

## VAI TRÒ CỦA GLYCOSAMINOGLYCAN VÀ HYDROPROLIN TRONG LIỀN VẾT THƯƠNG

Nguyễn Ngọc Tuấn, Nguyễn Thị Hương

Bệnh viện Bông Quốc gia Lê Hữu Trác

### 1. ĐẠI CƯƠNG LIỀN VẾT THƯƠNG

Liên vết thương là một quá trình phức tạp, có sự tham gia của nhiều loại tế bào, xảy ra trên da, nhằm mục đích phục hồi hàng rào bảo vệ của cơ thể. Quá trình này bao gồm các nỗ lực phối hợp của nhiều loại tế bào như Keratinocytes, fibroblasts, tế bào nội mô, đại thực bào và tiểu cầu. Sự di chuyển, xâm nhập vào nơi tổn thương, tăng sinh và biệt hóa của các tế bào này sẽ đạt đến đỉnh điểm trong một đáp ứng viêm, sự hình thành mô mới và cuối cùng là đóng vết thương. Quá trình phức tạp này được thực hiện và điều chỉnh bởi một mạng tín hiệu phức tạp không kém, liên quan đến nhiều yếu tố tăng trưởng (GF - Growth factor), cytokine và chemokine [1].

Sự thành công của liền vết thương phụ thuộc vào các GF, cytokine và chemokine liên quan đến tích hợp phức tạp các tín hiệu, phối hợp các quá trình di chuyển của tế bào. Các polypeptide có hoạt tính sinh học gây nên sự thay đổi để tăng trưởng, biệt hóa và chuyển hóa của một tế bào đích. Chúng có thể hoạt động theo cơ chế Paracrine, Autocrine, Juxtacrine hoặc Endocrine và tác động đến hành vi của tế bào do sự gắn kết của chúng với các thụ thể bề mặt tế bào cụ thể hoặc gắn với

protein ma trận ngoại bào (Extracellular Matrix - ECM) [1-3].

Các GF là các phân tử tín hiệu nội sinh điều chỉnh các phản ứng của tế bào; do tiểu cầu, bạch cầu, nguyên bào sợi và tế bào biểu mô tiết ra [2, 3]. Ngay cả ở nồng độ thấp, các GF vẫn có tác động rõ rệt đến môi trường vi mô vết thương, dẫn đến sự gia tăng nhanh chóng trong việc di chuyển tế bào, tăng sinh và biệt hóa [4].

### 2. VAI TRÒ CỦA GAGs TRONG LIỀN VẾT THƯƠNG

- *Khái niệm GAG*: Glycosaminoglycans (GAGs) bao gồm các chuỗi polysaccharide được tạo thành từ các đơn vị disaccharide lặp đi lặp lại và rất ưa nước. GAGs mang điện tích âm cao, kết hợp  $\text{Na}^+$  hoạt động thẩm thấu, làm cho một lượng lớn nước được hút vào cấu trúc của chúng. Do đó, GAGs chiếm một thể tích rất lớn so với khối lượng của chúng và tạo thành gel ở nồng độ rất thấp. Bản chất ưa nước của GAGs gây ra áp suất trương nở, cho phép ECM chịu được lực nén. GAG bao gồm acid Hyaluronic (HA), Chondroitin sulfate A và B, Keratin sulfate và Heparin sulfate, Proteoglycan (bao gồm Versican, Syndecans, Glypicans, Aggrecan) [5].

- *Vai trò của GAGs trong liền vết thương*

Liên vết thương gồm thành 3 giai đoạn:

Giai đoạn viêm (đặc trưng lâm sàng là đỏ, nóng, sưng, đau và mất chức năng) bắt đầu ngay lập tức khi tổn thương mô, được khởi phát và duy trì bởi quá trình (dòng

<sup>1</sup> *Chịu trách nhiệm*: Nguyễn Ngọc Tuấn, Bệnh viện Bông Quốc gia Lê Hữu Trác

Email: ngoctuan64@gmail.com

Ngày nhận bài: 13/5/2021

Ngày duyệt bài: 18/6/2021

thác) đông máu, con đường acid Arachidonic, tạo ra các GF và cytokine.

