

Proces cijeljenja rane i dipeptidil-peptidaza IV

Wound healing process and dipeptidyl peptidase IV

Lara Batičić Pučar^{1*}, Antonijo Grčić², Ester Pernjak Pugel³, Dijana Detel¹, Jadranka Varljen¹

¹Zavod za kemiju i biokemiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

²Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

³Zavod za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

Sažetak. Cijeljenje rane dinamičan je proces koji se odvija u više međuovisnih faza koje uključuju reguliranu interakciju među različitim vrstama stanica, izvanstaničnog matriksa, proteaza i njihovih supstrata. Rastući znanstveni dokazi naglašavaju važnost proteaza u regulaciji ključnih procesa cijeljenja rane. Dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26, EC 3.4.14.5), glavni je član obitelji DPP IV proteina. Riječ je o ubikvitarnom multifunkcionalnom transmembranskom glikoproteinu koji je prisutan i u topljivom obliku, a djeluje kao proteolitička i kostimulacijska molekula te vezni protein. Izražena je na površini različitih vrsta stanica, uključujući epitelne, endotelne stanice i limfocite. Pokazano je da ima značajnu ulogu u različitim fiziološkim i patološkim procesima. DPP IV/CD26 je u velikoj mjeri istraživana zbog svoje sposobnosti održavanja homeostaze glukoze. Štoviše, budući na utvrđene pozitivne učinke inhibicije DPP IV/CD26 u cijeljenju kroničnih dijabetičkih ulkusa, kao i uključenosti u drugim patološkim procesima, ova je molekula od rastućeg znanstvenog interesa u cilju razjašnjavanja mehanizama njezinog djelovanja. Poznato je da DPP IV/CD26 sudjeluje u regulaciji stanične adhezije, migracije i apoptoze stanica kao i angiogenezi te razgradnji ekstracelularnog matriksa, ključnim procesima u cijeljenju rana. Prethodne studije pokazale su da DPP IV/CD26 ima posebno važnu ulogu u regeneraciji kože, gdje je utvrđeno da može posredovati upalne procese i utjecati na epitelizaciju ranjenog tkiva. Stoga je cilj ovog preglednog rada sažeti ključna otkrića u procesima cijeljenja rana te prikazati nove spoznaje o ulozi DPP IV/CD26 u procesima regeneracije tkiva.

Ključne riječi: angiogeneza; CD26; cijeljenje rane; dipeptidil-peptidaza IV

Abstract. Wound healing is a dynamic process occurring in multiple interdependent stages that include a regulated interaction between different cell types, extracellular matrix, proteases and their substrates. Increasing scientific evidence emphasizes the importance of proteases playing crucial roles in the regulation of processes of wound healing. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26, EC 3.4.14.5), the main member of the DPP IV family of proteins, is a ubiquitous multifunctional transmembrane as well as soluble glycoprotein, acting as a proteolytic and costimulation molecule, and binding protein. It is expressed on the surface different cell types, including epithelial, endothelial cells and lymphocytes. It has been shown to play a significant role in different physiological as well as pathological processes. DPP IV/CD26 was largely investigated given its ability to maintain glucose homeostasis. Moreover, since positive effects of DPP IV/CD26 inhibition in healing of chronic diabetic foot ulcers as well as other pathologies have been shown, growing efforts are made in order to elucidate its mechanisms of action. It is known that DPP IV/CD26 is involved in the regulation of cell adhesion, migration, apoptosis, angiogenesis and extracellular matrix degradation, which are all key processes in wound healing. Previous studies indicated that DPP IV/CD26 plays a particularly relevant role in skin regeneration where it was found to mediate inflammatory processes and influence epithelialization of wounds. Therefore, the aim of this review was to summarize crucial findings regarding wound healing as well as new insights about the involvement of DPP IV/CD26 in tissue regeneration.

Key words: angiogenesis; CD26; dipeptidyl peptidase IV; wound healing

*** Dopisni autor:**

Doc. dr. sc. Lara Batičić Pučar
Zavod za kemiju i biokemiju
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka
e-mail: lara.baticic@medri.uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

KOŽA I PROCES CIJELJENJA RANA

Koža (*cutis*) najveći je i najteži organ ljudskog tijela u neposrednom kontaktu s okolinom. Sastoji se od površnog sloja – *epidermisa* i dubljeg sloja – *dermisa* ili *coriuma*, dok je slojem potkožja – *subcutisa* povezana s podlogom¹. *Epidermis* je čvrsti, epitelni sloj koji je izravno izložen djelovanju okoliša, dok je *corium* podijeljen na površni papilarni sloj rahlog vezivnog tkiva i dublji retikularni sloj gustog neformiranog veziva. Kao posljedica ozljede kože, unutar slojeva dolazi do interakcije između površnih epitelних stanica, vezivnih stanica *coriuma*, kao i upalnih stanica te njihovih produkata, čime započinje složen proces cijeljenja rana prilikom kojeg se odvijaju različite biokemijske i imunostne reakcije koje omogućuju oporavak oštećenog tkiva^{2,3}.

Proces cijeljenja rana koje zahvaćaju i *epidermis* i *dermis* odvija se u nekoliko vremenski ovisnih faza (slika 1). U najranijem periodu dolazi do stvaranja krvnog ugruška, odnosno do uspostave hemostaze (nulta faza), nakon čega započinje upalna faza (faza I). Na upalnu fazu nastavlja se faza proliferacije (faza II) tijekom koje se ponovno uspostavlja barijera kože, koju slijedi faza sazrijevanja, odnosno remodeliranja (faza III) tijekom koje dolazi do oporavka tkiva kože i nastanka ožiljka. S obzirom na to da su sve faze cijeljenja rana vremenski ovisne i međusobno se djelomično preklapaju, prekid ili produženje jedne od faza može imati negativne posljedice na uspješnost cijelog procesa cijeljenja^{3,4}.

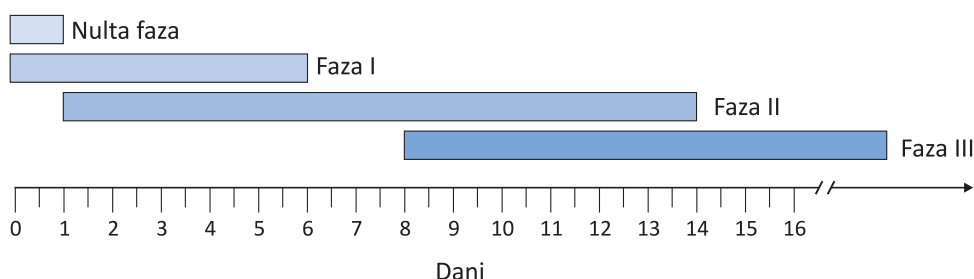
Hemostaza i upalna faza

Neposredno nakon oštećenja kože, na mjestu nastalog defekta tkiva, započinje uspostavljanje hemostaze (nulte faze). Zbog narušene strukture krvnih žila na mjesto oštećenja dolazi do povećanog priljeva trombocita i njihovog kontakta s kolagenom i drugim tvarima prisutnima u ekstracelularnom matriksu koriuma. Taj kontakt potiče trombocite u oslobađanju faktora zgrušavanja te dolazi do njihove agregacije, što naposljetku omogućava nastanak krvnog ugruška. Krvni ugru-

Kao posljedica ozljede kože, unutar njenih slojeva dolazi do međudjelovanja između epitelnih stanica, vezivnih stanica *coriuma*, kao i upalnih stanica te njihovih produkata. Time započinje složen proces cijeljenja rana prilikom kojeg se odvijaju različite biokemijske i imunostne reakcije koje omogućuju oporavak oštećenog tkiva.

