

MMPs Hecha fácil



Volumen 1 | Número 1 | Noviembre 2009 www.woundsinternational.com

Introducción

En este artículo se describe qué son las MMPs y la importancia de su función en la cicatrización normal y alterada de las heridas. En concreto, se comenta la relevancia de las MMPs para la práctica clínica, incluidas las intervenciones actuales y potenciales dirigidas a regular su actividad.

Autores: Gibson D, Cullen B, Legerstee R, Harding KG y Schultz G.

Los datos completos de los autores figuran en la página 5.

¿Qué son las MMPs?

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) forman parte de la familia más amplia de enzimas metaloproteinasas que desempeñan una función importante en la cicatrización de las heridas^{1,2}.

Las enzimas son proteínas que facilitan las reacciones biológicas, pero que no se consumen ni se modifican en ellas. Generalmente actúan sobre un pequeño número de moléculas (conocidas como sustratos de las enzimas) y las modifican físicamente transformándolas en otras sustancias. Las proteinasas (conocidas también como proteasas) son enzimas que actúan en las proteínas, normalmente escindiendo sus moléculas.

Los sustratos naturales de las diferentes MMPs varían substancialmente, aunque incluyen importantes proteínas de la matriz extracelular (MEC), como el colágeno, la gelatina y los proteoglicanos. Las MMPs degradan estas proteínas escindiéndolas en fragmentos. Las diferentes MMPs pueden actuar de manera secuencial y en distintas partes del mismo sustrato.

¿Por qué se denominan metaloproteinasas de la matriz?

El nombre de "metaloproteinasas de la matriz" (o "metaloproteasa de la matriz") es indicativo de las propiedades fundamentales que comparten las MMPs. Estas propiedades son las siguientes:

- **degradan preferentemente las proteínas que constituyen la matriz extracelular de los tejidos**
- **requieren un ion metálico (cinc) en el centro activo de la enzima.**

¿Cómo se producen las MMPs?

En la cicatrización normal de las heridas, las MMPs son producidas por:

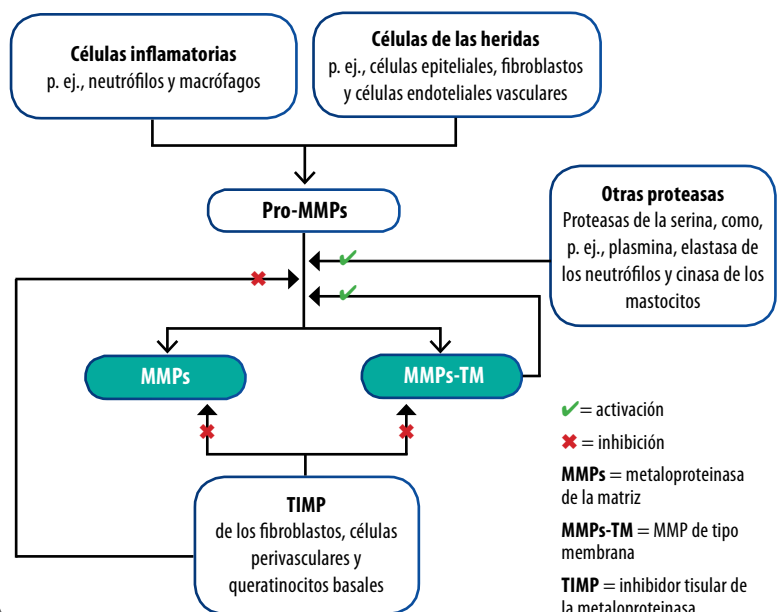
- **células inflamatorias activadas (neutrófilos y macrófagos)**
- **células de la herida (células epiteliales, fibroblastos y células endoteliales vasculares).**

Cuando se sintetizan por primera vez, las MMPs se encuentran en forma latente (inactiva o pro-MMP). Las activan otras proteasas que recortan una parte pequeña de la molécula. De esta manera se abre el centro activo de la molécula de la MMPs que permite que ésta se una a su sustrato proteico. Otras moléculas denominadas "inhibidores tisulares de las metaloproteinasas" (TIMP) pueden inhibir las MMPs activadas y bloquear la activación de las pro-MMPs (Figura 1).