Giai đoạn tăng sinh bắt đầu khoảng 2 - 3 ngày sau khi bị thương, biểu hiện sự tập trung nguyên bào sợi. Tế bào này tăng sinh, tăng tổng hợp Glycosaminoglycan, Proteoglycan, ma trận ngoại bào (ECM) mới của mô hạt và collagen. Trong quá trình tăng sinh, nguyên bào sợi, tế bào sừng và quần thể tế bào nội mô cũng được kích thích để tăng số lượng.

Giai đoạn trưởng thành đặc trưng bởi sự sản sinh collagen mới từ tuần đầu tiên cho đến tuần thứ sáu. Quá trình tái tạo collagen thành cấu trúc có tổ chức hơn để tăng độ bền kéo vết thương [6].

Chất nền ngoại bào (Extracellular Matrix- ECM) có vai trò quan trọng trong các quá trình chữa lành vết thương phức tạp. ECM hỗ trợ kiến trúc cho các mô và là nền tảng cho các tế bào và phân tử điều chỉnh tín hiệu giữa và nội bào. ECM là các phân tử được tiết ra tạo thành vi môi trường tế bào và bao gồm một phức hợp động của Glycoprotein, collagen, Glycosaminoglycan (GAGs) và Proteoglycan (PG). GAG Hyaluronan (HA) có vai trò trong việc kiểm soát quá trình chữa lành vết thương.

Chức năng của ECM tạo điều kiện thuận lợi cho việc sửa chữa vết thương hoặc trực tiếp bằng cách điều chỉnh các khía cạnh quan trọng của hành vi tế bào như kết dính, di chuyển, tăng sinh, chuyển hóa, biệt hóa và tồn tại, hoặc gián tiếp bằng cách điều chỉnh sự tiết / hoạt hóa protease ngoại bào hoặc bằng cách điều chỉnh hoạt động của yếu tố tăng trưởng [7].

Trong quá trình cấu trúc ma trận và sửa chữa vết thương qua trung gian tế bào, GAGs cấu trúc các protein lõi của một số PG liên kết với tế bào và ma trận, có vai

trò quan trọng trong việc điều phối bổ sung mô tại vết thương. GAG tự do được tiết ra một cách dồi dào bởi các nguyên bào sợi ở vết thương. Kosir và cs cho thấy 79,7% tổng số GAG được sulfat hóa có mặt ở dạng tự do; 15,6% gắn với protein lõi PG; Chondroitin sulfate (CS) chiếm 79,1% và Heparin sulfat (HS) tạo thành 28,7% tổng số GAG sulfat tự do. Ma trận (Perlecan, Decorin và Biglycan) và PG liên kết tế bào (syndecan-2) được cấu trúc bằng CS và HS. Một số PG trên bề mặt tế bào bị bong ra khỏi bề mặt tế bào dưới dạng phức hợp peptide-GAG nhỏ, sẽ khuếch tán đến một vùng xa hơn vết thương. Heparanase-1 và -2 giải phóng HS và các GF phức tạp của chúng trong việc tái tạo vết thương [5].

Trong số các đại phân tử ECM khác nhau, GAG đóng vai trò rất quan trọng trong việc chữa lành vết thương. Chuỗi GAG thể hiện sự đa dạng về cấu trúc do quá trình sinh tổng hợp phức tạp được điều chỉnh chặt chẽ trong các hệ thống sinh học, cho phép các GAG biến đổi, tương tác có chọn lọc với nhiều loại phối tử khác nhau theo cách được kiểm soát về mặt không gian và thời gian.

Trong giai đoạn tăng sinh của quá trình liền vết thương (LVT), nguyên bào sợi và các tế bào trung mô khác xâm nhập vào vị trí viêm của vết thương để giải phóng các GF cần thiết cho việc kích thích tăng sinh tế bào. Tế bào nội mô hình thành các mạch máu và GAGs (HA, Chondroitin sulfate - CS), Dermatan sulfate (DS) cũng thay đổi về mức độ tổng hợp. Ban đầu, HA được các nguyên bào sợi tổng hợp một lượng lớn trong 2 tuần, sau đó là mức DS và CS, PGs tăng lên. Dần dần, khi sự tăng sinh của các tế bào đạt đến mức ổn định, các PG, Heparin sulfat (HS) sẽ tăng cao trong vết thương. PG sulfat hóa với CS và DS hỗ trợ quá trình trùng hợp collagen, và HS PGs trên tế bào có thể tạo ra các điểm neo

vào chất nền xung quanh. Sự phân hủy PG bởi các protease trong vết thương có thể giải phóng các đoạn GAG-peptide điều chỉnh quá trình LVT.

