

Hubungan antara Polimorfisme Gen VEGF-A dengan Perkembangan Ulkus Diabetika

Ika Rahayu

Bagian Riset dan Pengembangan, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Krida Wacana
Alamat korespondensi: ika.rahayu@ukrida.ac.id

Abstrak

Diabetes melitus (DM) merupakan suatu gangguan metabolik yang ditandai oleh hiperglikemia kronik. Hal ini disebabkan oleh kelainan sekresi insulin, gangguan kerja insulin atau gangguan keduanya. Sebanyak 12-25% pasien DM mempunyai risiko untuk mengalami ulkus diabetika. Ulkus diabetika merupakan komplikasi yang sering terjadi pada pasien DM tipe 1 dan 2.

Diabetes melitus merupakan suatu model prototopikal pada kejadian gangguan penyembuhan luka. Individu dengan DM menunjukkan kemampuan angiogenesis abnormal pada beberapa organ. Gen *Vascular Endothelial Growth Factor-A* (VEGF), merupakan gen yang menyandi polipeptida VEGF. Studi fungsional yang telah dilakukan mengindikasikan bahwa polimorfisme pada gen ini memengaruhi ekspresi mRNA. Ekspresi mRNA mempunyai peranan penting pada proses penyembuhan luka.

Kata Kunci : Diabetes melitus, ulkus diabetika, polimorfisme gen VEGF, VEGF-A

Association of VEGF-A gene polymorphism and the development of Diabetic Foot Ulcer

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia. This is due to the disorder of insulin secretion, insulin disruption or both. 12-25% of patients with DM have a risk of diabetic foot ulcer. Diabetic ulcer is a frequent complication of type 1 and 2 DM.

Diabetes mellitus is a prototypical model of wound healing disorders. Individual with DM shows abnormal angiogenesis in some organs. Vascular Endothelial Growth Factor-A (called VEGF) is a gene that encodes VEGF polypeptide. Functional studies indicates that polymorphisms in this gene affects the mRNA expression which plays an important role in the wound healing process.

Keywords : *Diabetes mellitus, diabetic foot ulcer, VEGF gene polymorphism, VEGF-A*

Pendahuluan

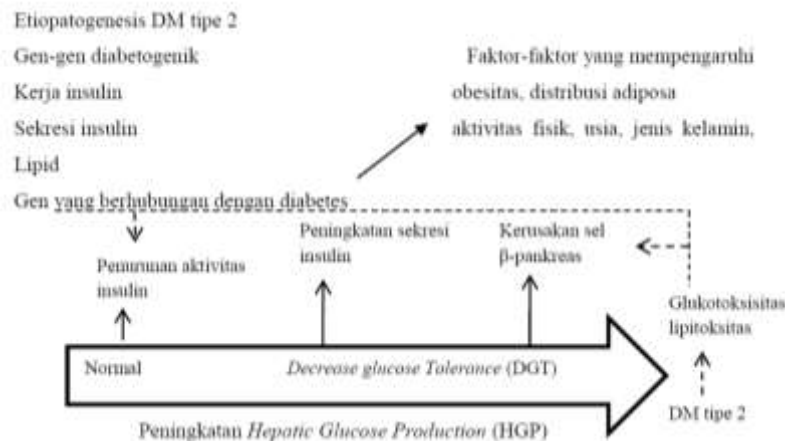
Diabetes melitus (DM) merupakan suatu gangguan metabolik yang terjadi pada sistem endokrin. Kejadian ini ditandai dengan kondisi hiperglikemia yang berhubungan dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang menyebabkan terjadinya kelainan sekresi insulin, gangguan kerja insulin, atau keduanya dalam proses

metabolisme.^{1,2} Pada tahun 2015 telah tercatat bahwa jumlah penderita DM di Indonesia adalah 10 juta orang. Indonesia menempati urutan ke-7 terbesar di dunia, sedangkan tingkat pertama ditempati oleh China (109,6 juta), yang kedua adalah India (69,2 juta), Amerika Serikat (29,3 juta) menduduki tingkat ketiga. Disusul oleh Brazil (14,3 juta), Rusia (12,1 juta), dan Mexico (11,5 juta) diurutan ke-enam.³

