

Effect of Exogenous Collagen on Re-epithelialization of Skin Wound in Rabbits

Jin Seok Jeon[†]

Department of Biology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

This study was performed to assess the effects of exogenous collagen gel for the re-epithelialization of partial thickness skin wound healing in rabbits. Adult male rabbits (New Zealand White Rabbit) 1.5~2 kg, were used for experimental animals. Skin wounds (1.5×2 cm length) were created bilaterally on the flank of 10 rabbits and then treated a periods of 9 days. Wounds on the experimental site were treated with exogenous collagen gel as well as fabric material gauze dressing. Control site wounds were covered with fabric material gauze dressing alone. Histological findings indicated that the epithelial migration of the experimental site of rabbits was far more rapid than that in the other control wound sites. Moreover, exogenous collagen gel provided a moist environment to keep wound clean, and facilitate keratinocyte proliferation. The wound dressed with exogenous collagen gel demonstrated a significant increase in the healing rate and re-epithelialization.

Key Words: Skin wound, Exogenous collagen gel, Keratinocyte, Re-epithelialization

서 론

피부가 손상될 경우 초기 염증반응을 거치며 상피세포의 증식이 일어나고, 진피층에서 섬유모세포 (fibroblast)의 증식과 더불어 교원섬유 (collagen fiber) 조직의 재형성을 통해 피부 창상이 치유된다⁷⁾. 손상된 피부조직의 완전한 치유는 상피세포층의 재형성과 결합조직의 재생과정으로 분류할 수 있으며, 상피세포층의 재생을 위해 손상된 결합조직의 증식과 기저막의 형성은 매우 중요하다^{14,65)}.

피부 상피층의 손상으로 인해 손상면 (wound margin)의 각질형성세포 (keratinocyte)는 이동되고 과증식 (hyperproliferation)의 특징적인 변화과정을 거치게 되며⁹⁾, 재상피화 (re-epithelialization) 과정은 손상 이후 수 시간 내에 시작된다⁴⁰⁾. 상처치유를 위한 재상피화는 상피세포의 증식을 통해 상처면을 따라 이동하는 선도세포 (leading cells)가 서로 결합할 때까지 지속되고^{8,56)} 각질형성세포의 증식과 상처면으로의 확장은 세포외기질의 손상 부위 분포 양상에 따라 다양하게 반응한다⁶¹⁾. 또한 각질형성세포의 수복성 이동은 세포의 기질 환경에 의해 급진적인 영향을 받는 것으로 증명되었다^{34,60)}.

세포외기질 중 가장 풍부한 구성 성분인 교원질은 주요한 구조 단백질로서¹⁴¹⁾ 최근의 연구 결과 높은 생체친화성과 낮

은 항원성이 있는 것으로 확인되었으며^{22,50)}, 화상 및 피부 상처의 치유와 더불어 세포분화 및 조직재생을 촉진하는 것으로 보고되었다^{2,5,28,39)}. 특히 교원질은 세포와 결합하여 조직의 구조적 지지인자로 작용하며 이들 물질에 대한 교원질 수용체가 상피세포 및 미분화 중간엽세포 (mesenchymal cell)에 존재한다. 따라서 다양한 세포의 성장, 형태형성, 분화 등은 교원질의 접착성 기능에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 특히 fibronectin과 laminin 등은 특이적으로 교원질과 결합하며, 이들 물질 중 손상치유와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 fibronectin은 교원질과의 상호 결합을 통해 조직의 치밀한 결합을 유지하는 매우 중요한 역할을 담당한다^{12,13,25,38)}.

본 연구에서는 상피조직과 결합조직 형성을 촉진하는 것으로 알려진 교원질의 상처치유 효과를 알아보기 위해 외인성 교원질 겔을 사용하였으며, 실험적으로 유도된 가토 피부의 개방성 창상 위에 이들 물질을 도포하여 상처치유 과정 중 상피세포의 이동과 증식 및 기저막 형성에 대한 세포 미세구조를 확인하였다. 또한 피부 상처관리를 위한 적절한 드레싱 도구로서 외인성 교원질 겔의 효용성을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

실험 동물은 대한 동물사육 센터에서 공급하는 8주령 (체중 1.5~2 Kg)의 건강한 웅성 가토 (New Zealand White Rabbit) 10마리를 분양 받아 1주일간의 적응 사육 후 실험 재료로 사