Ví dụ, CS và DS có thể điều chỉnh hoạt động GF và kích thích sản xuất NO, do đó, có thể điều chỉnh quá trình tạo mạch. HS có thể kích thích giải phóng IL-1, IL-6, PGE2 và TGF- $\beta$  và góp phần để điều chỉnh các hiệu ứng proangiogenic trong các mô [8]

Glycosaminoglycans (GAG) là các phân tử nền ngoại bào có vai trò quan trọng trong việc kiểm soát tất cả các giai đoạn LVT, chẳng hạn như chất trung gian hiệu quả của quá trình tạo mạch và viêm, thúc đẩy quá trình phục hồi vết thương bằng cách kích thích tạo mô hạt, tạo mạch và tái tạo biểu mô. GAG tham gia vào các tương tác giữa tế bào và chất nền tế bào, trong quá trình tăng sinh và di chuyển của tế bào, trong quá trình truyền tín hiệu cytokine và GF, do đó điều chỉnh cục bộ các hoạt động sinh học của chúng [9].

GAG đóng một vai trò quan trọng trong việc liên kết với các cytokine và các GF cần thiết cho sự phát triển của tế bào, cũng như có thể liên kết với một số lượng lớn các thụ thể trên bề mặt tế bào [10].

GAGs có vai trò điều hòa đa dạng trong việc tạo ECM, điều hòa proteinase, điều hòa tế bào thông qua tác động của các yếu tố tăng trưởng, cytokine, và các yếu tố phiên mã, và ức chế proteinase trong hệ thống đông máu / tiêu sợi huyết liên quan đến việc sửa chữa vết thương [5].

#### *- Vai trò của HA trong LVT*

HA là GAG đơn giản nhất, nhưng khác với các GAG khác, nó không gắn với protein lõi PG và không được sulfat hóa. HA bao gồm các disaccharide GlcN và GlcA liên kết  $\beta$ 1-3- và  $\beta$ 1-4 với khoảng

10.000 disaccharide tập hợp lại để tạo thành HA có kích thước phân tử vượt quá 5 MDa. HA phân bố rộng rãi trong cơ thể. HA là một thành phần nổi bật của da và là một trong những thành phần phong phú nhất của nó với vai trò chính trong việc sửa chữa da. Mặc dù cấu trúc tương đối đơn giản, HA tương tác với nhiều loại ECM và protein tế bào, tác động lên một số quá trình sinh lý quan trọng bao gồm sửa chữa vết thương. HA cũng có đặc tính hút nước cao, có vai trò quan trọng trong quá trình hydrat hóa các mô, cung cấp một ma trận tương tác cao và ngậm nước có lợi cho sự tồn tại và di chuyển của tế bào [5]

HA duy trì hoạt tính sinh học đáng kể và trực tiếp thúc đẩy sự tăng sinh, di chuyển và biệt hóa của tế bào [7]. Acid Hyaluronic (HA), một thành phần chính của ECM, là một GAG lớn thu hút nước và được tìm thấy với số lượng tăng lên trong các mô bị tổn thương hoặc đang phát triển. HA kích thích sản xuất cytokine của đại thực bào, do đó thúc đẩy quá trình hình thành mạch [11].

HA có nhiều trong các vết thương trên da và thúc đẩy sự di chuyển của tế bào sừng vào vị trí vết thương để thực hiện tái biểu mô. HA (> 30 kDa) là một thành phần của cục máu đông fibrin ở các vị trí vết thương hiệp đồng với thrombin trong quá trình hình thành cục máu đông fibrin, làm giảm giai đoạn trễ của sự hình thành cục máu đông, và tăng tốc độ và mức độ hình thành cục máu đông. Cục máu đông fibrin là một ma trận tạm thời, giúp cầm máu và thu hút tiểu cầu, nguồn cung cấp nhiều GF đồng hóa (bao gồm TGF- $\beta$ ), hỗ trợ LVT [5].