American Diabetes Association mengklasifikasikan DM menjadi beberapa tipe : DM tipe 1, DM tipe 2, Diabetes melitus tipe spesifik lainnya, dan Diabetes melitus gestasional. Diabetes melitus gestasional (GDM) merupakan jenis diabetes dengan tingkat glukosa intoleran yang dikenali pertama kali pada saat individu sedang hamil. Diabetes melitus tipe 1 merupakan jenis DM yang terjadi karena kerusakan sel β -pankreas yang menyebabkan defisiensi insulin absolut. Dua bentuk DM tipe 1, yaitu DM yang dimediasi oleh sistem imun dan DM idiopatic. Individu yang mengalami DM yang di mediasi oleh sistem imun ini akan mengalami kerusakan sel β -pankreas secara bervariasi. Individu menunjukkan ketoasidosis pada menifestasi klinis pertama kali. Diabetes melitus tipe 2 merupakan jenis DM dimana individu yang mengalami DM jenis ini bervariasi mulai dari dominan resistensi insulin disertai dengan defisiensi insulin relatif sampai dengan defek sekresi insulin disertai

dengan resistensi insulin. Kebanyakan penderita diabetes tipe ini mengalami obesitas dan jarang terjadi ketoasidosis secara spontan.⁴

Perkembangan DM tipe 2 dipengaruhi oleh banyak faktor. Faktor pertama adalah gen-gen diabetogenik yang berhubungan dengan kerja insulin, sedangkan faktor yang lain dapat disebabkan oleh obesitas, aktifitas fisik yang kurang, usia, jenis kelamin, dan jumlah lipid. Conget melaporkan mengenai hubungan antara defek sekresi insulin dengan kerja hormon yang rumit dalam mengontrol homeostasis glukosa. Kedua hal ini berperan dalam menyebabkan tingkat patofisiologi penyakit. Ekspresi fenotipik yang terjadi sebagai akibat defek genetik juga mengakibatkan perubahan dalam sekresi insulin. Etiopatogenesis DM tipe 2 dipengaruhi oleh gen-gen diabetogenik yang berhubungan dengan kerja dan aksi insulin. Faktor-faktor lain yang mempengaruhi adalah obesitas, distribusi adiposa, aktivitas fisik, usia, jenis kelamin dan lipid.⁵