*논문 접수: 2001년 2월 2일

수정재접수: 2001년 3월 21일

[†]별책 요청 저자

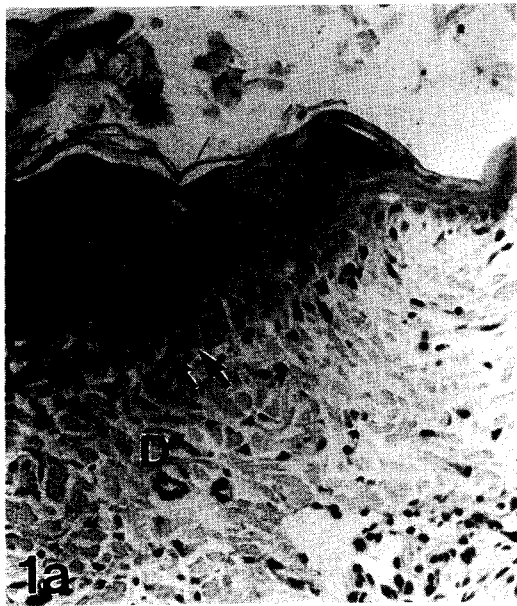


Fig. 1. Light micrographs of control wound sites in rabbits. a. Migrating epithelial cells (arrows) spreading over the wound surface. The evidence of edema and inflammatory reaction is visible within papillary dermal layer. $\times 50$. b. Keratinocytes (K) having prickle-like cell processes are seen in wound surface, and activated fibroblast is observed in the papillary dermal layer. $\times 500$. S: scab, D: dermis.

용하였다. 이 실험 동물은 동일한 조건을 유지하기 위해 clean rack에 넣어 온도 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 에서 사육하였으며 사료(제일유지 제품)와 수분은 무제한 공급하였다. 외인성 교원질 겔은 엘피스 바이오텍(주)에서 생산 제공한 천연 추출 교원질을 사용하였다.

실험 동물의 피부를 절개하기 위해 수술 부위의 털을 모두 제거하고 소독한 후, 2% lidocaine을 사용하여 국소 마취하였다. 수술 부위는 양쪽 견갑하각(inferior border of scapular)에서 수평으로 5 cm 부위에 1.5×2 cm 넓이로 진피를 포함하여 절개하였고, 압박술로 지혈한 다음 상처 부위를 소독하였다. 절개된 견갑하각의 왼쪽 부위는 외인성 교원질을 도포하였으며, 오른쪽 부위는 대조 부위로 일반적인 상처소독을 시행하였다. 외인성 교원질은 수술 1일째부터 24시간 간격으로 9일째까지 상처 부위가 완전히 덮히게 도포하였고 이후 실험 부위와 대조 부위 모두 4점의 멸균 가아제로 상처 부위를 피복하였으며, 현미경 관찰을 위한 조직 채취는 수술 후 10일째 시행하였다.

2. 광학 및 전자현미경적 방법

실험 10일째 채취한 피부조직은 10% NBF(neutral buffered formaldehyde) 용액으로 24시간 고정한 후, ethanol로 탈수하였으며 xylene을 거친 다음 paraplant에 포매하였다. 포매한 조직은 마이크로톰으로 $5\ \mu\text{m}$ 두께로 절단한 후 hematoxyline-eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

투과형전자현미경 관찰을 위하여 채취한 각 피부조직은 1

mm^3 의 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde 용액(4°C , 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)에 2시간 고정하고, 1% osmium tetroxide 용액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 실온에서 2시간 후고정하였다. 고정된 시료를 50% ethanol에서 농도 상승순으로 탈수하였고, propylene oxide로 치환한 후 Poly/Bed 812 resin(Polysciences, USA) 혼합액에 포매하여 37°C 에서 12시간, 60°C 에서 48시간 동안 열중합시켰다. 제작된 시료는 ultramicrotome(LKB V형)으로 $1\ \mu\text{m}$ 두께의 절편을 만들어 toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였고, 60~80 nm의 초박절편을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색을 한 후, 투과형전자현미경(Hitachi H-7100)으로 관찰하였다.

결 과

1. 육안적 관찰

대조군의 경우, 손상초기 피부 절개면 가장자리 부위에서 부종과 염증성 반응으로 인한 피부 발적(redness) 현상이 관찰되었고, 실험 4일째까지 피부 절개면에서 경미한 피하출혈 현상이 확인되었다. 또한 피부 손상면 세포조직과 염증성 삼출물이 혼합된 가피는 실험 6일경부터 형성되기 시작하였으며, 이후 실험 완료일까지 완만한 상처 수축율로 최종적인 결합조직 수복과 상피 재형성은 확인할 수 없었다.

외인성 교원질 겔을 도포한 실험군의 경우, 실험 2일째부터 도포한 교원질과 염증성 삼출물이 결합된 가피가 확인되었고 이후 피부 절개면에서 특이적인 피하출혈은 관찰되지 않았다.