šak ili fibrinski ugrušak sastoji se od mreže fibrina i proteina ekstracelularnog matriksa (fibronektin, vetronektin, trombospodin), a osnovna uloga mu je zaustavljanje krvarenja i zaštita rane od štetnog djelovanja mikroorganizama. Osim toga, krvni ugrušak predstavlja pripremni matriks za migraciju upalnih stanica te rezervoar faktora rasta koji su neophodni u daljnjim fazama reparacije i regeneracije tkiva^{5,6}.

Degranulacijom trombocita oslobađaju se faktori rasta kao što su: EGF (engl. *epidermal growth factor*), PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*) i TGF- β (engl. *transforming growth factor- β*).



Nulta faza - hemostaza: agregacija i degranulacija trombocita, stvaranje krvnog ugruška

Faza I - upalna faza: migracija neutrofila, migracija monocita i diferencijacija u makrofage, migracija limfocita

Faza II - proliferacijska faza: reepitelizacija, fibroplazija, angiogeneza, stvaranje ekstracelularnog matriksa

Faza III - faza sazrijevanja (remodeliranja): remodeliranje ekstracelularnog matriksa, remodeliranje kolagena

Slika 1. Shematski prikaz faza procesa cijeljenja rane

Uloga navedenih faktora jest poticanje migracije upalnih stanica u područje rane, čime započinje upalna faza (faza I). PDGF zajedno s proupalnim citokinima, kao što je interleukin-1 (IL-1) potiče kemotaksiju neutrofila koji su među prvim stanicama koje dolaze u područje rane. Neutrofilima imaju ključnu ulogu u uklanjanju mikroorganizama, stranih čestica i oštećenog tkiva te je njihova fagocitorna aktivnost ključna za normalno odvijanje cijeljenja rana. Njihova aktivnost se postupno smanjuje tijekom faze I te se zamjenjuju monocitima koje mobilizira TGF- β prisutan u području rane. Monociti se zatim diferenciraju u makrofage koji nastavljaju fagocitozu preostalih mikroorganizama te drugih propalih stanica i ostataka tkiva. Makrofazi tijekom svoje aktivnosti otpuštaju razne prouplane citokine kao što su IL-1 i IL-6 te faktor rasta FGF (engl. *fibroblast growth factor*), kao i EGF, TGF- β i PDGF⁷. Pri kraju faze I, djelovanjem IL-1 dolazi do migracije limfocita T koji imaju značajnu ulogu tijekom daljnjih faza cijeljenja rana. Aktivirani limfociti T svojim faktorima izazivaju vazodilataciju i povećavaju propusnost krvnih žila te modeliraju funkciju fibroblasta, što je od velike važnosti za fazu II. Osim toga, limfociti T utječu i na sintezu kolagena tijekom faze II i III^{8,9}.

Smirivanjem upalne faze smanjuje se lučenje citokina i faktora rasta pa se time smanjuje i broj neutrofila koji se zamjenjuju makrofazima koji koordiniraju ulaz u proliferacijsku fazu (fazu II). Karakteristika upalne faze prije svega je sprječavanje infekcije, zatim čišćenje rane i aktivacija događaja vezanih za fazu II¹⁰.

Proliferacijska faza

Proliferacijsku fazu (fazu II) obilježavaju procesi reepitelizacije oštećenog epidermisa (proces zatvaranja rane), fibroplazije (sinteza kolagena) i angiogeneze (stvaranje novih krvnih žila) u području koriuma. Svi su ovi procesi regulirani faktorima rasta kao što su FGF, TGF- β , PDGF i VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*)¹¹.

Članovi obitelji TGF- β jesu TGF- β 1-3, BMP (engl. *bone morphogenic protein*) i aktivin. TGF- β 1 najzastupljeniji je u koži te ima bitnu ulogu u procesu cijeljenja rana. Tijekom faze II, trombociti, makrofazi, fibroblasti i keratinociti izlučuju TGF- β 1 koji posljedično utječe na reepitelizaciju, fibroplaziju i angio-

genezu⁷. TGF- β 1 glavni je kontrolni signal za stimulaciju fibroblasta i regulaciju njegovih funkcija. Nadalje, TGF- β 1 djeluje na povećanje sinteze kolagena, elastina, proteoglikana i fibronektina. Također, smanjuje sekreciju proteaza i stimulira tkivni inhibitor metaloproteinaza (TIMP, engl. *tissue inhibitor of metal protease*)⁶.

Kako bi se procesi u fazi II odvijali nesmetano, fibroblasti stvaraju ekstracelularni matriks koji je potreban za rast stanica i za formiranje granulacijskog tkiva koje će nadalje omogućiti stvaranje novih krvnih žila i zatvaranje rane^{10,11}. Druga uloga fibroblasta je u pojačanoj sintezi kolagena, što je od izuzetnog značaja tijekom procesa cijeljenja rana i u nastanku ožiljkastog tkiva. Najprije dolazi do sinteze kolagena tipa II koji je potreban u fazi II, a zatim kolagena tipa I koji je važan u fazi remodeliranja^{6,12}. TGF- β 1 i PDGF će također potaknuti pretvorbu fibroblasta u miofibroblaste koji olakšavaju zatvaranje rane⁷. Zbog velike metaboličke aktivnosti u fazi II dolazi do sve veće potrebe za kisikom i hranjivim tvarima, odnosno dobrim dotokom krvi⁶. Na taj način, uz povećanu metaboličku potrebu i uvjeti hipoksije u području rane zbog narušene vaskularizacije predstavljaju snažan poticaj za angiogenezu¹³.

Zbog niske koncentracije kisika dolazi do aktivacije glavnog transkripcijskog faktora, hipoksijom-induciranog čimbenika – HIF (engl. *hypoxia-inducible factor*). HIF je heterodimerni protein koji se sastoji od α i β podjedinice. U uvjetima hipoksije najvažniju ulogu ima HIF- α . Članovi obitelji HIF- α su: HIF-1 α , HIF-2 α i HIF-3 α ^{14,15}. Od navedenih članova, jedino HIF-1 α ima važnu ulogu u procesu cijeljenja rana regulirajući lučenje faktora rasta kao što su VEGF i TGF- β koji stimuliraju proliferaciju i migraciju stanica¹⁶.

Sintezu VEGF-a regulira potičući njegovu transkripciju u uvjetima hipoksije. Njegovu aktivnost regulira IL-1 i TNF- α (engl. *tumor necrosis factor- α*) koji se nalaze u rani. Na ovaj način je osiguran mehanizam sinteze VEGF-a, važnog regulatora procesa angiogeneze^{11,17}.