Hasta ahora se han identificado 23 MMPs humanas. La MMP-1, la MMP-2, la MMP-8 y la MMP-9 han sido el centro de atención particular de investigación en relación con las heridas.

Aunque la mayoría de las MMPs se secretan en la MEC circundante, algunas MMPs se mantienen asociadas a las membranas celulares y se conocen como MMPs de "tipo membrana" (MMPs-TM). Se cree que este grupo de MMPs desempeña una función importante en la activación de las pro-MMPs, así como en la activación del pro-TNF (factor de necrosis tumoral, que es un mediador importante que participa en la inflamación y la muerte celular).

Figura 1 Visión general de la producción, activación e inhibición de las MMPs



MMPs made easy



MMPs en la cicatrización normal de las heridas

Las MMPs desempeñan unas funciones esenciales y beneficiosas en al menos cinco procesos fundamentales de la cicatrización normal de las heridas (Cuadro 1).

Cuadro 1 Las MMPs en la cicatrización normal de las heridas

Función de las MMPs	Fase principal de la cicatrización
<ul style="list-style-type: none">Eliminación de la MEC dañada y de las bacterias	Inflamación
<ul style="list-style-type: none">Degradación de la membrana basal de los capilares para la angiogénesisMigración de las células epidérmicas	Proliferación
<ul style="list-style-type: none">Contracción de la MEC de la cicatrizRemodelación de la MEC de la cicatriz	Remodelación

Eliminación de la MEC dañada

Las MMPs degradan la MEC dañada que aparece en el borde de la piel de las heridas agudas. Esto permite que las células de la herida sintetizen nuevos componentes de la MEC (p. ej., colágeno, fibronectina y proteoglicanos) para integrarse correctamente con los componentes intactos de la MEC en los bordes de la herida.

Además, las MMPs facilitan el desprendimiento de los biofilms. Los biofilms constan de una matriz gelatinosa producida por bacterias que protege del sistema inmunitario a los microbios. Las MMPs secretadas por las células inflamatorias que rodean a los biofilms digieren (sueltan) las uniones entre los biofilms bacterianos y el lecho de la herida.

Angiogénesis

Las MMPs degradan la membrana basal que rodea los capilares. Esto permite que las células endoteliales vasculares emigren desde los capilares próximos a la herida y produzcan nuevos vasos sanguíneos en el lecho de la herida^{3,4}.

Migración de las células

Las MMPs (especialmente la MMP-1) son necesarias para la migración de las células epiteliales, fibroblastos y células endoteliales vasculares en la MEC o a través de ella. Cuando las células epiteliales del borde de una herida empiezan a proliferar y a migrar como una lámina por el lecho de la herida, las células epiteliales solo se arrastran detrás del borde anterior de la lámina que secreta MMP-1. Definitiva ésta digiere parcialmente el colágeno de tipo 1 y debilita la fijación de las membranas de las células a la matriz permitiendo que las células se muevan por la matriz de colágeno^{2,5,6}.

Contracción

Las MMPs secretadas por los miofibroblastos son necesarias para la contracción de la MEC de la cicatriz recién sintetizada. Las heridas con grandes escisiones en los seres humanos pueden contraerse hasta el 20 % aproximadamente de su superficie inicial^{7,8}.

Remodelación de la cicatriz

La reparación de las heridas cutáneas produce inicialmente una matriz cicatricial extraordinariamente desorganizada. Sin embargo, las células de la herida siguen produciendo pequeñas cantidades de MMPs mucho tiempo después de que se forme la cicatriz inicial. Estas MMPs eliminan lentamente la MEC desorganizada, que es sustituida gradualmente por MEC con una estructura más normal y mucho mejor organizada^{1,9,10}.

¿Por qué producen a veces problemas las MMPs?

Aunque las MMPs tienen la importante función de degradar las proteínas para la formación de nuevos tejidos, cuando estas enzimas están presentes en el lecho de una herida en una cantidad demasiado grande, y durante demasiado tiempo y/o en lugares inadecuados, empiezan a degradar proteínas que no son sus sustratos normales. Esto puede provocar una destrucción de proteínas "desviada de su objetivo", tales como factores de crecimiento, receptores y proteínas de la MEC que son esenciales para la cicatrización,

por lo que ésta resulta alterada.