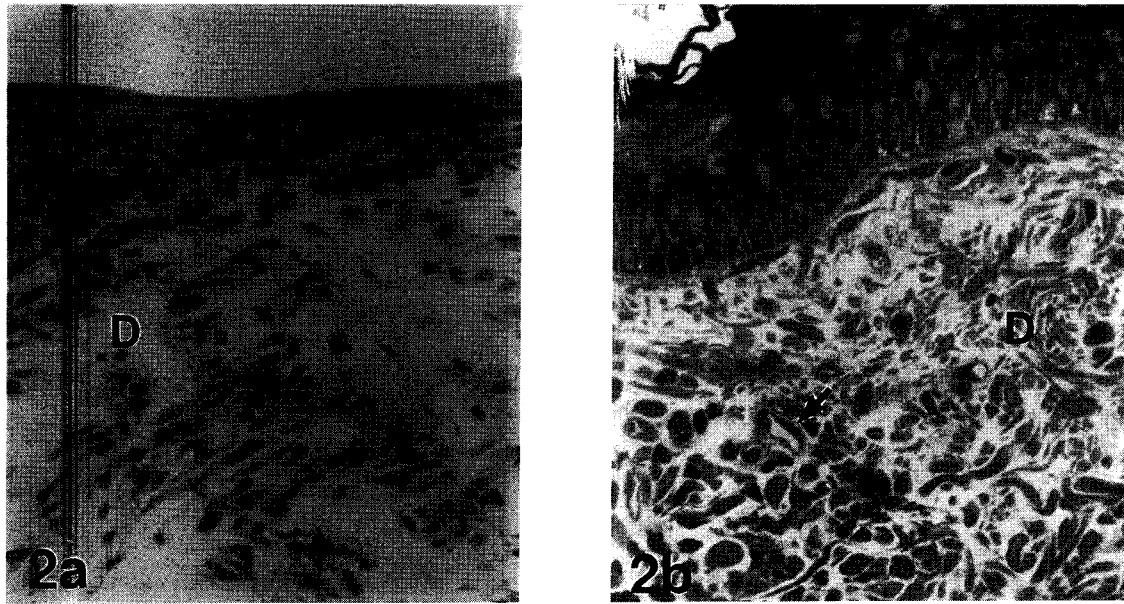


Fig. 2. Light micrographs of exogenous collagen gel treated wound sites in rabbits. **a.** The wound surface is thick covered with regeneration of epithelial tissues, and composed of seven or eight keratinocytes. $\times 80$. **b.** The papillary dermal layer is filled with newly formed granular tissues and blood vessels (arrow). $\times 240$. E: epidermis, D: dermis.

실험 5일경부터 손상 피부면의 상처 수축 현상이 관찰되었으며, 육안으로 확인 가능한 특이적인 염증반응은 확인되지 않았다. 최종적으로 실험 완료일에 새로운 육아조직과 상피조직이 잘 형성된 상처치유 반응을 확인할 수 있었다.

2. 광학현미경 관찰

대조군의 경우, 손상된 절개면 (incision margin)에 인접한 상피조직 아래의 결합조직에는 다수의 염증세포가 관찰되었고, 진피층에는 심각한 부종 현상이 관찰되었다. 손상된 절개면 기저층의 상피세포는 활발한 세포분열로 인한 상피층 비후 (hypertrophy) 현상이 관찰되었고, 비후된 상피조직은 손상면을 따라 상처재생을 위해 활발히 이동하는 것으로 확인되었다 (Fig. 1a). 상피세포 조직을 toluidine blue로 염색한 결과, 특징적으로 가시모양 세포 (prickle-like cell)의 형태를 나타내는 수많은 상피세포들이 상처조직의 구조적 재형성을 위해 이동하는 것으로 관찰되었다. 상피층과 진피층의 명확한 경계는 확인되지 않았으며, 이동하는 상피세포 밑으로 다수의 염증세포와 섬유모세포가 진피층 내부에서 관찰되었다 (Fig. 1b).

외인성 교원질 겔을 도포한 실험군의 경우, 재생 상피조직은 형성된 가피 밑에서 절개면을 따라 정상 상피층에 비해 얇은 3~4층의 상피조직층을 형성하며 빠르게 이동하여 도포 9일 후 결손 부위를 피복하였다 (Fig. 2a). 정상 상피층과 유사한 7~8층의 재생 상피층으로 이루어진 최초 손상 부위의 상피 각질층에서는 각질화 과정이 일어나며, 상피층과 진피층

의 경계면인 기저막의 형성이 명확히 관찰되었다. 또한 유두진피층 (papillary dermal layer)에서 잘 발달된 육아조직과 새로 형성된 다수의 모세혈관이 관찰되었다 (Fig. 2b).

3. 투과전자현미경 관찰

대조군의 경우, 상처 가장자리에서 상처면의 가피 밑으로 상피 재형성을 위한 특징적인 가시모양 형태의 각질형성세포들의 활발한 이동이 관찰되었으나, 이들 세포의 사상체에서 케라틴 세사 (keratin filament)의 발달은 명확하지 않았다 (Fig. 3a). 피부 손상면 기저층으로부터 이동 중인 이들 각질형성세포는 잘 발달된 핵과 세포소기관을 함유하며, 세포질 내에서 다수의 각질유리과립 (keratohyaline granules)이 관찰되었다. 각질형성세포에서 전자밀도가 높은 부착반 (macula adherens) 결합은 미약하였으나, 상처재생과 관련되는 영양물질이 이웃 세포로 직접 전달되는 통로인 인접 상피세포간의 넓은 공간이 형성되어 있었다 (Fig. 3b). 상피조직이 형성된 상처면 가장자리 표본을 관찰한 결과, 상피층 바로 밑 유두진피층에서 염증성 세포인 다수의 호산구와 섬유모세포들이 혼재되어 관찰되었다 (Fig. 3c). 각질형성세포의 부착반 결합과 반부착반 (hemidesmosome) 결합을 통한 완전한 상피층의 형성은 명확하지 않으며, 기저막 투명판 (lamina lucida)과 치밀판 (lamina densa)의 형성도 불완전 상태로서 상처재생이 계속 진행되는 단계로 관찰되었다 (Fig. 3d).