Članovi obitelji VEGF su VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E te PLGF (engl. *placenta growth factor*). Navedeni se faktori rasta povezuju s tri različita transmembranska receptora tirozin-kinaze koji se označavaju sa VEGF-R1, VEGF-R2 i VEGF-R3. Navedeni receptori su izraženi na sti-

jenkama krvnih žila u granulacijskom tkivu. Najbolje je proučena biološka uloga VEGF-A i njegovih receptora VEGF-R1 i VEGF-R2. VEGF-A proizvode endotelne stanice, fibroblasti, keratinociti, glatke mišićne stanice, trombociti, neutrofil i makrofazi. Nakon nastalog oštećenja tkiva, VEGF-A se oslobađa iz prisutnih trombocita, a zatim ga otpuštaju makrofazi potaknuti i prisutnošću TNF- α . Osim toga, TNF- α potiče daljnje lučenje VEGF-A iz keratinocita i fibroblasta zajedno s drugim citokinima i faktorima rasta koji poboljšavaju njegov izražaj. No najveći poticaj za ekspresiju VEGF-A je hipoksija nastala zbog metaboličkih poremećaja u rani. Oslobađanje VEGF-A predstavlja početak procesa angiogeneze radi njegovog utjecaja na dijeljenje i migraciju endotelnih stanica te ponovnu uspostavu mikrocirkulacije, čime se rana opskrbljuje kisikom i hranjivim tvarima i čime se potiče njeno cijeljenje^{5,7,18}.

Faza sazrijevanja (remodeliranje)

Završna faza cijeljenja rana jest faza sazrijevanja, odnosno remodeliranja (faza III), u kojoj dolazi do potpune normalizacije epitelnog sloja kože i do formiranja novog tkiva i nastanka ožiljka u području koriuma. Remodeliranje rane dobro je kontrolirano mehanizmima kojim se održava osjetljiva ravnoteža između razgradnje i sinteze. U ovoj fazi dolazi do remodeliranja ekstracelularnog matriksa. Unutar matriksa nalaze se vlaknasti strukturni proteini kao što su kolagen i elastin. Kolagen tipa III nastao tijekom proliferacijske faze zamjenjuje se tijekom remodeliranja kolagenom tipa I koji je fiziološki građevni element zdrave kože. Organizacijom, odnosno remodeliranjem vlakana kolagena tipa I stvaraju se snopovi koji mogu vratiti do oko 80 % izvorne čvrstoće tkiva. Čvrstoća snopova kolagena postiže se stvaranjem kovalentnih veza između vlakana, što je potaknuto većom koncentracijom askorbinske kiseline (vitamina C). Elastin, odnosno elastična vlakna koja izlučuju fibroblasti tijekom procesa cijeljenja, u fazi remodeliranja preuzimaju svoju osnovnu ulogu u vraćanju elastičnosti vezivnom sloju kože i stijenkama krvnih žila. Tijekom ove faze također dolazi i do apoptoze različitih tipova stanica mobiliziranih u područje rane tijekom ranijeg perioda cijeljenja. S vremenom se rast krvnih žila zaustavlja, što dovodi do smanjenog protoka krvi

i ujedno do smanjenja metaboličke aktivnosti u području ožiljka. Rezultat ove faze jest potpuno sazrijevanje ožiljka sa smanjenim brojem stanica i krvnih žila te visokom čvrstoćom. Za razliku od ostalih, ova se faza cijeljenja može produžiti, stoga može trajati nekoliko tjedana ili čak godina^{12,19,20}.

Značaj proteaza u procesu cijeljenja rana

Tri su glavne grupe endoproteaza koje imaju važnu ulogu u procesima angiogeneze, remodeliranja ekstracelularnog matriksa, migraciji stanica te

Poznato je da DPP IV/CD26 sudjeluje u regulaciji stanične adhezije, migracije i apoptoze stanica te angiogenezi i razgradnji ekstracelularnog matriksa, ključnim procesima u cijeljenju rana. Prethodne studije pokazale su da DPP IV/CD26 ima važnu ulogu u regeneraciji kože, gdje može djelovati kao upalni medijator i utjecati na epitelizaciju ranjenog tkiva.

oslobađanju i modificiranju faktora rasta. To su metaloproteaze (osobito MMP, engl. *matrix metalloproteinases*), katepsin-cistein proteaze i serinske proteaze. Navedene proteaze djeluju na površini stanica jer sadrže domenu vezanu za staničnu površinu ili je njihovo djelovanje rezultat interakcije sa specifičnim receptorima na površini stanica. Metaloproteaze imaju ulogu u migraciji i invaziji stanica te reguliraju rast stanica. Osim toga, djeluju na proces angiogeneze i remodeliranja tkiva tijekom procesa cijeljenja rana. Ovi su enzimi regulirani inhibitorom proteaza TIMP-om. Djelovanjem TIMP-a smanjuje se njihov angiogeni učinak te se time usporava ili gotovo zaustavlja proces angiogeneze. Također, TIMP može utjecati na angiogenezu tako što blokira vezanje VEGF-a za svoj receptor. Katepsin-cistein proteaze imaju ulogu u obradi antigena pomoću limfocita T, u staničnoj invaziji, remodeliranju ekstracelularnog matriksa, apoptozi stanica, a utječu i na proces angiogeneze²¹.

U serinske proteaze ubrajamo velik broj proteaza različitih funkcija. Bitnu ulogu u procesu cijeljenja rana imaju članovi serinske obitelji proteaza, tj. obitelj DPP IV proteina. Članovi obitelji DPP IV proteina su dipeptidil-peptidaza IV, odnosno molekula CD26 (DPP IV/CD26), protein aktivacije fi-

broblasta FAP (engl. *fibroblast activation protein*) te dipeptidil-peptidaza 8 i 9 (DPP8 i DPP9)²². Istraživanja su pokazala da DPP IV/CD26 ima ulogu u procesu cijeljenja rana tako što utječe na proliferaciju, migraciju i preživljavanje stanica te na proces angiogeneze²³.

OBITELJ DPP IV PROTEINA

Obitelj DPP IV proteina je podgrupa (S9B) velike obitelji prolil-oligopeptidaza (POP). DPP IV/CD26, FAP, DPP8 i DPP9 su prolil-specifične dipeptidil-peptidaze koje sudjeluju u regulaciji različitih biokemijskih procesa putem hidrolize N-terminalnih dipeptida iz proteinskih lanaca s prolinom na pretposljednem mjestu u aminokiselinskoj sekvenci, odnosno u primarnoj strukturi proteina²⁴. Osim navedenih proteina, u obitelj DPP IV proteina ubrajamo i DLP1 i DLP2 koji nisu enzimski aktivni²⁵.

FAP ima 52 % sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci s DPP IV/CD26 i sadrži 760 aminokiselina. Humani gen za FAP je smješten u neposrednoj blizini gena za DPP IV/CD26 (2q24.3). Njegova enzimska aktivnost ovisi o dimerizaciji kao što je slučaj i kod DPP IV/CD26²⁵. Osim što ima sličnu dipeptidil-peptidaznu aktivnost kao DPP IV/CD26, također ima i endopeptidaznu sposobnost, odnosno gelatinaznu aktivnost. Ta aktivnost mu omogućuje razgradnju denaturiranog kolagena tipa I i III te mu se zbog toga pripisuje mogućnost regulacije izvanstaničnog matriksa tumorskog mikrookoliša. FAP je izražen na stanicama koje ulaze u procese remodeliranja i regeneracije, a najveći izražaj, oko 90 %, dokazan je na stanicama humanih epitelnih karcinoma^{22,24,26}.

DPP8 i DPP9 pokazuju sličnu dipeptidil-peptidaznu aktivnost kao DPP IV/CD26. Imaju 26 % sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci s DPP IV/CD26 i FAP-om, a međusobno dijele 61 % sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci. Proteinski lanac DPP8 sadrži 882 aminokiseline, dok DPP9 863.