Se han obtenido pruebas fiables de que las MMPs en general están muy elevadas en las heridas que tardan en cicatrizar en comparación con las heridas de cicatrización rápida¹¹⁻²². Los posibles efectos perjudiciales de estas cantidades elevadas se complican por el hecho de que las concentraciones de los TIMP en las heridas crónicas son en general ligeramente menores que en las heridas agudas.

¿Cómo conocemos los efectos de niveles elevados de MMPs en la cicatrización?

Las proteasas aparecieron en el radar de la cicatrización de las heridas cuando se descubrió que la MEC de las heridas que no cicatrizaban no contenía fibronectina intacta, que es una molécula necesaria para la adherencia celular y la señalización de factores de crecimiento²³. Además, la fibronectina intacta volvía a aparecer en el lecho de la herida cuando esta empezaba a cicatrizar²³.

Otros estudios demostraron que la proteasa elastasa derivada de los neutrófilos era el mayor factor de contribución a la degradación de la fibronectina en heridas que no cicatrizan y que los productos de degradación de la fibronectina estimulan la liberación de MMPs^{24,25}.

Varios grupos de investigación han seguido demostrando que la cantidad de MMP-9 activa es inversamente proporcional a la velocidad de cierre de la herida, es decir, unas concentraciones elevadas de MMP-9 activa se correlacionan con unas menores velocidades de cierre de la herida^{15,19,20}.

Sin embargo, es importante señalar que, aunque la mayoría de las heridas no cicatrizantes de estos estudios tenían una actividad elevada de la MMP-9, no la tenían todas, lo que significaba que una actividad excesiva de MMP-9 es un importante factor de contribución al retraso de la cicatrización, aunque no necesariamente la única causa.

¿De qué otra manera están implicadas las MMPs en el retraso de la cicatrización?

Inhibidores de las proteasas

Es significativo que varias MMPs sean capaces de inactivar el inhibidor de la alfa-1 proteasa (α 1-PI) y la alfa-2 macroglobulina (α ₂M), que son dos inhibidores naturales importantes de las proteasas de la serina (no MMP) elastasa y plasmina. Por ello, unas cantidades elevadas de MMPs en las heridas pueden originar de manera indirecta unas concentraciones elevadas de elastasa (que degrada la elastina, un constituyente fundamental de las fibras de los tejidos elásticos) y de plasmina (que digiere la fibrina, una proteína que se encuentra en los coágulos de sangre).

Citocinas inflamatorias y radicales libres

Una vez activadas en las heridas, las células inflamatorias liberan citocinas (moléculas de señalización entre las células), como el TNF, la IL-1 y la IL-6. Cuando hay una cantidad excesiva, estas citocinas estimulan la producción de cantidades anormalmente grandes de proteasas (incluidas las MMPs) y radicales libres, que alimentan aún más el proceso inflamatorio^{26,27}.

Los radicales libres, como el peróxido de hidrógeno, destruyen las bacterias y limpian la herida. Sin embargo, cuando hay un exceso de radicales libres, pueden producir lesiones tisulares. Se ha implicado a los radicales libres en la aparición y en la persistencia de úlceras venosas, y se ha demostrado que la eliminación de estos radicales mediante antioxidantes mejora la cicatrización de dichas heridas²⁸.

Factores de crecimiento

Muchos investigadores han demostrado que los factores de crecimiento (p. ej., el factor de crecimiento derivado de las plaquetas [PDGF], el factor de crecimiento epidérmico [EGF] y el factor de crecimiento endotelial vascular [VEGF]) incubados en exudados de heridas no cicatrizantes se degradan rápidamente y que esta degradación se puede evitar añadiendo al exudado un inhibidor de las proteasas²⁹⁻³¹. Esto indica que, en las heridas no cicatrizantes, la degradación del factor de crecimiento puede deberse a un exceso de proteasas.

También se ha demostrado que las proteasas de las bacterias degradan rápidamente los factores de crecimiento³². El grado de degradación de estos factores depende del tipo de bacteria, ya que cada especie produce diferentes concentraciones y tipos de proteasas. Esta variación se relaciona con la virulencia de las bacterias y puede explicar por qué ciertas bacterias, incluso en pequeñas cantidades, pueden ser extremadamente perjudiciales para el proceso de cicatrización de las heridas.