외인성 교원질 겔을 도포한 실험군의 경우 재생상피화가 이루어진 상피층에서 잘 발달된 각질층, 투과층, 과립층, 기저층

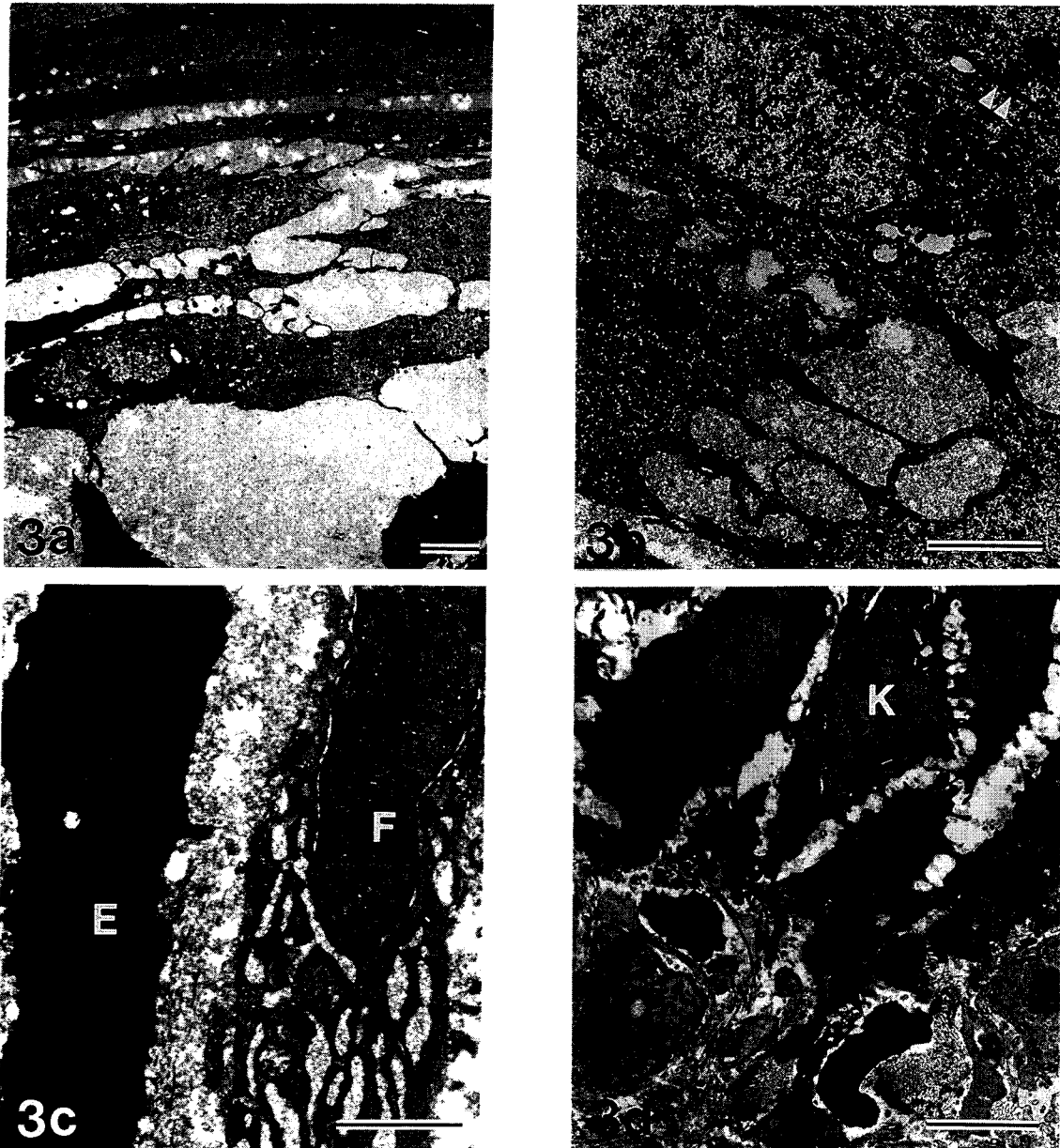


Fig. 3. Electron micrographs of control wound sites in rabbits. **a.** Migrating keratinocytes (K) are composed of three or four cell layers. These cells have thin and prickly-like cell processes that are joined together by cell junctions, and the cytoplasm contains amorphous granules and filamentous materials. Bar=4 μ m. **b.** The migrating keratinocytes (K) contains numerous tonofilaments (arrowheads) and keratohyaline granules (arrow) with varying sizes. In these cells, well developed desmosomal junctions are observed. Bar=2 μ m. **c.** The activated fibroblasts (F) and eosinophils (E) are seen in the papillary dermal layers. This portion of fibroblast contains dilated rough endoplasmic reticulum indicative of high bio-synthetic activity. Bar=2 μ m. **d.** Hemidesmosomes or other basement membrane like structures are not observed. Many inflammatory cells (arrows) are seen in the papillary dermal layers. K: keratinocyte. Bar=4 μ m.