Humani gen za DPP8 smješten je na kromosomu 15q22.32, a za DPP9 na kromosomu 19q13.3. Za razliku od DPP IV/CD26 i FAP, DPP8 i DPP9 su topljivi citoplazmatski proteini²⁵. Poznato je da i DPP8 i DPP9 također imaju ulogu u procesu cijeljenja rana, što je utvrđeno u *in vitro* uvjetima: DPP8 i DPP9 imaju ulogu u migraciji i apoptozi

stanica, dok DPP9 utječe i na adheziju i proliferaciju stanica²², no točni mehanizmi njihovog djelovanja nisu razjašnjeni.

Dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26)

Dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26; EC 3.4.14.5) serinska je proteaza stanične površine koja pripada obitelji DPP IV proteina. Selektivno cijepa N-terminalne dipeptide iz proteinskih lanaca s prolinom ili alaninom na pretposljednem mjestu u aminokiselinskoj sekvenci²⁷. Prvi put je identificirana 1966. godine, kada su V. K. Hopsu-Havu i G. G. Glenner otkrili novi enzim histokemijskim ispitivanjima u bubregu štakora, a zatim poslije i u jetri štakora, u bubregu psa i u mnogim drugim tkivima. U to vrijeme bila je poznata kao glicil-prolin- β -naftilamidaza (Gly-Pro-Na) koja je cijepala vezu između glicina i prolina te pritom otpuštala naftilamin iz Gly-Pro- β -naftilamida. Nešto kasnije utvrdilo se da je Gly-Pro- β -naftilamidaza zapravo nova dipeptidil-peptidaza i danas je poznata kao dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26)²⁸.

Primarna struktura DPP IV/CD26 prvi put određena je na temelju kloniranja i sekvencioniranja štakorske cDNA 1989. godine²⁹. Zatim je 1990. godine otkriveno da je površinski antigen CD26 timocita i limfocita T identičan s dipeptidil-peptidazom IV³⁰, a 1992. godine je izolirana i sekvencirana cDNA koja kodira humani DPP IV/CD26 koji predstavlja transmembranski glikoprotein tipa II molekulske mase 110 kDa³¹. Humani gen za DPP IV/CD26 smješten je na dužem kraku drugog kromosoma (2q24.2), koji je približne duljine 82 kb i sadrži 26 egzona koji su rasponu veličine od 45 pb do 1,4 kb³². Transkripcijom se prepisuju svih 26 egzona u mRNA koja na 5' kraju ne sadrži TATA box ni CAAT box, nego ima područje veličine oko 300 bp koje je bogato citozinom i gvaninom (72 %) pa to predstavlja potencijalno mjesto za vezanje nekih transkripcijskih faktora (NK κ B, AP2 i Sp1)³³. DPP IV/CD26 sadrži 766 aminokiselina, od kojih 22 aminokiseline (VLLGLLGAAALVTIITV-PVLL) otpadaju na transmembransku hidrofobnu domenu, na koju se nastavlja kratak intracelularni, hidrofilni ostatak sastavljen od svega 6 aminokiselina (MKTPWK) na N-terminalnom kraju proteinskog lanca, a preostalih 738 aminokiselinskih ostataka sadržava devet potencijalnih N-glikozilacijskih mjesta²⁶.

U organizmu se DPP IV/CD26 nalazi u membranskom i topljivom obliku. Membranski oblik je izražen na površini stanice, dok se topljivi oblik nalazi u plazmi i drugim tjelesnim tekućinama. DPP IV/CD26 je izražena na određenim skupinama limfocita T te na drugim stanicama u različitim tkivima, kao što su endotelne i epitelne stanice³⁴. Također je opisano da DPP IV/CD26 pokazuje interakciju s različitim proteinima, pa je tako 1985. godine dokazano da DPP IV/CD26 služi kao receptor za kolagen i fibronektin³⁵. Zatim je 1993. godine dokazano nastajanje kompleksa između DPP IV/CD26 i adenzin-deaminaze (ADA)³⁶, a 2001. godine povezivanje DPP IV/CD26 s tirozin-fosfatom (CD45)³⁷.

Strukturna građa DPP IV/CD26

DPP IV/CD26 najčešće se u organizmu nalazi u obliku dimera koji je sastavljen od dvije jedinice monomera, a svaki monomer sadrži dvije podjedinice; na C-terminalnom kraju se nalazi α/β -hidrolazna domena, a na N-terminalnom kraju se nalazi β -propelerna domena. α/β -hidrolazna domena građena je od osam β -nabranih ploča (šest paralelnih i dva antiparalelna lanca) koje čine središnju β -nabrano ploču povezanu s nekoliko α -uzvojnica. Unutar α/β -hidrolazne domene nalazi se jedan disulfidni most između Cys-649 i Cys-762 koji je umrežen s C-terminalnom α -uzvojnicom (veza između Met-764 i Ser-764). Ovaj način povezivanja β -nabrane ploče i α -uzvojnice pridonosi stabilizaciji terciarne strukture. Ova domena je sinonim za katalitičku domenu jer se u njoj nalazi aktivno mjesto DPP IV/CD26 s reaktivnim skupinama sljedećih aminokiselina: Ser-630, His-740 i Asp-708³⁸. Ove aminokiseline čine katalitičku trijadu aktivnog mjesta³². U α/β -hidrolaznoj domeni nalazi se tirozinski ostatak koji je nužan za katalitičku aktivnost DPP IV/CD26, a danja istraživanja su pokazala da također sudjeluje u stabilizaciji intermedijarnih oblika supstrata³⁹.

β -propelerna domena sastoji se od osam ploča, a svaka ploča sastoji se od četiri antiparalelna lanca β -nabrane ploče. Ova domena ima ljevkašti oblik jer β -nabrane ploče stvaraju tunele koji se protežu kroz domenu do aktivnog mjesta⁴⁰. Funkcija ove domene jest da kontrolira pristup aktivnom mjestu tako što pokriva to mjesto i time ograniča-

va pristup supstratu. Do aktivnog mjesta je moguće doći kroz tunel β -propelera ili kroz prolaz s bočne strane (bočni otvor). Supstrat se razgrađuje kada dođe u aktivno mjesto, a nastali produkt napušta to mjesto da pritom ulazni i izlazni put nisu jednaki. Na β -propelernoj domeni nalaze se devet potencijalnih N-glikozilacijskih mjesta u blizini područja dimerizacije³⁸. U glikozilacijskoj regiji nalaze se glukonske kiseline Glu205 i Glu206 koje su neophodne za aktivnost DPP IV/CD26⁴¹. Za dimerizaciju je 1982. godine utvrđeno da je preduvjet za enzimsku aktivnost⁴², a otkrivena kristalna struktura DPP IV/CD26 pokazala je da dimerizacija nije samo nužna za oblikovanje aktivnog mjesta, nego također utječe i na neke druge ključne funkcije. Dimerizacija, također i tetramerizacija, utječu na vezanje DPP IV/CD s adenzin-deaminazom, ali također omogućuje međustaničnu komunikaciju. S obzirom na to da dimerizacija utječe na pojačavanje afiniteta prema ligandu, to ujedno ima i ključnu ulogu u procesu prijenosa signala u stanicu³⁸.