Número de células

La degradación de los factores de crecimiento elimina la señal que estimula la proliferación de las células necesarias para la reposición tisular (fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos). De hecho, en estudios in vitro se ha demostrado que el exudado de heridas cicatrizantes estimula

la división celular; por el contrario, el exudado de heridas no cicatrizantes inhibió dicha división^{33,34}.

Grado de carga bacteriana

La respuesta normal del huésped a la contaminación bacteriana de una herida es producir una respuesta inflamatoria que posibilita que las células inflamatorias infiltren y limpien la herida en un esfuerzo por evitar la infección. Sin embargo, si hay un exceso de microorganismos patógenos, estos pueden causar problemas, retrasando inicialmente la cicatrización y produciendo finalmente una infección de la herida³⁵.

Investigaciones recientes han indicado que un elevado porcentaje (en torno al 60%) de heridas con cicatrización retardada tienen biofilms bacterianos y que las bacterias de dichas películas son muy resistentes a la acción lítica de los anticuerpos del huésped, de las células inflamatorias, de los antibióticos y de los antisépticos^{36,38}.

En consecuencia, parece probable que, en muchos casos, las heridas agudas resulten colonizadas por bacterias que se transforman en cuestión de días en biofilms bacterianos persistentes y que constituyan una fuente inflamatoria a largo plazo. Las células inflamatorias activadas en respuesta al biofilm secretan especies reactivas del oxígeno (radicales libres) y proteasas, incluidas las MMPs, con el fin de destruir las bacterias. Desgraciadamente, las proteasas destruyen también los factores procicatrizantes y los componentes de la MEC del lecho de la herida, alterando así el proceso de cicatrización de la herida.

¿Cómo sabemos cuando están produciendo problemas de cicatrización las cantidades elevadas de MMPs?

La capacidad de cicatrización resulta afectada por una amplia variedad de factores intrínsecos y extrínsecos. Por ejemplo, la edad avanzada, los medicamentos (p. ej., esteroides), una mala nutrición, las afecciones concomitantes (p. ej., diabetes, enfermedades venosas y arteriopatías periféricas) y la carga bacteriana de la herida pueden interferir en los procesos de reparación de las heridas³⁹⁻⁴¹.

“El proceso de cicatrización está poderosamente programado y es muy difícil de obstruir, aunque tiene sus enemigos.”⁴²

Con independencia de la causa subyacente del retraso, las heridas con cicatrización retrasada comparten en general características bioquímicas semejantes, tales como^{43,44}:

- **aumento de los marcadores inflamatorios**
- **elevación de las concentraciones de las proteasas, incluidas las MMPs**
- **disminución de la actividad de los factores de crecimiento**
- **reducción del número de células en la herida.**

Tal como se ha descrito, estas características crean un entorno hostil

para la herida en el que se degradan el nuevo tejido y los factores de crecimiento y se cronifica la herida. A las heridas que se encuentran en esta situación se las denomina a menudo como “estancadas” en la fase inflamatoria de la cicatrización, donde pueden permanecer durante meses e incluso años⁴⁵.

Ruptura del círculo vicioso: estimulación de la cicatrización

El tratamiento de un paciente que presenta una herida que no cicatriza exige un enfoque multidisciplinar integrado que actúe sistemáticamente para alterar la fase inflamatoria de la cicatrización. Una buena analogía es decir que la herida está estancada dentro de un círculo vicioso (Figura 2): el profesional tiene que realizar intervenciones para romper este círculo y trasladar la herida a la fase siguiente de la cicatrización.

La ruptura del círculo implica atenuar cualquier factor ambiental, general, local o relacionado con la herida que pudiera contribuir al retraso de la cicatrización. El objetivo global es inclinar la balanza a favor de los procesos de reparación.

En la herida, la ruptura del círculo (Figura 3) y la estimulación de la cicatrización implican lo siguiente:

- el tratamiento de la causa, es decir, la reducción de la inflamación
- el tratamiento de las consecuencias, es decir, la disminución de la actividad de las proteasas al mismo tiempo que se mantiene un entorno húmedo óptimo de la herida.