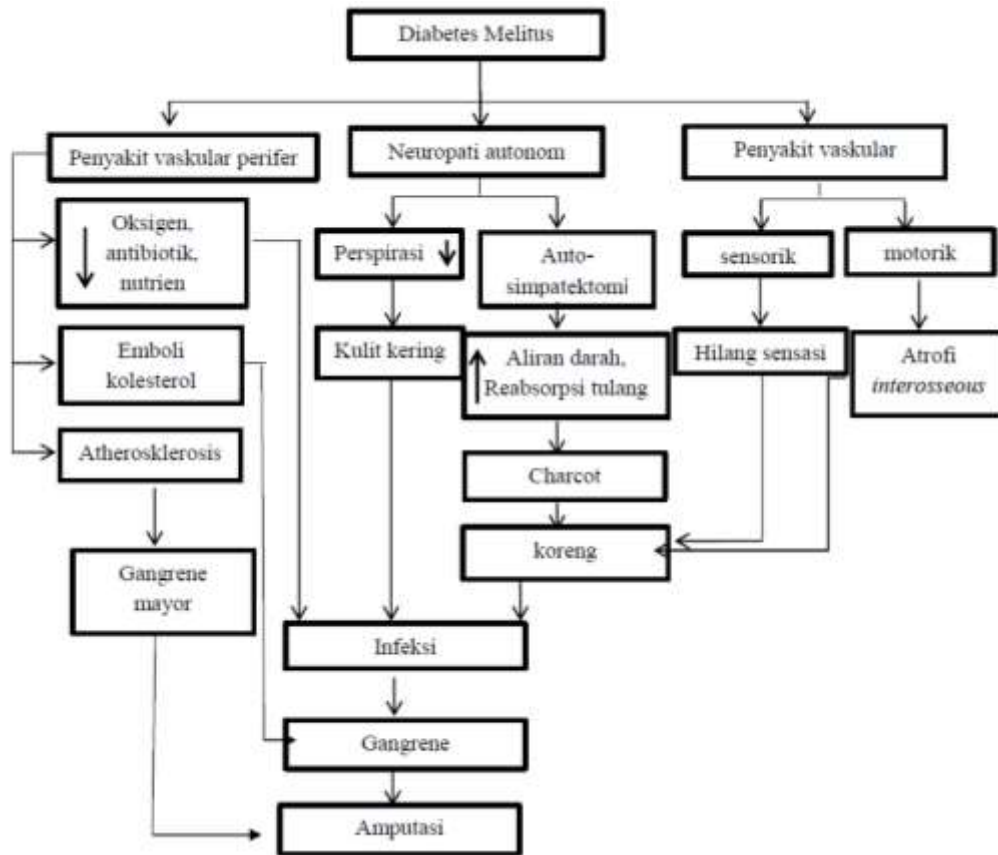


Gambar 1. Etiopatogenesis DM tipe 2

Ulkus Diabetika

Sebanyak 12-25% pasien DM mempunyai risiko mengalami ulkus.⁶ Ulkus Diabetika merupakan suatu infeksi yang disebabkan oleh invasi jaringan disertai proliferasi mikroorganisme yang mengakibatkan terjadinya kerusakan jaringan dengan atau tanpa respon peradangan pada sel inang.⁷ Infeksi kulit pada pasien DM biasanya

disebabkan oleh kurangnya kontrol pasien terhadap kadar glukosa darah, sehingga kadar glukosa meningkat dan mengakibatkan berkurangnya efektivitas sel saat melawan mikroba.⁸ Ada beberapa faktor yang menyebabkan ulkus diabetika, seperti penyakit pembuluh darah perifer, neuropati autonomik, dan neuropati perifer kaki, selain itu juga trauma yang menyebabkan kerusakan kulit.^{6,9}



Gambar 2. Jalur terjadinya Ulkus Diabetika

Diabetes Mellitus (DM) menyebabkan terjadinya Penyakit arteri perifer dan neuropati yang memicu terjadinya ulkus diabetika.¹⁰ Faktor lain yang ikut berperan ketika pasien DM mengalami ulkus diabetika adalah adanya gangguan penyembuhan luka yang terjadi secara instrinsik pada pasien.¹¹ Pasien DM dengan ulkus diabetika dapat ditangani segera secara sistematis dengan membersihkan luka, *debridement* setiap nekrotik dan gangren, dan menutup bagian tulang yang terlihat. *Swab* juga diperlukan untuk menumbuhkan mikroorganisme yang ikut berperan dalam perkembangan ulkus diabetika.⁶ Diabetes mellitus merupakan suatu model prototopikal pada kejadian gangguan penyembuhan luka.¹² Pasien diabetes mellitus menunjukkan kemampuan angiogenesis yang abnormal pada beberapa organ.¹³

Proses penyembuhan luka

Proses yang terjadi pada penyembuhan luka antara lain: koagulasi, inflamasi, migrasi-proliferasi, dan *remodelling*. Luka menyebabkan terjadinya kerusakan pembuluh

darah sehingga terjadi perdarahan, kemudian dilanjutkan dengan terjadinya bekuan fibrin dan perekrutan sel-sel inflamasi ke daerah luka.^{14,15} Koagulasi berperan penting untuk hemostasis dan perlindungan terhadap luka. Pada proses ini platelet melekat pada kolagen tipe 1 di bawah pengaruh adenosin difosfat. Platelet menjadi aktif dan menyekresikan beberapa senyawa, seperti glikoprotein adhesif yang menyebabkan terjadinya agregasi platelet dan faktor yang memicu kaskade pembekuan luka sampai pada produksi trombin. Trombin ini berfungsi untuk mengawali pembentukan fibrin dari fibrinogen, yang berguna untuk memperkuat agregat platelet.¹⁵ Platelet juga melepaskan sejumlah besar faktor pertumbuhan, seperti *Platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *Transforming growth factor-β1* (TGF-β1).¹⁶ Faktor-faktor pertumbuhan yang dilepaskan akan merekrut neutrofil dan monosit, merangsang sel epitel, dan merekrut fibroblas.¹⁵ Selain itu, platelet juga melepaskan fragmen fibrinopeptida yang dapat merekrut sel-sel inflamasi ke daerah luka.¹⁷ Proses ini terjadi beberapa menit setelah terjadi luka.¹⁵

Inflamasi merupakan fase kedua pada proses penyembuhan luka, proses ini terjadi satu sampai empat hari setelah luka. Inflamasi merupakan suatu proses untuk menggalakkan hemostasis, menyingkirkan jaringan mati, dan mencegah infeksi oleh bakteri yang bersifat patogen.¹⁵ Neutrofil dan makrofag berperan dalam *debridement* luka. Neutrofil melakukan fagositosis terhadap debris dan mikroorganisme serta berperan sebagai sistem pertahanan pertama untuk mencegah infeksi. Monosit beredar dan berproliferasi menjadi makrofag setelah keluar dari pembuluh darah. Makrofag berperan dalam fagositosis bakteri dan menjadi sistem pertahanan kedua untuk mencegah infeksi pada luka. Makrofag menyekresikan enzim ekstraseluler (merupakan kelompok matriks metaloproteinase) yang berfungsi untuk mendegradasi jaringan mati.¹⁶ Makrofag juga menyekresi sitokin-sitokin dan faktor pertumbuhan seperti *Tumour necrosis factor-alpha* (TNF- α) dan Interleukin-1 (IL-1) yang penting untuk pembentukan protein matriks ekstraseluler.¹⁵