의 형성이 관찰되었으며, 각 세포질 내에서는 전자밀도가 높은 수많은 장원섬유 (tonofilament)와 부착반이 관찰되었다. 기저층에서 확인된 각질형성세포들은 난원형 또는 원형의 발달된 핵과 세포소기관을 지니고 있으며 계속하여 과립층과 각질층으로 분화되는 것으로 확인되었고, 부착반 결합을 통해 치밀한 세포 결합을 이루고 있었다 (Fig. 4a, 4b).

재상피화 형성 부위 및 진피층의 잘 발달된 유두 진피층과 망상 진피층 (reticular dermal layer)에서는 외인성 교원질 도포 부위의 빠른 상처 수축과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각되는 다수의 근섬유모세포 (myofibroblast)가 관찰되었다 (Fig. 4c). 특징적인 반부착반은 상피와 진피를 연결해 주는 구조물로서 일정한 분포로 기저막에서 관찰되었고, 투명판과 치밀판의 완

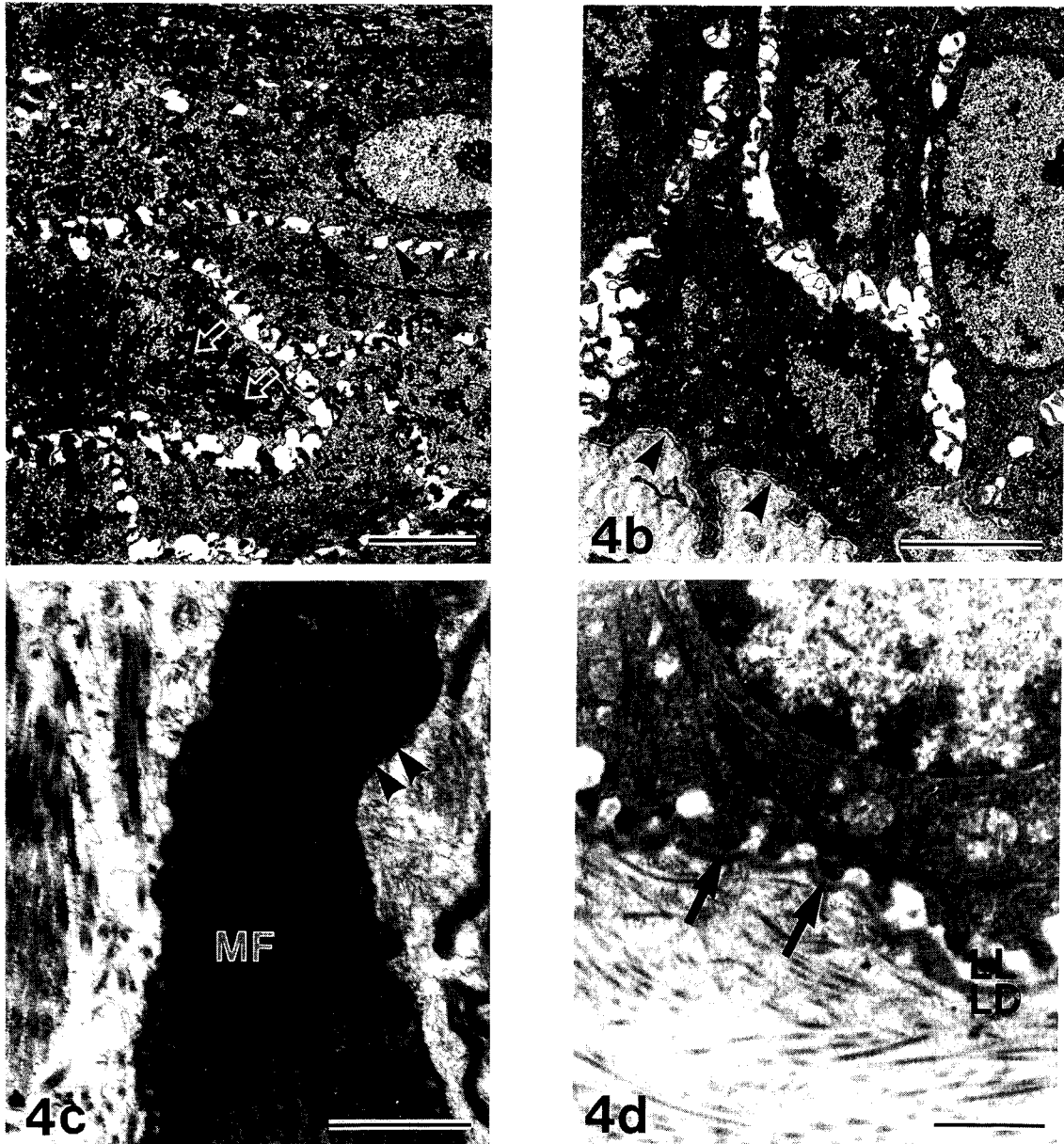


Fig. 4. Electron micrographs of exogenous collagen gel treated wound sites in rabbits. **a.** The entire layer of epidermal tissue from stratum basale to stratum corneum is seen. The distinct epithelial cells contain many filamentous materials (arrows) and desmosomal junctions (arrowheads). Bar=4 μ m. **b.** A distinct basement membrane covers the basal aspect of the stratum basale, and the continuous lamina densa (arrowheads) are observed under the basal keratinocytes (K). Bar=4 μ m. **c.** A cell revealed myofibroblast (MF) differentiation which is characterized by abundant rough endoplasmic reticulum and well defined bundles of microfilaments with α -actins (arrowheads). Bar=1 μ m. **d.** Hemidesmosomes (arrows) in exogenous collagen gel treated wounds show clearly defined basal and sub-basal electron dense plaques. The lamina densa (LD) were connected to the hemidesmosomes of basal keratinocytes by anchor filaments traversing the lamina lucida (LL). Bar=1 μ m.

전한 구조적 형성은 기저막을 따라 평행하게 배열되어 관찰되었다 (Fig. 4d).

고 찰

피부 상처치유는 초기 염증기 이후 상피조직과 결합조직