La reducción del exceso de actividad de las proteasas se centra en la herida y se puede conseguir por medio de:

- la eliminación de las proteasas, por ejemplo, mediante la absorción del líquido de la herida rico en proteasas por el apósito o mediante la eliminación con un tratamiento de presión negativa en la herida
- la reducción de la actividad de las proteasas, por ejemplo, con apósitos con colágeno
- la inhibición de la síntesis de MMPs,

Figura 2 Círculo de Cullen: el círculo vicioso del retraso de cicatrización de las heridas

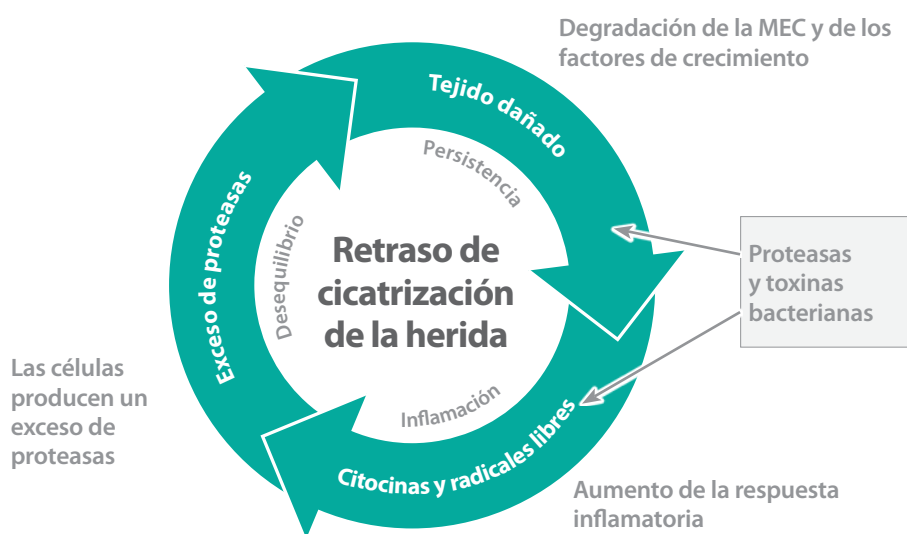
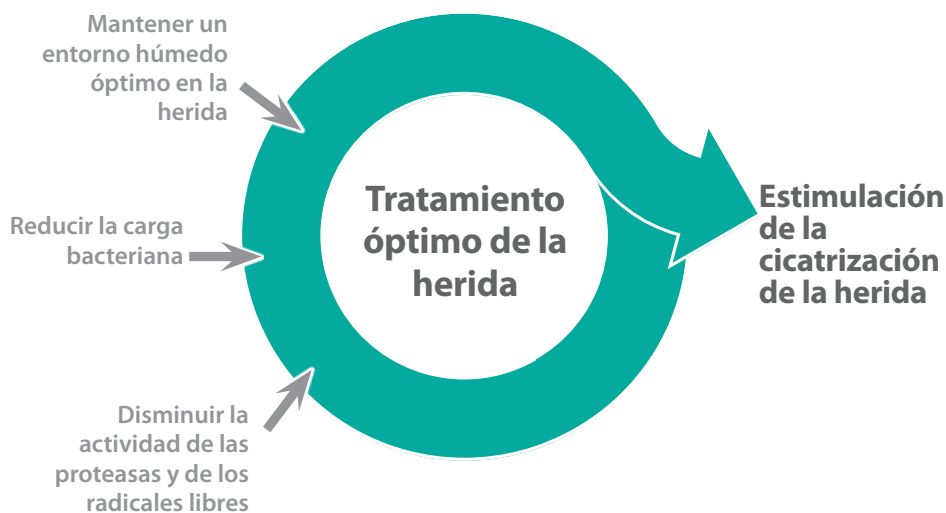


Figura 3 Ruptura del círculo para estimular la cicatrización



por ejemplo, con apósitos que contienen ionógenos polihidratados, que constituyen una estrategia novedosa que está pendiente de una evaluación clínica completa^{46,47}.

En los casos indicados se puede reducir la carga bacteriana con apósitos antimicrobianos (p. ej., con técnicas basadas en la plata o en el yodo) y antibióticos³⁵. Sin embargo, los antibióticos y antimicrobianos son menos eficaces para el tratamiento de las bacterias del biofilm, y la eliminación física por desbridamiento es actualmente el único método que ha demostrado que elimina la carga bacteriana del biofilm.