HA oligosaccharides kích thích sửa chữa vết thương do tác động tới nguyên bào sợi thông qua tín hiệu tế bào trung

gian thụ thể RHAMM, CD44 và Toll. HA trọng lượng phân tử thấp là proangiogenic hiệp đồng với VEGF để thúc đẩy quá trình phục hồi vết thương. HA trọng lượng phân tử cao thúc đẩy quá trình chữa lành vết loét ở chân do tiểu đường thông qua tác động của IL-1020 với các nguyên bào sợi trưởng thành [5].

*- Vai trò GAG ở vết thương mạn tính:*

Vết thương mạn tính (VTMT) có sự rối loạn quá trình liền vết thương, trong đó có sự suy giảm các GF, rối loạn quá trình tổng hợp chất nền ngoại bào. Điều trị vết thương mạn tính phức tạp, đòi hỏi phối hợp nhiều biện pháp [4,5].

VTMT thường có đặc điểm là tổn thương dai dẳng và viêm kéo dài, tỷ lệ màng sinh học vi khuẩn và quá trình phân giải protein cao; suy giảm chức năng đại thực bào và phản ứng tạo mạch. Do tình trạng viêm kéo dài, có sự tập trung số lượng lớn bạch cầu trung tính. Bạch cầu trung tính có thể loại bỏ mô hoại tử và ngăn ngừa nhiễm trùng vi sinh vật. Khi viêm kéo dài, chức năng bạch cầu cũng bị thay đổi, sản xuất quá nhiều protease gây tổn thương mô, gây ra sự thoái biến ECM và các yếu tố tăng trưởng. Hậu quả là suy giảm hình thành mạch, vết thương sâu hơn và suy giảm liền vết thương.

Hiệu quả của việc sản xuất quá nhiều protease ở vết thương có thể bị ức chế bằng cách liên kết tĩnh điện với một số polyme anion như GAG. Tuy nhiên, ở VTMT, glycanase và protease có thể phá hủy GAG. Việc thiếu GAG trong các vết thương mạn tính có thể được khắc phục bằng cách bổ sung vật liệu có chứa GAG, chẳng hạn như polysaccharide tự nhiên, trực tiếp vào vị trí vết thương dưới dạng băng VT [9].

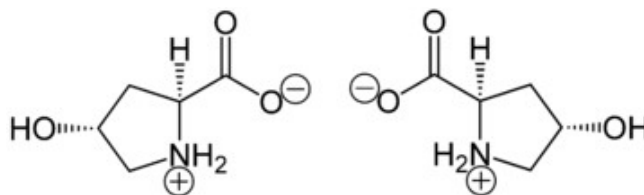
Một viêm dai dẳng làm xuất hiện số lượng lớn của bạch cầu trung tính ở vết thương mạn tính. Sản phẩm dịch tiết từ các bạch cầu trung tính, ngoài proteinases còn có protein gắn Heparin, phương hại đến LVT do gây ra sự thoái biến của chất nền và các GF, thúc đẩy thâm nhiễm bạch cầu trung tính vào vết thương. Elastase có nguồn gốc bạch cầu trung tính, cathepsin G, proteinase-3 và protein gắn Heparin là cation. Có giả thuyết rằng những tác động này có thể bị ức chế bằng cách liên kết với một số polyme anion như GAG, giúp thúc đẩy LVT [11].

### 3. VAI TRÒ CỦA HYDROXYPROLIN TRONG LIỀN VẾT THƯƠNG

Tổng hợp collagen đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn sớm của liền vết thương cũng như ở giai đoạn sửa chữa tiếp theo. Collagen là hợp chất chủ yếu của chất nền ngoại bào của da (chiếm 60 - 80% trọng lượng khô của tổ chức). Sự tổng hợp collagen bắt đầu rất sớm, có thể ngay từ ngày đầu sau tổn thương, thậm chí sau 12h, kéo dài 14 - 21 ngày với vết thương cấp tính. Sau 21 ngày, tỷ lệ tổng hợp collagen ở mức bình thường [12].