및 혈관조직의 체계적인 재형성을 통해 이루어지며⁴⁰⁾, 세포의 기질에 의해 조직수복 과정이 조절된다^{33,45)}. 또한 대식세포에서 유래한 cytokine과 growth factor는 상처치유에 있어 중요한 인자로서 작용한다⁴³⁾. 피부의 손상이 상피면으로 제한될 경우 상피세포의 이동과 증식은 거의 손상 시점에서 시작되나, 이 와는 대조적으로 진피조직까지 동반 손상될 경우 상피세포의

재생성 반응은 상처 수축과 진피조직의 기질 재구성 (matrix remodeling) 여부에 따라 진행된다⁵⁹⁾. 다양한 드레싱 제제는 만성 피부 궤양, 욕창, 화상, 피부 외상 등의 적절한 치유를 촉진하기 위해 임상적으로 광범위하게 사용되고 있으나^{11,58)}, 재질에 따라 세포독성^{16,42)}과 체내 이물반응이 나타나는 것으로 확인되었다^{27,35)}. 따라서 적절한 손상 부위 환경을 제공하고 치유과정을 촉진하기 위해서는 손상 부위에 적용된 재질의 생체친화성이 우선적으로 고려되어야 하는데 이러한 목적에 가장 부합되는 물질이 교원질이다^{20,49,54,63)}.

교원질은 약 300 Kda 분자량의 막대모양 분자로 특징적인 세 개의 나선형 polypeptide chain으로 구성되며, 척추동물 구성물질 중 다른 여러 형태로 건, 인대, 장관 및 피부 조직 등에 풍부하게 분포한다³⁷⁾. 기능적으로 이들 교원질은 결합조직의 역학적 지지구조로 기능하는 1차적 특성과 세포간의 부착 및 세포 이동을 위한 필수적인 역할을 담당하며, 특히 조직 손상시 재생과정에 중요한 기능을 수행한다^{21,62)}. 따라서 교원질의 주요 특성인 친수성 특성과 세포와의 친화성 등을 이용한 드레싱 제제로서 교원질 겔 (collagen gel), 교원질 파우더 (collagen powder), 교원질 필름 (collagen film) 및 교원질 스폰지 (collagen sponge) 등이 개발 연구되었다¹⁰⁾. 냉동건조 방식으로 제작된 다공성 3차원적 구조의 교원질 스폰지는 상처치유 과정 중 초기 지혈작용⁶⁴⁾과 조직 삼출액의 흡수 및 세균성 이차감염 예방의 물리적 효과⁶⁰⁾와 더불어 상처 부위의 세포 이동과 성장을 촉진하는 것으로 보고되었다^{6,18)}. 이러한 연구 결과는 상처치유와 관련된 교원질의 역할을 확인할 수 있는 연구 결과로서 본 연구의 외인성 교원질 겔을 도포한 실험군에서도 손상초기 빠른 조직 삼출액의 흡수 및 지혈효과가 관찰되었고, 이후 시간 경과에 따른 진피층 근섬유모세포의 분포와 재생피화 과정을 통해 상처 수축을 및 세포 이동이 촉진되는 것으로 확인되었다. 교원질 필름은 약 0.01~0.5 mm 두께의 교원질 막성 조직으로 제조된 것으로 동물 실험을 통해 만성적 염증반응의 억제현상과 더불어 숙주세포에 빠르게 침투하여 당단백질과 결합하며 점진적으로 숙주조직으로 대체되는 것으로 관찰되었다³⁹⁾. 또한 광범위한 피부 손상 특성을 나타내는 2~3도 화상 환자에게 적용한 결과 세균성 이차감염의 예방 및 빠른 재생피화를 유도하며, 특징적으로 치밀 섬유성 조직이 진피층 깊숙이 성장하여 특이적인 합병증 없이 빠르게 조직재생을 촉진하는 것으로 확인하였다⁵¹⁾. 본 연구 결과에서도 수술 후 24시간 간격으로 도포한 외인성 교원질 겔은 피부 손상초기 지혈작용과 더불어 손상면의 물리적 피막을 형성함으로써 피부 손상 부위의 세균성 이차감염을 적절히 예방해 주는 것으로 생각되었으며, 초기 염증반응 또한 매우 빠르게 진행되는 것으로 관찰되었다. 광학 및 전자현미경 관찰 결과 외인성 교원질 겔을 도포한 실험군에서 상피세포의 성장과 이동이 빠르게 진행되어 정상적인