Apósitos reguladores de las MMPs

En la actualidad se están comercializando varios apósitos como reguladores de la actividad de las proteasas. Se ha demostrado que la reducción del exceso de actividad de las proteasas en la herida conduce a un estado de cicatrización. Los productos diseñados para reducir el exceso de actividad proteolítica y reequilibrar el entorno de la herida necesitan, en condiciones ideales, inactivar las MMPs y otras proteasas derivadas del huésped y de las bacterias.

Parece que la regulación de la actividad de las MMPs se consigue con uno de los tres métodos descritos anteriormente. Sin embargo un número significativo de investigaciones se han centrado en los apósitos que actúan disminuyendo las

cantidades de MMPs por medio de la absorción del exudado de la herida y el mantenimiento de las proteasas dentro de la estructura del apósito. Efectivamente, se une, inactivando el exceso de MMPs presentes en el entorno de la herida.

Se han publicado muchos estudios sobre el primer apósito regulador de MMP (Promogran, que contiene celulosa oxidada regenerada [COR] y colágeno) y últimamente una versión que contiene plata (Promogran Prisma)⁴⁸. Estos demuestran la capacidad de este apósito para reducir la actividad de las proteasas, eliminar los radicales libres y controlar el número de bacterias^{48,49}. Aunque muchos de los estudios iniciales implicaban análisis *in vitro*, estos apósitos se han evaluado clínicamente también, y se ha demostrado que eliminan estos factores negativos de los exudados de las heridas con cicatrización retardada (estudios *ex vivo*)⁵⁰. Estas evaluaciones *ex vivo* tienen importantes ventajas con respecto a los análisis *in vitro*, ya que reflejan con más exactitud la verdadera naturaleza bioquímica de la herida. En un ensayo clínico aleatorizado y controlado se ha demostrado también la capacidad de los apósitos con colágeno y COR para reducir las proteasas y que esta reducción se correlaciona con un efecto positivo en la cicatrización^{51,52}.

Es importante también reconocer que, cuando se desarrollan productos nuevos, como los apósitos reguladores de las proteasas, para corregir un defecto bioquímico específico, es posible que

no sean aplicables en todas las heridas problemáticas sino solo para un subgrupo con ese desequilibrio bioquímico concreto.

Medición de las MMPs

En estos momentos, el profesional no dispone de ningún medio para medir la actividad de las MMPs en los exudados o en las biopsias de las heridas. Hay prototipos de dispositivos en fase de desarrollo. Esperamos que la medición de la actividad de las MMPs aporte una información crucial sobre la trayectoria de la cicatrización de una herida y sobre la idoneidad de la herida para tratamientos biológicos avanzados.

Financiado con una beca docente de Systagenix. Las opiniones expresadas en este apartado de 'Explicado de manera sencilla' no reflejan necesariamente las de Systagenix.

Datos de los autores

Gibson D¹, Cullen B², Legerstee R³, Harding KG⁴, Schultz G⁵.

1. Estudiante, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Florida, Gainesville, Florida, EEUU
2. Director de programas científicos, Systagenix Wound Management, Skipton, Reino Unido
3. Global Marketing Director Professional Education, Systagenix Wound Management, Nimega, Países Bajos
4. Profesor de medicina rehabilitadora (cicatrización de las heridas), Director del Department of Dermatology and Wound Healing, Cardiff University, Cardiff, Reino Unido
5. Profesor, Department of Obstetrics and Gynecology, Institute for Wound Research, University of Florida, Gainesville, Florida, EEUU

Resumen

Es un hecho admitido que las MMPs son necesarias en una cantidad adecuada, en el lugar apropiado y en el marco temporal correcto (duración) para que una herida cicatrice. Desempeñan funciones esenciales en el desbridamiento de la MEC dañada o desvitalizada, la angiogénesis, la reepitelialización, la contracción de la herida y la remodelación de la cicatriz. Sin embargo, hay pruebas clínicas sólidas de que la elevación crónica de las concentraciones de MMPs y otras proteasas impide la cicatrización de las heridas y de que los tratamientos que disminuyen la actividad de las MMPs estimulan la cicatrización de las heridas que se han estancado^{53,55}.