Pembentukan protein matriks ekstraseluler, angiogenesis, kontraksi, dan migrasi keratinosit merupakan komponen penting dalam fase proliferasi. Protein matriks, seperti kolagen, fibronectin, dan vitronectin merupakan substrat yang penting untuk pergerakan sel, perubahan sifat sel dan struktur untuk mengembalikan integritas jaringan.¹⁶ Fibroblas bermigrasi ke daerah luka pada hari ketiga karena pengaruh faktor pertumbuhan, seperti: TGF- β dan PDGF. Kontraksi merupakan suatu peristiwa penting, kemunculan matriks ekstraseluler dan myofibroblas merupakan cara efisien dalam mencapai penutupan luka. Sintesis kolagen dilakukan oleh fibroblas, berfungsi untuk memberikan kekuatan pada jaringan dan berperan penting dalam proliferasi dan *remodelling*.¹⁸ Angiogenesis merupakan pembentukan pembuluh darah baru yang penting untuk perbaikan luka.¹⁹

Beberapa protein yang bekerja sama dalam mengontrol pembentukan pembuluh darah baru di lokasi terjadinya luka adalah faktor pertumbuhan, protein matriks ekstraseluler (ECM), matriks metaloproteinase (MMP), integrin, dan sitokin.¹² Terlepasnya *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), PDGF, dan TGF- β dari platelet, monosit, dan fibroblas merupakan pemicu terjadinya proses

angiogenesis.²⁰ Sel endotel bersifat responsif terhadap faktor-faktor pertumbuhan, seperti *Fibroblast growth factor* (FGF), VEGF, PDGF, angiogenin, TGF- α , dan TGF- β . Sel endotel yang teraktivasi oleh molekul-molekul angiogenik kemudian merusak ikatan antar sel endotel, membran *basement*, dan komponen matriks ekstraseluler dengan melepaskan matriks metaloproteinase.²¹ Molekul-molekul tersebut membuat suatu sinyal angiogenik potensial dan merangsang sel endotel untuk bermigrasi ke matriks ekstraseluler, berproliferasi dan kemudian membentuk pembuluh *immature*.^{21,22} Kondisi hipoksia selama terjadinya luka menyebabkan molekul-molekul angiogenik disekresikan dan memicu terjadinya proliferasi dan pertumbuhan sel-sel endotel.¹⁸

Remodelling merupakan fase yang paling lama pada proses penyembuhan luka, fase ini terjadi pada hari ke 21 hingga 2 tahun. Pada fase ini tercapai keseimbangan antara sintesis dan degradasi kolagen. Neutrofil, makrofag, dan fibroblas memproduksi enzim matriks metaloproteinase yang bertanggung jawab dalam melakukan degradasi kolagen.¹⁸ Fibroblas mengatur dan menghubungkan kolagen, hal ini menyebabkan kekuatan luka meningkat secara bertahap, kontraksi luka terjadi, kepadatan kapiler dan fibroblas mengalami penurunan.²³ Fibroblas mengalami perubahan menjadi myofibroblas yang mengandung *contractile actin fiber*. Myofibroblas ini mampu menghasilkan gaya kontraktil yang kuat.^{14,24} Jaringan ikat bagian bawah mengecil dengan mendekatkan tepi luka, hal ini disebabkan oleh adanya interaksi fibroblas dengan matriks ekstraseluler. Proses ini diatur oleh beberapa faktor pertumbuhan seperti PDGF, TGF- β , dan FGF. Densitas fibroblas mengalami penurunan melalui apoptosis ketika kontraksi luka berhenti.^{14,18}