재생피화 과정이 촉진되는 것을 확인할 수 있었으며, 재생피화가 이루어진 기저막에서는 일정한 분포의 반부착반 결합과 더불어 투명판과 치밀판의 완전한 구조적 형성이 관찰되었다. 이러한 결과는 외인성 교원질 겔의 상피조직 재형성 효과를 입증하는 것으로써 외인성 교원질 겔의 피부 상처치유에 대한 치료적 유효성은 매우 크다고 할 수 있다.

최근까지 drug delivery system과 관련된 교원질의 기능적 역할을 증명하기 위한 다양한 연구들이 시도되었다^{3,15,17,32,44,55)}. 약물도입과 관련된 교원질 연구로 TGF- β (transforming growth factor- β)와 bFGF (basic fibroblast growth factor)를 혼합한 교원질을 체내 장관의 손상 부위에 도포할 경우 매우 효과적으로 손상 조직이 재생되며⁵²⁾, 교원질 필름에 항생물질을 첨가하여 조직에 이식한 결과 항박테리아 활성이 약 10일 이상 지속되고, 숙주조직 내에서 지속적인 항염작용을 나타내는 것으로 확인되었다^{31,53)}. 또한 성장인자 중 PDGF (platelet derived growth factor)를 교원질 필름과 병합하여 손상 조직 내 이식할 경우 실험적 조건이지만 약 100시간 이상 이들 성장인자들이 손상 부위로 배출되며⁵³⁾, cytokine의 일종인 IL-2 (interleukin-2)³⁰⁾와 NGF (nerve growth factor)²⁶⁾, bFGF²⁹⁾ 등의 물질을 병합한 연구 결과 상처재생 촉진 및 말초신경조직의 퇴행성 변화 등의 억제에 유의한 치료적 효과가 있다고 보고되었다. 또한 중추신경조직 재생과 관련하여 절단된 실험 동물의 척수에 겔 형태의 교원질을 투여한 결과 뇌척수로 (corticospinal tract) 축삭의 성장과 더불어 성상교세포 (astrocyte)와 미세교세포 (microglial cell)가 교원질 안으로 성장하는 것으로 확인되었다²³⁾. 이러한 연구 결과들은 임상적 관점에서 교원질의 다양한 적용 가능성을 제시하는 것으로써 그 의미가 매우 크다고 할 수 있으며, 본 연구에서 확인하지 않은 약리학적 평가는 지속적인 연구를 통해 반드시 확인되어야 할 것으로 사료된다.

피부 손상시 교원질 생성과 분해의 정교한 조절작용은 손상 조직 수복에 있어 매우 중요한 인자로서^{4,60)}, 손상 피부 조직의 상피층 상처 가장자리에서 가장 유의한 활성이 나타나는 것으로 확인되었다¹⁹⁾. 이러한 결과는 최근 *in situ* hybridization과 면역조직화학 검사법을 통해 증명되었으며, 특이적으로 정상 피부조직과 진피층에서의 활성도는 매우 낮은 것으로 확인되었다^{46,47,57)}. 교원질은 척추동물 결합조직의 주요 구성 단백질로서 장기 및 조직의 형성과 재생에 필수적인 기능을 담당한다. 지금까지 확인된 교원질의 다양한 생물학적 기능은 임상적 적용 가치를 비교 검토할 기회를 제공하였고, 특히 본 연구의 외인성 교원질 겔 도포군에서 확인된 염증반응 억제효과와 상피조직의 구조적 재형성 촉진 결과와 비교할 때 상처치유에 대한 생체물질로서 교원질의 영향은 매우 긍정적인 것으로 사료된다.