Para citar esta publicación

Gibson D, Cullen B, Legerstee R, Harding KG, Schultz G. MMP made easy. *Wounds International* 2009; 1(1): Disponible en <http://www.woundsinternational.com>

Bibliografia

1. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(3): 221-33.
2. Parks WC. Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair Regen* 1999; 7(6): 423-32.
3. Sang QX. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res* 1998; 8(3): 171-77.
4. Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 1999; 103: 1237-41.
5. Pilcher K, Dumin KA, Sudbeck BD, et al. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol* 1997; 137(6): 1445-57.
6. Pilcher BK, Sudbeck BD, Dumin JA, et al. Collagenase-1 and collagen in epidermal repair. *Arch Dermatol Res* 1998; 290: 537-546.
7. Scott KA, Wood EJ, Karran EH. A matrix metalloproteinase inhibitor which prevents fibroblast-mediated collagen lattice contraction. *FEBS Lett* 1998; 441(1): 137-40.
8. Daniels JT, Cambrey AD, Occlleston NL, et al. Matrix metalloproteinase inhibition modulates fibroblast-mediated matrix contraction and collagen production in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(3): 1104-10.
9. Ulrich D, Ulrich F, Unglaub F, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with different types of scars and keloids. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2009; in press.
10. Dasu MR, Hawkins HK, Barrow RE, et al. Gene expression profiles from hypertrophic scar fibroblasts before and after IL-6 stimulation. *J Pathol* 2004; 202(4): 476-85.
11. 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(1): 64-68.
12. Weckroth M, Vaheri A, Lauharanta J, et al. Matrix metalloproteinases, gelatinase and collagenase, in chronic leg ulcers. *J Invest Dermatol* 1996; 106(5): 1119-24.
13. Yager DR, Zhang LY, Liang HX, et al. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermatol* 1996; 107(5): 743-48.
14. Trengove NJ, Stacey MC, MacAuley S, et al. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen* 1999; 7(6): 442-52.
15. Ladwig GP, Robson MC, Liu R, et al. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 2002; 10(1): 26-37.
16. Norgauer J, Hildenbrand Y, Idzko M, et al. Elevated expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) and membrane-type matrix metalloproteinases in venous leg ulcers. *Br J Dermatol* 2002; 147(6): 1180-86.
17. Pirilä E, Korpi JT, Korkiamäki T, et al. Collagenase-2 (MMP-8) and matrilysin-2 (MMP-26) expression in human wounds of different etiologies. *Wound Repair Regen* 2007; 15(1): 47-57.
18. Muller M, Trocme C, Lardy B, et al. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet Med* 2008; 25(4): 419-26.
19. 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; 158(5): 951-61.
20. Liu Y, Min D, Bolton T, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2009; 32(1): 117-19.
21. Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, et al. Multiplexed analysis of matrix metalloproteinases in leg ulcer tissue of patients with chronic venous insufficiency before and after compression therapy. *Wound Repair Regen* 2008; 16(5): 642-48.
22. Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, et al. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia* 2002; 45(7): 1011-16.
23. Herrick SE, Sloan P, McGurk M, et al. Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers. *Am J Pathol* 1992; 141(5): 1085-95.
24. Grinnell F, Zhu M. Identification of neutrophil elastase as the proteinase in burn wound fluid responsible for degradation of fibronectin. *J Invest Dermatol* 1994; 103(2): 155-61.
25. Grinnell F, Zhu M. Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase, alpha1-proteinase inhibitor, and alpha2-macroglobulin. *J Invest Dermatol* 1996; 106(2): 335-41.
26. Tarnuzzer RW, Schultz GS. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen* 1996; 4(3): 321-25.
27. Quatresooz P, Henry F, Paquet P, et al. Deciphering the impaired cytokine cascades in chronic leg ulcers (review). *Int J Mol Med* 2003; 11(4): 411-18.
28. Salim AS. The role of oxygen-derived free radicals in the management of venous (varicose) ulceration: a new approach. *World J Surg* 1991; 15(2): 264-69.
29. Chen SM, Ward SI, Oluyinka O, et al. Ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors is associated with increased levels of elastase activity and diminished levels of proteinase inhibitors. *Wound Repair Regen* 1997; 5(1): 23-32.