Peran Gen VEGF dalam Penyembuhan Luka

Gen VEGF merupakan gen yang menyandi polipeptida VEGF. *Vascular endothelial growth factor-A* (disebut juga sebagai VEGF) merupakan suatu glikoprotein homodimerik yang mempunyai kemampuan untuk menginduksi angiogenesis dalam meningkatkan permeabilitas vaskular. *Vascular endothelial growth factor-A* juga berfungsi merangsang terbentuknya faktor

jaringan protein trombogenik.^{12,25} Glikoprotein ini merupakan kelompok faktor pertumbuhan PDGF yang mempunyai peran potensial dalam proses angiogenesis.²⁶ *Vascular endothelial growth factor-A* dapat dikenali dalam tujuh isoform homodimerik, seperti 121, 145, 148, 165, 183, 189, dan 206.²⁷ Beberapa sel yang dapat menghasilkan VEGF untuk penyembuhan luka adalah sel endothelial, sel otot polos, platelet, neutrofil, dan makrofag.²⁸

Proses penyembuhan luka secara normal terjadi dengan adanya pembentukan granulasi jaringan. Jaringan ini mengandung fibroblas, kolagen, dan pembuluh darah yang mempunyai peran penting dalam penyembuhan luka.¹² Wilgus dan DiPietro melaporkan pentingnya peran VEGF dalam proses penyembuhan luka. Kadar VEGF yang meningkat berhubungan dengan adanya perubahan bekas luka.²⁹ *Vascular Endothelial Growth Factor* pada luka DM dapat berfungsi dalam meningkatkan penyembuhan dan memicu terjadinya kemotaksis dan angiogenesis. Nitrit Oksida (NO) merupakan salah satu mediator aktivitas VEGF yang berfungsi dalam meningkatkan desposisi kolagen dan mengembalikan fungsi endotel dalam meningkatkan konduksi saraf dan oksigenasi pada jaringan.¹² Penghambatan terhadap proses angiogenesis dapat menghambat proses penyembuhan luka.²⁹

Hubungan antara VEGF dengan Ulkus Diabetika

Pecoraro *et al.* telah melaporkan bahwa perfusi kulit *periwound* merupakan suatu faktor penentu fisiologis kritis pada penyembuhan ulkus diabetika. Pasien dengan DM akan mengalami penurunan kemampuan pada penyembuhan luka. Hal ini berhubungan dengan rendahnya kadar *transcutaneous oxygen pressure* (TcPO₂) dan tekanan darah.³⁰

Tujuan utama dari penyembuhan luka adalah tertutupnya luka dengan cepat dan bekas luka menjadi baik. Makrofag, fibroblas, dan pembuluh darah merupakan faktor penting dalam proses penyembuhan luka. Makrofag merupakan sumber sitokin yang diperlukan untuk memicu fibroplasia dan angiogenesis. Fibroblas membentuk matriks ekstraseluler yang dibutuhkan untuk mendukung pertumbuhan sel. Pembuluh darah berfungsi untuk mengangkut oksigen dan nutrisi yang dibutuhkan dalam metabolisme sel.²⁶

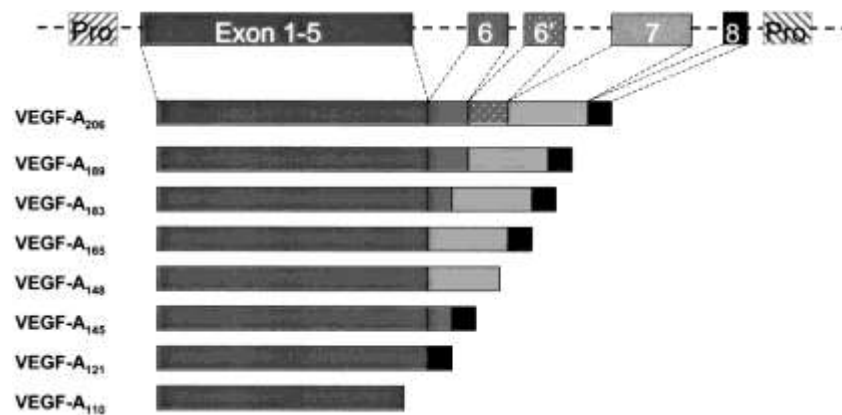
Kualitas dan kuantitas granulasi jaringan pada penyembuhan luka tergantung pada *biologic modifier*, level aktivitas sel target, dan lingkungan matriks ekstraseluler.^{30,31} *Biologic modifier* meliputi mediator lipid, produk-produk metabolik seperti oksigen, protein dan peptida. Peptida-peptida mitogenik yang berperan dalam proses ini adalah faktor-faktor pertumbuhan. Beberapa faktor pertumbuhan yang dicatat mempunyai peran penting dalam merangsang angiogenesis pada penyembuhan luka adalah *acidic fibroblast growth factor* (aFGF) atau basic fibroblast growth factor (bFGF), VEGF, TGF- β , angiopoietin, dan sel *mast tryptase*.²⁶ Data menunjukkan bahwa bFGF berperan mengatur angiogenesis pada tiga hari pertama, dan VEGF berperan penting dalam proses granulasi jaringan pada angiogenesis yang terjadi pada hari yang ke empat sampai ke tujuh.²⁸