Collagen có vai trò quan trọng trong quá trình liền vết thương. Có rất nhiều nghiên cứu về collagen ở các khía cạnh khác nhau: ở mức phân tử, cấu trúc, chuyển hóa, bệnh lý. Tuy nhiên, vẫn chưa có phương pháp định lượng trực tiếp collagen mà phải qua đánh giá gián tiếp, thông qua định lượng hydroxyprolin.

Năm 1902, Hermann Emil Fischer cô lập Hydroxyprolin từ thủy phân Gelatin. Năm 1905, Hermann Leuchs tổng hợp được một hỗn hợp racemic của 4-hydroxyprolin. Hydroxyprolin khác proline bởi sự hiện diện của một hydroxyl (OH) nhóm gắn liền với các nguyên tử carbon gamma.



Hình 1: Cấu trúc của Zwitterionic (2 *S*, 4 *R*)-4-hydroxyprolin (trái) và (2 *R*, 4 *S*)-4-hydroxyprolin (bên phải) [13]

Hydroxyprolin (OH - pro) là acid amin đặc trưng của collagen, nó chỉ có mặt dạng vết trong một số protein khác như elastin, cholinesterase... OH - pro chiếm khoảng 10 - 13% tổng số các acid amin của collagen. Hàm lượng OH - pro ở nước tiểu chỉ phản ánh sinh tổng hợp và thoái hóa collagen, chủ yếu là collagen xương. Hàm lượng OH - pro huyết thanh chủ yếu phản ánh quá trình viêm. Hàm lượng OH - pro mô liên quan chặt chẽ tới quá trình collagen hóa tại vết thương.

### Sản xuất và chức năng

Hydroxyprolin được sản xuất bởi hydroxyl hóa proline bởi enzyme prolyl hydroxylase sau tổng hợp protein. Các enzyme xúc tác phản ứng xảy ra trong lumen của lưới nội chất. Mặc dù nó không phải là trực tiếp kết hợp thành protein, hydroxyprolin gồm khoảng 4% của tất cả các acid amin được tìm thấy trong các mô động vật.

Hydroxyprolin là một thành phần chính của protein collagen. Hydroxyprolin và proline đóng vai trò quan trọng cho sự ổn định collagen. Trong collagen kinh điển, bộ ba XAA-Yaa-Gly, một proline chiếm vị trí Yaa hydroxy hóa để cung cấp cho một chuỗi XAA-Hyp-Gly. Điều này sửa đổi của dư lượng proline, tăng sự ổn định của collagen xoắn ba. Ban đầu nó đã được cho rằng sự ổn định là do các phân tử nước tạo thành một mạng lưới liên kết hydro liên kết các nhóm prolyl hydroxyl và nhóm carbonyl chính chuỗi. Sau đó, sự gia tăng

ổn định là chủ yếu thông qua các hiệu ứng stereoelectronic và hydrat hóa mà dư lượng hydroxyprolin cung cấp rất ít hoặc không có sự ổn định thêm [13].

Hydroxyprolin do có cấu trúc đặc thù chứa nhóm hydroxy (OH) nên có vai trò quan trọng trong việc ổn định cấu trúc không gian của collagen. Ngoài ra, Hydroxyprolin còn có mặt trong thành phần của sợi elastin, một chất cũng được tăng tổng hợp rất nhiều trong giai đoạn liền vết thương. Tuy nhiên, lượng Hydroxyprolin có mặt rất ít trong các loại protein khác, nên Hydroxyprolin được coi như chất chỉ điểm để xác định lượng collagen/elastin tại mô cần định lượng. Do vậy, có thể định lượng Hydroxyprolin để theo dõi quá trình tổng hợp collagen tại vết thương.

Hydroxyprolin là một acid amin không thiết yếu được tìm thấy trong collagen, đóng một vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp collagen và ổn định nhiệt động của cấu trúc xoắn ba chiều của collagen. Hydroxyprolin đặc hiệu cho collagen, được coi như biochemical marker; phản ánh sự tổng hợp của collagen tại vết thương và đóng vai trò quan trọng trong việc LVT [13-17].

