengrup I, Hallmans G, Agren MS. Granulation tissue formation and metabolism of zinc and copper in alloxan-diabetic rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*1988; 22(1): 41-5.
81. Schaffer MR, Tantry U, Efron PA, Ahrendt GM, Thornton FJ, Barbul A. Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: a possible patho-physiologic correlation. *Surgery* 1997; 121: 513-519.
82. Bitar MS, Farook T, Wahid S, Francis IM. Glucocorticoid-dependent impairment of wound healing in experimental diabetes: amelioration by adrenalectomy and RU 486. *J Surg Res* 1999; 82: 234-243.
83. Hehenberger K, Hansson A. High glucose-induced growth factor resistance in human fibroblasts can be reversed by antioxidants and protein kinase C-inhibitors. *Cell Biochem Funct* 1997; 15: 197-201.
84. Flynn MD, Boolell M, Tooke JE, Watkins PJ. The effect of insulin infusion on capillary blood flow in the diabetic neuropathic foot. *Diabet Med* 1992; 9: 630-634.
85. Poulalhon N, Farge D, Roos N, Tacheau C, Neuzillet C, Michel L, et al. Modulation of collagen and MMP-1 gene expression in

fibroblasts by the immunosuppressive drug rapamycin. A direct role as an antifibrotic agent? *J Biol Chem* 2006; 281: 33045-52.
86. Ghahary A, Karimi-Busheri F, Marcoux Y, Li Y, Tredget EE, Taghi Kilani R, et al. Keratinocyte-releasable stratifin functions as a potent collagenase-stimulating factor in fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2004; 122(5): 1188-97.
87. Ghaffari A, Li Y, Karami A, Ghaffari M, Tredget EE, Ghahary A. Fibroblast extracellular matrix gene expression in response to keratinocyte-releasable stratifin. *J Cell Biochem* 2006; 98(2): 383-93.
88. Lam E, Kilani RT, Li Y, Tredget EE, Ghahary A. Stratifin-induced matrix metalloproteinase-1 in fibroblast is mediated by c-fos and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Invest Dermatol* 2005; 125(2): 230-8.
89. Kilani RT, Guilbert L, Lin X, Ghahary A. Keratinocyte conditioned medium abrogates the modulatory effects of IGF-1 and TGF-beta 1 on collagenase expression in dermal fibroblasts. *Wound Repair Regen* 2007; 15(2): 236–244.
90. Lam E, Tredget EE, Marcoux Y, Li Y, Ghahary A. Insulin suppresses collagenase stimulatory effect of stratifin in dermal fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 2004; 266:167-74.
91. Poulalhon N, Farge D, Roos N, Tacheau C, Neuzillet C, Michel L, et al. Modulation of collagen and MMP-1 gene expression in fibroblasts by the immunosuppressive drug rapamycin. A direct role as an antifibrotic agent? *J Biol Chem* 2006; 281(44):33045-52.
92. Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 64.
93. Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors and proteases in acute and chronic wound. *Wound Repair Regen* 1996; 4: 411– 420.
94. Bullen EC, Longaker MT, Updike DL, Benton R, Ladin D, Hou Z, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 236–240.
95. Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweek S, Lehnert H. Expression of matrix-metalloprotein ases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non diabetic patients. *Diabetologia* 2002; 45: 1011-6.
96. Nwomeh BC, Liang HX, Cohen IK, Yager DR. MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *J Surg Res* 1999; 81: 189–195.
97. Rayment EA, Upton Z, Shooter GK. Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. *Br J Dermatol* 2008; 29: 951–961.
98. Ghahary A, Marcoux Y, Karimi-Busheri F, Li Y, Tredget EE, Kilani RT, et al. Differentiated keratinocyte-releasable stratifin (14-3-3 sigma) stimulates MMP-1 expression in dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 170-7.
99. Karim RB, Brito BL, Dutrieux RP, Lassance FP, Hage JJ. MMP-2 assessment as an indicator of wound healing: A feasibility study. *Adv Skin Wound Care* 2006;19(6):324-7.
100. Liu Y, Min D, Bolton T, Nubé V, Twigg SM, Yue DK, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2009; 32(1): 117-9.
101. Wall SJ, Sampson M, Levell N, Murphy G. EIevatcd matrix metalloproicinasc-2 and -3 productions from human dia¬betic dermal fibroblasts. *Br I Dermarol* 2003, 149:13-6.
102. Wetzler C, Kämpfer H, Stallmeyer B, Pfeilschifter J, Frank S. Large and sustained induction of chcmokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages dur¬ing the late phase of repair. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 245-53.
103. Kanangat S, Postlethwaite A, Hasty K, Kang A, Smeltzer M, Appling W, et al. Induction of multiple matrix metalloproteinases in human dermal and synovial fibroblasts by Staphylococcus aureus: implications in the pathogenesis of septic arthritis and other soft tissue infections. *Arthritis Res Ther* 2006; 8(6): R176.
104. Duraisamy Y, Slevin M, Smith N, et al. effect of glycation on basic fibroblast growth factor induced angiogenesis and activation of associated signal transduction pathways in vascular endothelial cells: possible relevance to wound healing in diabetes. *Angiogenesis* 2001; 4: 277-88.
105. Abe H, Matsubara T, Iehara N, Nagai K, Takahashi T, Arai H, Kita et al. Type IV collagen is transcriptionally regulated by Smadi under advanced gly-cation end product (AGE) stimulation. *Biol Chem* 2004; 279:14201-6.
106. Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, et al. Blockade of receptor for advanced glycacion end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol* 2001;159:513-25
107. Muller M, Trocme C, Lardy B, Morel F, Halimi S, Benhamou PY. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet Med* 2008; 25: 419-26.
108. Larijani B, Hasani RS. Overview of diabetic foot; novel treatments in diabetic foot ulcer. *DARU-JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY* 2008; 16: 1-6.
109. Overall CM, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 657-72.
110. Gupta A, Upadhyay NK, Sawhney RC, Kumar R. A poly-herbal formulation accelerates normal and impaired diabetic wound healing. *Wound Repair Regen* 2008; 16(6):784-90.

111. Medina A, Ghaffari A, Kilani RT, Ghahary A. The role of stratifin in fibroblast-keratinocyte interaction. *Mol Cell Biochem* 2007: 305: 255-264.
112. Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 411-24.
113. Mix KS, Sporn MB, Brinckerhoff CE, Eyre D, Schurman DJ. Novel inhibitors of matrix metalloproteinase gene expression as potential therapies for arthritis. *Clin Orthop Relat Res* 2004; (427 Suppl):S129-37
114. Suenaga N, Mori H, Itoh Y, Seiki M. CD44 binding through the hemopexin-like domain is critical for its shedding by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Oncogene* 2005; 24: 859-68.
115. Voils SA, Evans ME, Lane MT, Schosser RH, Rapp RP. Use of macrolides and tetracyclines for chronic inflammatory diseases. *Ann Pharmacother* 2005; 39(1):86-94.
116. Van der Laan WH, Quax PH, Seemayer CA, Huisman LG, Pieterman EJ, Grimbergen JM, et al. Cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by gene transfer of TIMP-1 and TIMP-3. *Gene Ther* 2003; 10(3):234-42.
117. Banwell P, Teot L. Topical negative pressure (TNP): the evolution of a novel wound therapy. *J Tissue Viability* 2006; 16:16-24.
118. Armstrong DG, Lavery LA. Negative pressure wound therapy after partial diabetic foot amputation: a multicentre, randomized controlled trial. *Lancet* 2005; 366:170.