Topljivi oblik DPP IV/CD26

Topljivi oblik DPP IV/CD26 cirkulira u mnogim tjelesnim tekućinama poput plazme, urina, sjemene i amnionske tekućine⁴³. U serumu je prvi put opisana aktivnost DPP IV/CD26 1976. godine⁴⁴, a detektirana je raznim metodama. Jedna od metoda jest vezanje adenzin-deaminaze na molekulu CD26 za koju je poznato da sadrži vezno mjesto za vezanje adenzin-deaminazu. Upravo je ovom metodom dokazano da 95 % aktivnosti serumske DPP IV potječe od molekule CD26⁴⁵. Samo podrijetlo topljivog oblika DPP IV/CD26 nije još točno utvrđeno, ali se pretpostavlja da se oslobađa s površine različitih tipova stanica koje izražavaju molekulu CD26 i koje su u doticaju s krvlju. Pretpostavka je da topljivi oblik DPP VI/CD26 nastaje proteolitičkim cijepanjem membranskog oblika s stanice koji se zatim otpušta u cirkulaciju⁴⁶, a sam mehanizam otpuštanja membranskog oblika nije još točno utvrđen⁴⁷. Istraživanja kristalne strukture topljivog oblika pokazala su da se ne razlikuje previše od membranskog oblika. Razlika između topljivog i membranskog oblika jest u tome što topljivi oblik ne sadrži intracelularni i transmembranski dio⁴⁵, a upravo zbog nedostatka transmembranskog dijela ova je molekula topljiva²⁹.

Tablica 1. Popis supstrata dipeptidil-peptidaze IV (DPP IV/CD26) u određenim biološkim procesima (prilagođeno prema referenci 48)

Supstrati uključeni u fiziološke procese	Supstrati uključeni u upalne procese
α_1 -mikroglobulin	Eotaksin
α -lanac fibrinogen	IP-10
Aprotinin	I-TAC
Bradikinin	Kentsin
Enterostatin	LD78 β
Faktor oslobađanja hormona rasta	Limfotoksin
Gastrični inhibicijski polipeptid (GIP)	MDC67
Gastrični otpuštajući peptid	MDC69
Glukagonu sličan peptid 1 (GLP-1)	MIG
Glukagonu sličan peptid 2	RANTES
Glukagon	SDF-1 α
Inzulinu sličan faktor rasta 1	SDF-2 β
Korionski gonadotropin	TNF- α
Morficeptin	
Monocitni kemotaktički protein 1	
Monocitni kemotaktički protein 2	
Monocitni kemotaktički protein 3	
Prokalcitonin	
Prokolipaza	
Prolaktin	
Supstancija P	
Tripsinogen	
Tyr-melanostatin	
Vazoaktivni intestinalni peptid	
	Neuropeptidi
	β -kazomorfin
	Endomorfin 1 i 2
	Kentsin
	Neuropeptid Y
	Vazoaktivni intestinalni peptid
	Peptid YY
	Supstancija P

IP-10 (engl. *interferon gamma-induced protein 10*); I-TAC (engl. *interferon-inducible T-cell alpha*); MDC (engl. *macrophage-derived chemokine*); MIG (engl. *monokine induced by gamma interferon*); RANTES (engl. *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*); SDF-1 α (engl. *stromal cell-derived factor 1 α*); TNF- α (engl. *tumor necrosis factor- α*)

Proteolitička funkcija DPP IV/CD26

DPP IV/CD26 multifunkcionalni je protein s različitim funkcijama koje ovise o tipu stanice i o uvjetima u kojima se nalazi. Između ostalog, proteolitička funkcija ove molekule je hidrolitička razgradnja pojedinih biološki aktivnih peptida⁴⁸. Supstrati DPP IV/CD26 su razni neuropeptidi, hormoni, citokini, kemokini i faktori rasta, koji imaju evolucijski očuvani prolin na preposljednjem mjestu u aminokiselinskoj sekvenci⁴⁹. Proteolitičkim djelovanjem na biološki aktivne peptide, DPP IV/CD26 utječe na njihovu aktivaciju i inaktivaciju. Dosada je utvrđen širok spektar supstrata DPP IV/CD26, što ukazuje na važnu ulogu ove molekule u raznim fiziološkim i patološkim procesima⁴⁸ (tablica 1).

Uloga DPP IV/CD26 u imunskom sustavu

Molekula DPP IV/CD26 izražena je na zrelih timocitima, aktiviranim limfocitima T, B, NK-stanicama te makrofagima. Ponajveći izražaj pronađen je

kod aktiviranih pomagačkih (CD4⁺) i citotoksičnih (CD8⁺) limfocita T⁵⁰⁻⁵². Ova molekula predstavlja glavni marker za aktivaciju stanica u imunskom sustavu. Dosadašnja istraživanja pokazuju kako je DPP IV/CD26 uključena u mehanizam stanične proliferacije i diferencijacije limfocita B i NK-stanica, apoptoze, u složenim mehanizmima aktivacije limfocita T *in vitro* i *in vivo* te u autoimunim procesima^{22,48,50-52}. DPP IV/CD26 se izravno veže na citoplazmatsku domenu CD45, što dovodi do prijenosa signala za sintezu IL-2³⁷. Stimulacija IL-2 povećava izražaj DPP IV/CD26 na površini limfocita T i NK-stanica^{22,25,51}, a izražaj na limfocitima B povećava se nakon stimulacije mitogenima ili proteinom *Staphylococcus aureus*^{46,52}. Povećani izražaj DPP IV/CD26 na površini limfocita T potiče njihovu proliferaciju i postiže maksimum nakon tri dana. Zatim se taj izražaj smanjuje, što zastavlja proliferaciju nakon jedanaest dana, što dokazuje da DPP IV/CD26 nije stabilan marker⁴⁸. Također se izražaj DPP IV/CD26 pojavljuje na mi-

rujućim limfocitima T kod kojih se izražaj može povećati za pet do deset puta nakon stimulacije anti-CD3, IL-2 ili mitogenima poput fitohemaglutinina^{22,46,50}. Pronađeno je da se najveći izražaj CD26 nalazi uz aktivacijske markere CD25, CD71, CD29 i CD45RO²².