Frank *et al.* melaporkan tingginya ekspresi mRNA VEGF selama proses penyembuhan luka, akan tetapi hal ini tidak terjadi pada tikus dengan DM.³² Tikus dengan DM akan mengalami penurunan ekspresi mRNA dan kesalahan regulasi VEGF yang berhubungan dengan gangguan penyembuhan luka.^{32,33} Shukla *et al.* melaporkan mengenai adanya penurunan sintesis faktor pertumbuhan, seperti VEGF pada tikus dengan DM.³⁴ Sedangkan pada tikus non-DM yang mengalami iskemik menunjukkan kerusakan neovaskularisasi diikuti oleh menurunnya ekspresi mRNA dan protein VEGF.³⁵ Penelitian yang dilakukan menunjukkan pentingnya peran VEGF dalam proses penyembuhan luka. *Vascular endothelial growth factor* dapat mempercepat proses penutupan luka, tikus db/db (tikus *obese diabetic*) yang diberi perlakuan menggunakan VEGF akan mengalami proses penutupan luka lebih cepat dibandingkan dengan kontrol. *Vascular endothelial growth factor* meningkatkan re-epitelialisasi, menurunnya ukuran luka, dan meningkatnya jumlah kulit normal pada luka. Tikus *non obese diabetic* (NOD) mengalami peningkatan re-epitalisasi lebih cepat dibandingkan dengan kontrol. *Vascular endothelial growth factor* juga meningkatkan kekakuan tensile pada tikus NOD maupun tikus diabetik (db/db).³³

Pengaruh Polimorfisme Gen VEGF pada Proses Penyembuhan Luka

Gen yang mengkode VEGF-A berukuran 14 kb yang terletak pada kromosom 6 dan mempunyai 8 exon dan 7 intron.³⁶ Marsh *et al.* telah melakukan studi fungsional dengan hasil yang mengindikasikan bahwa polimorfisme pada gen ini memberi pengaruh pada ekspresi

mRNA.³⁸ Ekspresi mRNA memengaruhi proses penyembuhan luka yang terjadi pada jaringan.³⁵ Amoli *et al.* telah melaporkan mengenai peran faktor genetik dalam ulkus diabetika.³⁹



Gambar 3. Gena VEGF . Gen VEGF Terletak di Kromosom 6 dengan 8 Exon dan 7 Intron.

Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) ikut berperan dalam masalah penyembuhan luka. Polimorfisme -2578*C/A gen VEGF A merupakan salah satu polimorfisme yang terjadi di daerah promotor 5' *untranslated region* (UTR) yang telah diidentifikasi.⁴⁰ Beberapa sisi yang mengikat faktor transkripsi ditemukan di dalam 5'UTR dan polimorfisme pada daerah ini menyebabkan terjadinya perbedaan ekspresi VEGF.^{41,42} Promoter terletak di daerah *upstream* dari gen yang diregulasi dan merupakan tempat terikatnya aktivator atau faktor transkripsi.^{43,44} Daerah promotor VEGF merupakan target dari sejumlah sinyal, seperti hipoksia, onkoprotein, dan aktivator faktor pertumbuhan yang menginduksi ekspresi gen VEGF.⁴⁴ Kadar pH rendah dan peradangan juga dapat memicu ekspresi gen VEGF.⁴⁵

Penelitian Guerzoni *et al.* memberi pernyataan bahwa polimorfisme -2578 *C/A gen VEGF-A akan menyebabkan menurunnya kadar VEGF-A yang mempengaruhi proses angiogenesis.^{46,47} Variasi gen VEGF-A merupakan kandidat penyebab berkembangnya ulkus diabetika. Amoli *et al.* telah meneliti mengenai polimorfisme gen VEGF-A pada promotor, yaitu -2578*C/A dan 7*C/T.³⁸

Dalam penelitiannya Amoli *et al* mendapatkan bahwa ada hubungan antara polimorfisme -2578*C/A terhadap kejadian ulkus diabetika pada populasi Iran. *Vascular Endothelial Growth Factor-A* mampu menginduksi vasopermeabilitas pada mikrovaskulatur dermal lebih baik daripada histamin. Selain itu juga dapat menginduksi kolagen untuk melakukan pembersihan matriks, memfasilitasi proses migrasi dan mendukung pertumbuhan sel endotel.