### Hàm lượng Hydroxyprolin trong liền vết thương

Sinh học quá trình liền vết thương bình thường:

Hydroxyprolin là thành phần chính, cần thiết cho sự tổng hợp của collagen trong

quá trình chữa lành vết thương. Collagen đóng một vai trò quan trọng trong các bước sửa chữa mô, nó hoạt động như một giàn giáo ngoại bào chính ở những người bình thường. Sự thiếu hụt protein trong quá trình liền vết thương có thể làm giảm sự phát triển mao mạch mới, tăng sinh nguyên bào sợi, tổng hợp collagen và proteoglycan cũng như tái tạo và co lại vết thương và đôi khi dẫn tới ức chế hệ thống miễn dịch.

Bình thường, cấu trúc tế bào ổn định của chất nền ngoại bào là một dấu hiệu của quá trình chữa lành vết thương hoàn toàn sau một chấn thương mô. Phá vỡ collagen giải phóng hydroxyprolin tự do và các peptide tự do, do đó hydroxyprolin như một dấu hiệu hóa sinh trong quá trình chữa lành vết thương. Giảm nồng độ của Hydroxyprolin trong mô có thể làm thay đổi cấu trúc của collagen từ đó làm chậm quá trình sửa chữa mô [18].

Xác định hàm lượng Hydroxyprolin như một dấu ấn sinh học nói chung là dễ dàng, ít tốn thời gian và tiết kiệm hơn so với việc định lượng các marker liền vết thương khác. Tăng hàm lượng hydroxylin trong mô phản ánh sự tăng nồng độ của collagen.

Sự thay đổi nồng độ hydroxyprolin trong quá trình liền vết thương: Collagen được tổng hợp chủ yếu bởi nguyên bào sợi. Các tế bào này được xuất hiện ở vết thương sớm, trong vòng 12h, hoặc 1 đến 2 ngày đầu, tăng sinh fibronectin mạnh, đồng thời bắt đầu tổng hợp collagen.

Nghiên cứu gần đây cho thấy collagen typ III được tổng hợp trong khoảng 10 h đầu sau tổn thương. Ở vết thương cấp tính, trong vòng 2 - 3 ngày đầu, các NBS chủ yếu hướng vào việc sao chép, di tản hơn là tổng hợp collagen. Do vậy, hàm lượng hydroxyprolin lúc này còn thấp. Sau 7 - 10 ngày, các tế bào sợi, nguyên bào sợi chiếm ưu thế tại vết thương, tăng cường

tổng hợp các protein ngoại bào, trong đó chủ yếu là collagen. Hoạt tính tổng hợp của collagen lúc này thường đạt tới cực đại, hàm lượng collagen lúc này thường cao, tương ứng hàm lượng hydroxyprolin tăng cao. Tiếp sau, các NBS vẫn tăng tổng hợp collagen, tuy nhiên tốc độ tổng hợp không mạnh như trước. sau 21 ngày, tỷ lệ tổng hợp, mật độ collagen ở vết thương quay về mức bình thường. Đây là giai đoạn trưởng thành các sợi collagen, diễn ra chủ yếu với sự hình thành liên kết ngang [15].

VTMT có sự mất cân bằng giữa quá trình tổng hợp và giáng hóa collagen do mất cân bằng giữa các proteinase và các chất ức chế chúng, do sự lão hóa các nguyên bào sợi, hậu quả là sự tổng hợp collagen bị ức chế [12, 19, 20].

Nghiên cứu của Brem H ghi nhận những rối loạn khi sinh thiết bờ mép VTMT hay gặp là biểu bì tăng sinh/sừng hoá; xơ hóa da; tăng tổng hợp procollagen. Nguyên bào sợi từ vị trí này có biểu hiện suy giảm khả năng di chuyển. Mép VT không liền có một cấu hình biểu hiện gen cụ thể [15].