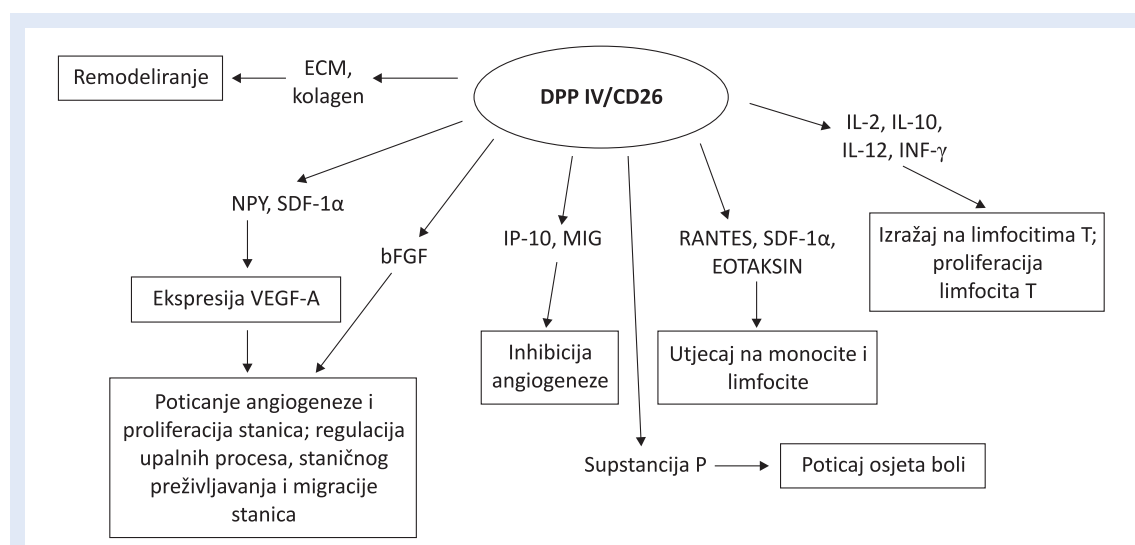
Uloga DPP IV/CD26 u metabolizmu glukoze

DPP IV/CD26 ima važnu ulogu u metabolizmu glukoze, što je utvrđeno 1996. godine, kada je dokazano da je DPP IV/CD26 odgovorna za razgradnju inkretina poput GLP-1, važnog regulatora metabolizma glukoze⁵³. Uloga GLP-1 jest povećavanje koncentracije inzulina u krvi, što utječe i na smanjenje koncentracije glukagona⁵⁴. Upravo zbog svoje uloge GLP-1 je molekula od značajnog terapijskog potencijala u liječenju šećerne bolesti tipa II⁵⁵. GLP-1 na pretposljednem mjestu u aminokiselinskoj sekvenci sadrži alanin, pa je iz tog razloga supstrat za DPP IV/CD26. Stoga, zbog proteolitičkog djelovanja DPP IV/CD26, poluživot GLP-1 iznosi svega 2 do 3 minute u krvi. Kako bi se spriječilo proteolitičko djelovanje DPP IV/CD26 na GLP-1 primjenjuju se inhibitori DPP IV/CD26 te se na taj način omogućuje povećanje poluživota GLP-1, ali također poluživot i ostalih hormona (npr. GIP, engl. *gastric inhibitory polypeptide*, i VIP, engl. *vasoactive intestinal peptide*) koji su također uključeni u regulaciju metabolizma glukoze⁵⁶. Mnoga istraživanja koja su provedena na životinjama u fiziološkim uvjetima te u uvjetima

pokusnog dijabetesa pokazala su da inhibicija DPP IV/CD26 omogućuje kontrolu razine GLP-1 i bolju regulaciju koncentracije glukoze u krvi⁵⁷, što je dovelo do razvoja novog terapijskog pristupa u liječenju šećerne bolesti tipa II. Najčešći inhibitori DPP IV/CD26 koji su u kliničkoj primjeni u terapiji šećerne bolesti tipa II su sitagliptin, saxagliptin i vildagliptin. Mogu se primjenjivati samostalno ili u kombiniranim terapijama⁵⁸. Inhibitori se ne razlikuju samo kemijski, nego i u dinamici apsorpcije, distribuciji, biotransformaciji i eliminaciji te u jačini i vremenu djelovanja, a zajednička im je inhibicija katalitičke aktivnosti DPP IV/CD26⁵⁹. Kako je jedna od čestih komplikacija dijabetesa i poremećaj u cijeljenju rana, pretpostavlja se pozitivan učinak inhibitora DPP IV/CD26 na cijeljenje kroničnih dijabetičkih rana, što je predmet brojnih istraživanja.

Uloga DPP IV/CD26 u procesu cijeljenja rana

Dosadašnja istraživanja upućuju da DPP IV/CD26 ima važnu ulogu u adheziji, migraciji i apoptozi stanica, a ti su mehanizmi ključni u procesu cijeljenja rana⁶⁰. Kao serinska proteaza, sudjeluje u proteolitičkoj razgradnji pojedinih biološki aktivnih peptida tako što mijenja njihovu biološku ulogu (in)aktivacijom ili promjenom sposobnosti vezanja za odgovarajući receptor. Osim toga, DPP IV/CD26 ima važnu funkciju u prijenosu signala u stanicu, uključena je u mehanizme stanične proliferacije i diferencijacije te ima kostimulacijsko



Slika 2. Shematski prikaz uloge DPP IV/CD26 u procesu cijeljenja rane

djelovanje na imunostanice, čime sudjeluje u regulaciji i modulaciji imunostnog odgovora²⁶. Poznato je da pojedini biološki aktivni peptidi, kao što su citokini, kemokini i faktori rasta, sudjeluju u procesu cijeljenja rana te su ključni za normalno odvijanje procesa regeneracije, kao što je navedeno ranije. Predstavljaju složenu signalnu mrežu koja regulira ključne procese tijekom cijeljenja rana⁷. Upravo zbog svoje pleiotropnosti i različitih mehanizama putem kojih je uključena u brojne procese od izrazite je važnosti za cijeljenje ranjenog tkiva te su moga istraživanja usmjerena upravo na proučavanje uloge DPP IV/CD26 u cijeljenju rana.

Uloga DPP IV/CD26 u procesu cijeljenja rana može se promatrati kroz nekoliko aspekata (slika 2). Tijekom nulte faze dolazi do izlučivanja raznih citokina i faktora rasta koji potiču migraciju upalnih stanica putem neutrofila, makrofaga i limfocita T. Ove upalne stanice tijekom faze I obavljaju fagocitozu mikroorganizama kao i ostalih nepoželjnih nusprodukata u rani te ujedno izlučuju razne faktore rasta i citokine⁷⁻⁹. Za citokine IL-2, IL-10, IL-12 i interferon- γ (INF- γ), koji se izlučuju tijekom procesa cijeljenja rana, dokazana je uzročno-posljedična veza s izražajem DPP IV/CD26 na limfocitima T. Izražaj DPP IV/CD26 utječe na njihovu proliferaciju, stoga nedostatak DPP IV/CD26 može dovesti do promjena u samom procesu proliferacije limfocita T te ujedno i do smanjenja izlučivanja citokina. To izravno može utjecati na imunostni odgovor organizma. Dosad nije još potpuno istraženo na koji način DPP IV/CD26 utječe na fazu I cijeljenja rana, ali poznato je da DPP IV/CD26 svojim proteolitičkim djelovanjem i razgradnjom kemokina kao što su RANTES, SDF-1 α i eotaksin može utjecati na monocite i limfocite^{48,50,61}. Citokin IL-1 je prvi signal drugim stanicama nakon nastalog oštećenja te je odgovoran za povećano izlučivanje supstancije P i prostaglandina E2^{7,62}. Daljnja istraživanja upućuju da DPP IV/CD26 svojim proteolitičkim djelovanjem djeluje upravo na izlučivanje supstancije P i na taj način potiče osjet bola u rani⁶³.

Tijekom procesa cijeljenja rana dolazi do pojave hipoksije zbog velike metaboličke aktivnosti te se u rani počinju izlučivati razni faktori rasta koji će potaknuti angiogenezu^{6,11}. Poznato je da tijekom hipoksije DPP IV/CD26 djeluje na neuropeptid Y

(NPY) tako što mu onemogućuje vezanje na njegov receptor Y1, a pritom ne utječe na njegovo vezanje na ostale receptore kao što su Y2 i Y5. Time DPP IV/CD26 putem svog supstrata NPY ima ulogu u regulaciji upalnih procesa, proliferacije i angiogeneze. Dokazano je da NPY poboljšava funkciju miokarda i sazrijevanje novonastalih krvnih žila stvaranjem sloja glatkih mišića tako što stimulira faktore rasta VEGF i bFGF i smanjuje antiangiogeni izražaj. Nadalje je poznato da interakcija DPP IV/CD26 s ekstracelularnim matriksom djeluje na bFGF te na taj način utječe na proliferaciju stanica, migraciju, stanično preživljavanje i angiogenezu^{22,63}.