30. Wlaschek M, Peus D, Achterberg V, et al. Protease inhibitors protect growth factor activity in chronic wounds. *Br J Dermatol* 1997; 137(4): 646-47.
31. Clark R, Cullen B, McCulloch E, et al. A novel biomaterial that protects endogenous growth factors from proteolytic degradation. *Wound Repair Regen* 2001; 9(5): 406.
32. Gregory S, Boyle J, Rennison T, Cullen B. An ORC/ Collagen Matrix containing silver preserves wound healing growth factors from host and bacterial proteolytic degradation. *Wound Repair Regen* 2005; 13(2): A23.
33. Alper JC, Tibbetts LL, Sarazan AA. The in vitro response of fibroblasts to the fluid that accumulates under a vapour-permeable membrane. *J Invest Dermatol* 1985; 84(6): 513-15.
34. Bucalo B, Eaglstein WH, Falanga V. Inhibition of cell proliferation by chronic wound fluid. *Wound Repair Regen* 1993; 1(3): 181-86.
35. World Union of Wound Healing Societies (WUWHS). *Principles of best practice: Wound infection in clinical practice. An international consensus.* London: MEP Ltd, 2008.
36. James GA, Swogger E, Wolcott R, et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1): 37-44.
37. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-322.
38. Costerton JW, Stewart PS. Battling biofilms. *Sci Am* 2001; 285: 74-81.
39. Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, et al. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 2004; 3(4): 161-67.
40. Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MW. Aging alters the inflammatory and endothelial cell adhesion molecule profiles during human cutaneous wound healing. *Lab Invest* 1998; 78(1): 47-58.
41. Loots MA, Lamme EN, Zeegelaar J, et al. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol* 1998; 111(5): 850-57.
42. Majno G, Joris I. *Cells, tissues and disease: principles of general pathology.* OUP USA, 2004.
43. Chen WY, Rogers AA. Recent insights into the causes of chronic leg ulceration in venous diseases and implications on other types of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2007; 15(4): 434-49.
44. Harris IR, Yee KC, Walters CE, et al. Cytokine and protease levels in healing and non-healing chronic venous leg ulcers. *Exp Dermatol* 1995; 4(6): 342-49.
45. Falanga V, Grinnell F, Gilchrist B, et al. Workshop on the pathogenesis of chronic wounds. *J Invest Dermatol* 1994; 102(2): 125-27.
46. Monroe S, Schultz G. Effect of polyhydrated ionogen (PHI) on viability and matrix metalloproteinase levels in medium of cultured cells. *Wound Repair Regen* 2008; 13(2): A4-A27.
47. Pirayesh A, Dessy LA, Rogge FJ, et al. The efficacy of a polyhydrated ionogen impregnated dressing in the treatment of recalcitrant diabetic foot ulcers: a multi-centre pilot study. *Acta Chir Belg* 2007; 107(6): 675-81.
48. Cullen B, Watt PW, Lundqvist C, et al. The role of oxidized regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34(12): 1544-56.
49. Hart J, Silcock D, Gunnigle S, et al. The role of oxidized regenerated cellulose/collagen in wound repair: effects in vitro on fibroblast biology and in vivo in a model of compromised healing. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34(12): 1557-70.
50. Cullen B, Smith R, McCulloch E, et al. Mechanism of action of PROMOGRAN, a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen* 2002; 10(1): 16-25.
51. Smeets R, Ulrich D, Unglaub F, et al. Effect of oxidized regenerated cellulose/collagen matrix on proteases in wound exudate of patients with chronic venous ulceration. *Int Wound J* 2008; 5(2): 195-203.
52. Cullen B, Kemp L, Essler L, et al. Rebalancing wound biochemistry improves healing: a clinical study examining effect of PROMOGRAN. *Wound Repair Regen* 2004; 12(2): A4.
53. Veves A, Sheehan P, Pham HT. A randomized, controlled trial of Promogran (a collagen/oxidized regenerated cellulose dressing) vs standard treatment in the management of diabetic foot ulcers. *Arch Surg* 2002; 137(7): 822-27.
54. Cullen B. The role of oxidized regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair. Part 2. *Ostomy Wound Manage* 2002; 48(6 Suppl): 8-13.
55. Lobmann R, Zemlin C, Motzkau M, et al. Expression of matrix metalloproteinases and growth factors in diabetic foot wounds treated with a protease absorbent dressing. *J Diabetes Complications* 2006; 20(5): 329-35.