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Zhang Y, Wang T, Dong J (2016)**; Growth factor therapy in patients with partial-thickness burns: a systematic review and meta-analysis. *Wound J.* 2016 Jun; 13(3): 354-66.
2. **Stephan Barrientos; Olivera Stojadinovic, Michael S. Golinko, Harold Brem, Marjana Tomic-Canic (2008)**, Growth factors and cytokines in wound healing; *Wound Repair and Regeneration*Wound, (2008), 16, 585-601.
3. **Sho Yamakawa & Kenji Hayashida.** Advances in surgical applications of growth factors for wound healing; *Burns & Trauma*, volume 7, Article number: 10 (2019).
4. **Cervelli V. (2010)**. "Tissue regeneration in loss of substance on the lower limbs through use of platelet-rich plasma, stem cells from adipose tissue, and hyaluronic acid". *Adv Skin Wound Care*, 2010. 23(6): p. 262-72.

5. **James Melrose** (2016); Glycosaminoglycans in Wound Healing; SAGE journal, December 12, 2016 ; <https://doi.org/10.4137/BTRI.S38670>.
6. **Jorge de la Torre Jorge**. *Phases of wound healing*. Wound Healing. 2007;3:1-10.
7. **Brian M. Sicari, Stephen F. Badylak** (2014); Extracellular Matrix as a Bioscaffold for Tissue Engineering; in Tissue Engineering (Second Edition), 2014.
8. **Shibnath Ghatak, Edward V. Maytin, Judith A. Mack, Vincent C. Hascall, Iliia Atanelishvili, Ricardo Moreno Rodriguez, Roger R. Markwald, and Suniti Misra** (2015), Roles of Proteoglycans and Glycosaminoglycans in Wound Healing and Fibrosis; Volume 2015 |Article ID 834893 [<https://doi.org/10.1155/2015/834893>]
9. **Juin-Hong Cherng**; The Strategies of Natural Polysaccharide in Wound Healing; November 2018; DOI: 10.5772/intechopen.80812; In book: Wound Healing.
10. **V. Salih, D. Thomas** (2013); Fundamentals of cell and matrix biology for tissue engineering, in Standardisation in Cell and Tissue Engineering, 2013.
11. **Philip Peplow** (2005). Glycosaminoglycan: A candidate to stimulate the repair of chronic wounds; August 2005; Thrombosis and Haemostasis 94(1):4-16.
12. Hart J (2002); Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. J Wound Care. 2002 Jun; 11(6):205-9.
13. **Guilherme F. Caetano, Marcio Fronza, Marcel N. Leite, Ary Gomes & Marco Andrey Cipriani Frade** (2016); Comparison of collagen content in skin wounds evaluated by biochemical assay and by computer-aided histomorphometric analysis; Volume 54, 2016 - Issue 11.
14. **Amit Kuma Srivastava, Piush Khare, Navdeep Raghuvanshi et al** (2016); Hydroxyprolin: A Potential Biochemical Marker and Its Role in the Pathogenesis of Different Diseases. Curr Protein Pept Sci. 2016; 17(6):596-602.
15. **Brem H, Stojadinovic O, Diegelmann RF et al** (2007). "Molecular markers in patients with chronic wounds to guide surgical debridement", *Mol Med* 13: 30-39
16. **Kowalewski, K.; Yong, S.** Hydroxyprolin in healing dermal wounds of normal and hypothyroid rats. *Acta. Endocrinol. (Copenh)*., 1967, 54(1), 1-7.
17. **Kumar R.; Katoch S.S.; Sharma S.**  $\beta$ -Adrenoceptor agonist treatment reverses denervation atrophy with augmentation of collagen proliferation in denervated mice gastrocnemius muscle. *Indian. J. Exp. Biol.*, 2006, 44(5), 371-376.
18. **Alamshah, S.M., A. Hemmati, and Z. Nazari**, Assessment of Hydroxyproline Levels in Non-Ischemic Diabetic Foot Ulcers During Recovery. A Prospective Case-Control Study. *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases*, 2015. 22(4): p. 361-366.
19. **George Han and Roger Ceilley** (2017). "Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments". *Adv Ther.* 2017; 34(3): 599-610.
20. **Robert Nunan, Harding K. G. and Martin P.** (2014) "Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity"; *Disease Models & Mechanisms* 7, 1205-1213.