Kemokini su također aktivni sudionici u procesu cijeljenja rana jer potiču migraciju različitih vrsta upalnih stanica. Osim toga, prisutnost kemokinskih receptora na prisutnim stanicama u području ranjenog tkiva upućuje na činjenicu da oni pridonose regulaciji reepitelizacije, angiogeneze te remodeliranju tkiva. Razlikujemo tri glavne skupine kemokina: CXC (α -kemokini), CC (β -kemokini) i C (γ -kemokini) čiji se receptori nalaze na površini ciljnih stanica⁵.

Među CXC kemokine ubrajamo i važne supstrate DPP IV/CD26 s ključnim djelovanjem u procesima cijeljenja ranjenog tkiva: IP-10 (engl. *interferon gamma-induced protein 10*), MIG (engl. *monokine induced by gamma interferon*) i SDF-1 α (engl. *stromal cell-derived factor 1 α*). Tijekom cijeljenja rana povećava se lučenje IP-10 od strane keratinocita. Pokazano je da prekomjerna ekspresija IP-10 može rezultirati intenzivnijim upalnim odgovorom putem utjecaja na aktivnost limfocita T u rani koji izražavaju CXCR3 receptore. Također je dokazano, u *in vitro* uvjetima, da IP-10 može odgoditi reepitelizaciju te produžiti proces angiogeneze. Izražaj IP-10 reguliran je zajedno s MIG-om te je za ova dva kemokina pokazano da imaju sposobnost inhibicije angiogeneze^{7,64}. SDF-1 α djeluje putem CXCR4 receptora te ima ulogu u upalnom odgovoru regrutiranjem limfocita T u rani, a osim toga, dokazano je i da potiče angiogenezu^{7,65}. Ovaj kemokin izlučuju endotelne stanice, miofibroblasti i keratinociti. Istraživanja pokazuju da SDF-1 α utječe i na proliferaciju i migraciju endotelnih stanica te ujedno poboljšava proliferaciju keratinocita i na taj način potiče reepitelizaciju^{7,64}. U skupinu CC kemokina ubrajamo

monocitni kemotaktički protein 1 (MCP-1, engl. *monocyte chemotactic protein 1*) koji je glavni kemotaktant za monocite/makrofage, ali također djeluje na limfocite T i mastocite. Također, u CC kemokine ubrajamo RANTES (engl. *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), također supstrat DPP IV/CD26 koji poput MCP-1, regulira aktivnost upalnih stanica^{62,64}. Stoga, osim što DPP IV/CD26 utječe na angiogenezu, ujedno utječe i na njenu inhibiciju. Istraživanja su dokazala da DPP IV/CD26 proteolitičkom funkcijom djeluje na kemokine IP-10 i MIG na način da im se smanjuje uloga u kemotaksiji, ali im ostaje očuvana sposobnost inhibicije angiogeneze⁶².

Osim citokina i kemokina, ključnu ulogu u regulaciji procesa cijeljenja rana imaju i faktori rasta za koje je također potvrđena uzročno-posljedična veza s DPP IV/CD26. Neki od faktora rasta su: EGF, FGF, PDGF, TGF- β , VEGF i bFGF. EGF ima važnu ulogu u reepitelizaciji, povećavajući proliferaciju keratinocita i migraciju stanica, a izlučuju ga trombociti, makrofagi i fibroblasti. FGF izlučuju keratinociti, fibroblasti, endotelne stanice i stanice glatkih mišića, a ima ulogu u stvaranju granulacijskog tkiva, reepitelizaciji i remodeliranju tkiva. Sljedeći važan faktor rasta jest PDGF koji izlučuju trombociti, makrofagi, fibroblasti i keratinociti, a ima ulogu u svakoj fazi cijeljenja rana, između ostalog u sazrijevanju krvnih žila i reepitelizaciji. Potiče mitogenost i kemotaksiju neutrofila, monocita, fibroblasta i stanica glatkih mišića te stimulira makrofage da izlučuju TGF- β koji je jedan od važnijih faktora rasta u procesu reepitelizacije, fibroplazije i angiogeneze. Dokazana je uzročno-posljedična veza DPP IV/CD26 i TGF- β , iako TGF- β nije supstrat za katalitičko djelovanje ovog enzima. Inhibicija DPP IV/CD26 potiče lučenje TGF- β , a povećanje koncentracije TGF- β inhibira enzimsku aktivnost DPP IV/CD26^{5-7,66}.

Tijekom cijeljenja rana, DPP IV/CD26 proteolitičkim djelovanjem utječe i na migraciju i apoptozu stanica. Također, DPP IV/CD26 utječe na migraciju stanica putem svoje sposobnosti razgradnje ekstracelularnog matriksa. Nadalje, DPP IV/CD26 sudjeluje i u razgradnji kolagena. Stoga, možemo pretpostaviti da DPP IV/CD26 svojom proteolitičkom funkcijom održava ravnotežu između razgradnje i sinteze tijekom faze III cijeljenja rana, što je izuzetno bitno za remodeliranje ekstracelu-

larnog matriksa i kolagena, a što naposljetku omogućuje nastanak ožiljkastog tkiva i uspostavljanje ponovne fiziološke funkcije kože⁶¹.

ZAHVALA

Pregledni članak napisan je u okviru Potpore Sveučilišta u Rijeci, broj 13.06.1.2.26., pod nazivom „Uloga proteina obitelji DPP IV u kroničnim bolestima”, voditeljice prof. dr. sc. Jadranke Varljen.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Lipozenčić J. Uloga kože, razvitak kože, pregled građe i funkcija kože. In: Lipozenčić J i sur. (eds) Dermatovenerologija. Treće izmijenjeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2008;5-9.
2. Toulon A, Berton L, Taylor KR, Tenenhaus M, Bhavsar D, Lanigan C et al. A role for human skin-resident T cell in wound healing. *J Exp Med* 2009;206:743-50.
3. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997;77:509-28.
4. Braiman-Wiksmann L, Solomonik I, Spira R, Tennenbaum T. Novel insights into wound healing sequence of events. *Toxicol Pathol* 2007;35:767-79.
5. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83:835-70.
6. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 2004;9:283-9.
7. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008;16:585-601.
8. Peterson JM, Barbul A, Breslin RJ, Wasserkrug HL, Efron G. Significance of T-lymphocytes in wound healing. *Surgery* 1987;102:300-5.
9. Efron JE, Frankel HL, Lazarou SA, Wasserkrug HL, Barbul A. Wound healing and T-lymphocytes. *J Surg Res* 1990;48:460-3.
10. Harding KG, Morris HL, Patel GK. Science, medicine and the future: healing chronic wound. *BMJ* 2002;324:160-3.
11. Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. Cellular aspects of wound healing. *An Bras Dermatol* 2009;84:257-262.
12. Damjanov I, Aralica G, Batelja Vuletić L, Seiwert S. Upala. In: Damjanov I i sur. (eds) Patologija. Četvrto prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2014;63-72.
13. Ruthenborg RJ, Ban JJ, Wazir A, Takeda N, Kim JW. Regulation of wound healing and fibrosis by hypoxia-inducible factor-1. *Mol Cells* 2014;37:637-43.
14. Van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF- κ B. *Biochem J* 2008;412:477-84.
15. Hong WX, Hu MS, Esquivel M, Liang GY, Rennert RC, McArdle A et al. The role of hypoxia-inducible factor in wound healing. *Adv Wound Care* 2014;3:390-9.

16. Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, Catrina AI, Grunler J, Lindberg S et al. Stabilization of HIF-1 α is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:19426-31.
17. Semenza GL. Regulation of hypoxia-induced angiogenesis: a chaperone escorts VEGF to the dance. *J Clin Invest* 2001;108:39-40.
18. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998;152:1445-52.
19. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 2009;37:1528-42.
20. Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:2059-81.
21. Van Hinsbergh VW, Engelse MA, Quax PH. Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:716-28.
22. Yu DM, Yao TW, Chowdhury S, Nadvi NA, Osborne B, Church WB et al. The dipeptidyl peptidase IV family in cancer and cell biology. *FEBS J* 2010;277:1126-44.
23. Wesley UV, McGroarty M, Homoyouni A. Dipeptidyl peptidase inhibits malignant phenotype of prostate cancer cells by blocking basic fibroblast growth factor signaling pathway. *Cancer Res* 2005;65:1325-34.
24. Van der Veken P, Haemers A, Augustyns K. Prolyl peptidases related to dipeptidyl peptidase IV: potential of specific inhibitors in drug discovery. *Curr Top Med Chem* 2007;7:621-35.
25. Gorrell MD. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin Sci* 2005;108:277-92.
26. Batičić Pučar L, Detel D, Varljen J. Dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26) i upalne bolesti crijeva. *Arh Hig Rada Toksikol* 2012;63:75-100.
27. Waumans Y, Baerts L, Kehoe K, Lambeir AM, De Meester I. The Dipeptidyl Peptidase Family, Prolyl Oligopeptidase, and Prolyl Carboxypeptidase in the Immune System and Inflammatory Disease, Including Atherosclerosis. *Front Immunol* 2015;6:387.
28. Koivisto V. Discovery of dipeptidyl-peptidase IV – a 40 year journey from bench to patient. *Diabetologia* 2008;51:1088-9.
29. Ogata S, Misumi Y, Ikehara Y. Primary structure of rat liver dipeptidyl peptidase IV deduced from its cDNA and identification of the NH₂-terminal signal sequence as the membrane-anchoring domain. *J Biol Chem* 1989;264:3596-601.
30. Ulmer AJ, Mattern T, Feller AC, Heymann E, Flad HD. CD26 antigen is a surface dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) as characterized by monoclonal antibodies clone TII-19-4-7 and 4EL1C7. *Scand J Immunol* 1990;31:429-35.
31. Misumi Y, Hayashi Y, Arakawa F, Ikehara Y. Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface. *Biochim Biophys Acta* 1992;1131:333-6.
32. Ohnuma K, Morimoto C. DPP4 (Dipeptidyl-peptidase 4). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2013;17:301-12.
33. Abbott CA, Baker E, Sutherland GR, McCaughan GW. Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene. *Immunogenetics* 1994;40:331-8.
34. Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003;40:209-94.
35. Hanski C, Huhle T, Reutter W. Involvement of plasma membrane dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated adhesion of cells on collagen. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1985;366:1169-76.
36. Morrison ME, Vijayaradhhi S, Engelstein D, Albino AP, Houghton AN. A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J Exp Med* 1993;177:1135-43.
37. Ishii T, Ohnuma K, Murakami A, Takasawa N, Kobayashi S, Dang NH et al. CD26-mediated signaling for T cell activation occurs in lipid rafts through its association with CD45RO. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12138-43.
38. Engel M, Hoffmann T, Wagner L, Wermann M, Heiser U, Kiefersauer R et al. The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5063-8.
39. Bjelke JR, Christensen J, Branner S, Wagtmann N, Olsen C, Kanstrup AB et al. Tyrosine 547 constitutes as essential part of the catalytic mechanism of dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem* 2004;279:34691-7.
40. Aertgeerts K, Ye S, Tennant MG, Kraus ML, Rogers J, Sang BC et al. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation. *Protein Sci* 2004;13:412-21.
41. Abbott CA, McCaughan GW, Gorrell MD. Two highly conserved glutamic acid residues in the predicted beta propeller domain of dipeptidyl peptidase IV are required for its enzyme activity. *FEBS Lett* 1999;458:278-84.
42. Püschel G, Mentlein R, Heymann E. Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Eur J Biochem* 1982;126:359-65.
43. Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:1723-47.
44. Nagatsu T, Hino M, Fuyamada H, Hayakawa T, Sakakibara S, Nakagawa Y et al. New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase. *Anal Biochem* 1976;74:466-76.
45. Durinx C, Lambeir AM, Bosmans E, Falmagne JB, Berghmans R, Haemers A et al. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem* 2000;267:5608-13.
46. Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: A multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2001;54:249-64.
47. Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:1723-47.
48. Boonacker E, Van Noorden CJ. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol* 2003;82:53-73.
49. Van Damme J, Struyf S, Wuyts A, Van Coillie E, Menten P, Schols D et al. The role of CD26/DPP IV in chemokine processing. *Chem Immunol* 1999;72:42-56.

50. Gorrell MD, Wickson J, McCaughan GW. Expression of the rat CD26 antigen (dipeptidyl peptidase IV) on subpopulations of rat lymphocytes. *Cell Immunol* 1991;134:205-15.
51. Bühling F, Kunz D, Reinhold D, Ulmer AJ, Ernst M, Flad HD et al. Expression and functional role of dipeptidyl peptidase IV (CD26) on human natural killer cells. *Nat Immun* 1994;13:270-9.
52. Bühling F, Junker U, Reinhold D, Neubert K, Jäger L, Anzorge S. Functional role of CD26 on human B lymphocytes. *Immunol Lett* 1995;45:47-51.
53. Pauly RP, Rosche F, Wermann M, McIntosh CH, Pederson RA, Demuth HU. Investigation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-(1-42) and glucagon-like peptide-1-(7-36) degradation in vitro by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. A novel kinetic approach. *J Biol Chem* 1996;271:23222-9.
54. Kryemann B, Ghatei MA, Williams G, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* 1987;2:1300-4.
55. Deacon CF. Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1. *Diabetes* 2004;53:2181-9.
56. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007;132:2131-57.
57. Drucker DJ. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and the treatment of type 2 diabetes: preclinical biology and mechanisms of action. *Diabetes Care* 2007; 30:1335-43.
58. Palalau AI, Tahrani AA, Piya MK, Barnett AH. DPP-4 inhibitors in clinical practice. *Postgrad Med* 2009;121:70-100.
59. Deacon CF. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: a comparative review. *Diabetes Obes Metab* 2011;13:7-18.
60. Wang XM, Yu DM, McCaughan GW, Gorrell MD. Extracellular matrix roles of DPIV and FAP in cell adhesion and migration on collagen and fibronectin. *Adv Exp Med Biol* 2006;575:213-22.
61. Bauvois B. Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis? *Oncogene* 2004;23:317-29.
62. Zhang JM, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin* 2007;45:27-37.
63. Matheeußen V, Junggraithmayr W, De Meester I. Dipeptidyl peptidase 4 as a therapeutic target in ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Ther* 2012;136:267-82.
64. Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in Cutaneous Wound Healing. *J Leukoc Biol* 2001;69:513-21.
65. Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol* 2007;28:299-307.
66. Akita S, Akino K, Hirano A. Basic Fibroblast Growth Factor in Scarless Wound Healing. *Adv Wound Care* 2013; 2:44-9.