Pada pemeriksaan polimorfisme -2578*C/A ditemukan bahwa ada perbedaan signifikan yang terlihat pada tingkat genotip dan *allelic* antara kelompok kontrol dan normal. Kelompok pembawa *allele* A minor memberikan efek protektif, dimana pasien DM tipe 2 yang membawa *allele* ini mempunyai risiko yang kecil untuk dapat terkena ulkus diabetika. Marsh *et al.* melaporkan bahwa individu pembawa *allele* A menunjukkan ekspresi mRNA VEGF-A yang lebih tinggi dibanding individu tanpa *allele* A.³⁸ Individu dengan DM tipe 2 yang mempunyai frekuensi *allele* A lebih sedikit akan mengalami tidak cukupnya angiogenesis sehingga menyebabkan berkembangnya ulkus diabetika. Sedangkan pemeriksaan polimorfisme gen

7°C/T tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada individu normal dan dengan DM tipe 2.

Penutup

Vascular Endothelial Growth Factor-A merupakan salah satu faktor pertumbuhan penting yang memicu angiogenesis pada proses penyembuhan luka. Variasi gen VEGF-A merupakan salah satu kandidat yang berperan penting dalam berkembangnya ulkus diabetika. Kurangnya kadar VEGF-A pada individu dengan DM mengakibatkan tidak cukupnya proses angiogenesis sehingga terjadi penghambatan penyembuhan luka.

Daftar Pustaka

1. World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2006.
2. Craig ME., Hattersley A., Donaghue K C., Craig ME., Hattersley A. ISPAD Clinical practice consensus guidelines compendium definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes* 2009 ; 10 Suppl 12:3–12.
3. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, Seventh edition. 2015. URL: www.diabetesatlas.org
4. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2013; 36 Suppl 1:67-74.
5. Conget, I. Diagnosis , classification and pathogenesis of diabetes mellitus. *Rev Esp Cardiol*.2002; 55(5):528-35.
6. Cavanagh P., Lipsky B., Bradbury A. Treatment for diabetic foot ulcers. *Lancet* 2005; 366(9498):1725–35.
7. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. Management of diabetic foot infections. *Med Mal infect* 2007; 37: 14-25.
8. Hena J. Studies on bacterial infections of diabetic foot ulcer. *Afr J Clin Expert Microbiol* 2010 ; 11(3):146–9.
9. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Prevention foot ulcer in patients with diabetes. *JAMA* 2005 ; 293: 217-28.
10. Rodrigues J, Mitta, N. Diabetic Foot and Gangrene. In: Vitin A. (Ed). *Gangrene-current concept and management options*, 2011 pp 121–44. Available from: URL: <http://www.intechopen.com>.
11. Lobman R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K., Schiweck S, Lehnert H. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia*. 2002 ; 45:1011-6.
12. Bao P, Kodra A, Tomic-canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2010 ; 153(2):347–58.
13. Tellechea A, Lea E, Veves A, Carvalho E. Inflammatory and angiogenic abnormalities in diabetic wound healing : Role of neuropeptides and therapeutic perspectives. *Circ Vasc J*. 2010 ; 3:43–55.
14. Martin P. Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276:75–81.
15. Orsted HL, Keast D, Forest-Lalande L, Mégie M.F. Basic principles of wound healing. *Wound Care*. 2011 ; 9(2):4-12.
16. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 2005 ; 366:1736–43
17. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound Healing. *N Engl J Med*. 1999 ; 341:738-46.
18. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*. 2009 ; 37 (5): 1528-42.
19. Kleinman HK, Malinda KM. Role of angiogenesis in wound healing. In: *Angiogenesis inhibitors and stimulators: potential therapeutic implications*. Landes Bioscience. Georgetown, USA. 2000. p.102-8.
20. Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech*. 2003 ; 60:107-14.
21. Bauer SM, Bauer RJ, Liu ZJ, Chen H, Goldstein L, Velazquez OC. Vascular endothelial growth factor-C promotes vasculogenesis, angiogenesis, and collagen constriction in threedimensional collagen gels. *J Vas Surg*. 2005 ; 41:699-707.

22. Bategay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, Sage H., Pech M. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro. *J Cell Biol.* 1994 ; 125(4):917–28.
23. Hsu A, Mustoe TA. The principles of wound healing. In: *Plastic surgery secrets plus Chapter 1.* Elsevier Saunders. Philadelphia.2011. p.3-7.
24. Wild T, Rahbarnia A, Kellner M, Sobotka L, Ebelein T. Basics in nutrition and wound healing. *Nutrition*, 2010 ; 26: 862-66.
25. Beck LJr, D'Amore PA. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J.* 1997 ; 11:365-73.
26. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatology.* 2000 ; 5(1):40–6.
27. Hoeben ANN, Landuyt B, Highley M S, Wildiers H, Oosterom ATVAN, Bruijn E ADE. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.*2004 ; p.3-7. 56(4):549–80.
28. 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. *AJP.* 1998 ; 152:1445-52.
29. Wilgus TA, DiPietro LA. Complex roles for VEGF in dermal wound healing. *J Invest dermatology.*2012 ; 132(2):493–4.
30. Pecoraro RE, Ahroni JH, Boyko EJ, Stensel VL. Chronology and determinants of tissue repair in diabetic lower-extremity ulcers. *Diabetes*, 1991 ; 40(10):1305–13.
31. Juliano RL, Haskill S, Carolina N. Mini-review signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 1993 ; 120(3):577–85.
32. Clark RA, Tonnensen MG, Gailit J, Cheresch DA. Transient functional expression of avf3 on vascular cell during wound repair. *Am J Pathology.* 1996 ; 148(5):1407-21.
33. Frank S, Hübner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J Biol Chem.* 1995 ; 270(21):12607-18.
34. Rico T, Green J, Kirsner RS. Vascular endothelial growth factor delivery via gene therapy for diabetic wounds : first steps. *J Invest Dermatology.* 2009 ; 129(9):2084.
35. Shukla A, Dubey MP, Srivastava R, Srivastava BS. Differential expression of proteins during healing of cutaneous wounds in experimental normal and chronic models. *Biochem Biophys Res Com.* 1998 ; 244:434-9.
36. Rivard A, Silver M, Chen D, Kearney M, Magner M, Annex B, Peters K, Isner JM. Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *Am J of pathol*, 1999 ; 154(2):355–63.
37. Sfar S, Saad H, Mosbah F, Chouchane L. 2009. Combined effects of the angiogenic genes polymorphisms on prostate cancer susceptibility and aggressiveness. In: Bao P, Kodra A, Tomic-canic M, Golinko M S, Ehrlich HP, Brem H. 2010. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res.* 153(2):347–58.
38. Marsh S, Nakhoul FM, Skorecki K, Rubin A, Miller BP, Leibur R. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor is markedly decreased in diabetic individuals who do not develop retinopathy. *Diabetes Care.* 2000 ; 23:1375-80.
39. Amoli MM, Hasani-Ranjbar S, Roohipour N, Sayahpour FA, Amiri P, Zahedi P, et al. VEGF gene polymorphism association with diabetic foot ulcer. *Diabet Res Clin Practice.* 2011; 93(2): 215-9
40. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel polymorphisms in the promoter and 5'UTR regions of human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol.* 1999 ; 60:1245-9.
41. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Yi C, Eun-Chung P, Naifang L et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell.* 1998 ; 94: 715–25.
42. Bhanoori M, Babu KA, Reddy NGP, Rao KL, Zondervan K, Deenadayal M, et al., The vascular endothelial growth factor (VEGF) 1405G>C 50-untranslated region polymorphism and increased risk of endometriosis in South Indian women: a case control study. *Human Reprod.* 2005; 20(7):1844–9.

43. Karni S, Felder. Analysis of biological networks: Transcriptional networks-promoter sequence analysis. 2007. Available from:URL: <http://www.cs.tau.ac.il/~roded/courses/bnet-a06/lec11.pdf>.
44. Joško J, Mazurek M. Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Med Sci Monit.* 2004 ; 10(4):89–99.
45. Garret TA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) regulation of endothelial cell behavior through the Rho family of small GTPases. Chapel Hill. 2007. pp.1-203.
46. Guerzoni AR, Biselli PM, de Godoy MF, Souza DRS, Haddad R, Eberlin MN. et al. Homocysteine and MTHFR and VEGF gene polymorphisms: Impact on coronary artery disease. *Aq Bras Cardiol.* 2009. 92(4):249-54.
47. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV. et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2002 ; 13: 260-4.