본 연구 결과를 토대로 보면 상처치유와 관련된 교원질의 중요한 기능으로써 높은 생체친화성과 생체흡수능 그리고 낮

은 항원성과 적절한 세포분화에 대한 효과가 증대되는 것을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 사용된 외인성 교원질 겔의 상처재생 효과는 현저히 높은 것으로 확인되었으며 화상 및 욕창 등의 상처형태에 따라서 그 치료적 유효성을 확인하기 위한 지속적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Aumailley M and Gayraud B (1998): Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med*, **76**: 253-265.
- 2) Becker PL, Smith RA, Williams RS and Dutkowsky JP (1994): Comparison of antibiotic release from polymethylmethacrylate and sponge collagen. *J Orthop Res*, **70**: 737-741.
- 3) Bloomfield SE, Miyata T, Dunn Buese MW, Bueser N, Stenzel KH and Rubin AL (1978): Soluble gentamicin ophthalmic insert as a drug delivery of proteins. *Ophthalmol*, **96**: 885-887.
- 4) Buckley- Sturrock A, Woodward SC, Senior RM, Griffin GL, Klagsburn M and Davidson JM (1989): Differential stimulation of collagenase and chemotatic activity in fibroblast derived from rat wound repair tissue and human skin by growth factors. *J Cell Physiol*, **138**: 70-78.
- 5) Cascone MC, Sim S and Downes S (1995): Blends of synthetic and natural polymer as drug delivery systems for growth hormone. *Biomater*, **16**: 569-574.
- 6) Chvapil M, Chvapil TA and Owen JA (1986): Reaction of various skin wounds in the rat to collagen sponge dressing. *J Surg Res*, **41**: 410-418.
- 7) Clark RAF (1988): Overview and general consideration of wound repair. pp. 3-33. In: Clark RAF and Hensen PM (Eds), "The molecular and Cellular Biology of Wound Repair", Plenum Press, New York.
- 8) Clark RAF, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF and Colvin RB (1992): Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound re-epithelization. *J Invest Dermatol*, **79**: 264-269.
- 9) Crissman HA (1996): Cell cycle analysis by flow cytometry. pp. 21-42. In: Studzinski GP (Eds), "Cell Growth and Apoptosis". Oxford University Press.
- 10) Doillon CJ, Whyne CF, Brandwein S and Silver FH (1986): Collagen-based wound dressings: Control of the pore structure and morphology. *J Biomed Mater Res*, **20**: 1219-1228.
- 11) Dyson M, Young SR, Pendle S, Wedster DF and Lang S (1991): Comparison of the effects of moist or dry conditions on dermal repair. *J Invest Dermatol*, **91**: 434-439.
- 12) Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkötter O, Shephard P, Mauch C and Krieg T (2000): Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol*, **19**: 325-332.
- 13) Eldsle T and Bard J (1972): Collagen substrata for studies on cell behaviour. *J Cell Biol*, **54**: 626.
- 14) Folkman J and Klagsburn M (1987): Angiogenic factors. *Science*, **235**: 442.
- 15) Friess W, Zhou W and Groves MJ (1996): In vivo activity of collagen matrices containing PS1, an anti-neoplastic glycan, against murine sarcoma cells. *Pharm Sci*, **2**: 1-4.
- 16) Fry JR (1986): Cytotoxicity of calcium alginate wound dressing. *J Pharmacol*, **12**: 37-39.
- 17) Fu CCR, Shek E, Fleitman JS and de Leung MC (1990): Collagen containing ophthalmic formulation. Eur Patent 90119626.1
- 18) Gorham SD (1991): Collagen, pp 55-112. In: Byrom B (ed), "Biomaterials", Stockton Press, New York.
- 19) Grillo HC and Gross J (1967): Collagenolytic activity during Mammalian wound repair. *Devel Biol*, **15**: 133-137.
- 20) Grzybowski J, Kolodziej W, Trafty EA and Struzyna J (1997): A new anti-infective collagen dressing containing antibiotics. *J Biomed Mater Res*, **36**: 163-166.
- 21) Hay ED (1983): Cell and extracellular matrix. Their organization and mutual dependence. *Modern cell biology*, **2**: 509-548.
- 22) Horch RE, Debus M, Wagner G and Stark GB (2000): Cultured human keratinocytes on type I collagen membranes to reconstitute the epidermid. *Tissue Eng*, **6**: 53-67.
- 23) Joosten EAJ, Bär PR and Gispens WH (1995): Collagen implants and cortico-spinal axonal growth after mid-thoracic spinal cord lesion in the adult rat. *J Neurosci Res*, **41**: 481-490.
- 24) Kleinman HK, Klebe RJ and Martin GR (1981): Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J Cell Biol*, **88**: 473-485.
- 25) Kleinman HK, Rohrbach DH, Terranova VP, Varner HH, Hewitt AA, Grotendorst GR, Wilke CM, Martin GR, Seppa H and Schiffmann E (1982): Collagenous matrices as determinants of cell functions. In: Furtmayr H (ed). "Immunocytochemistry of the extracellular matrix", vol. 2. Florida, CRC Press.
- 26) Koseki N, Takamoto O, Sasaki Y, Maeda H, Sano A, Fujioka K, Sato A, Miyata T, Muhammad AKMG, Yoshimine T and Hayakawa T (1996): A new application of peptide drug delivery system to the brain. *Proc Int Symp Control Release Bioact Mater*, **23**: 605-606.
- 27) Lansdown ABG and Payne MJ (1994): An evaluation of the local reaction and biodegradation of calcium sodium alginate following subcutaneous implantation in the rat. *J R Coll Surg*

- Edinb*, **39**: 284-288.
- 28) Lindblad WJ (1998): Collagen expression by novel cell populations in the dermal wound environment. *Wound Repair Regen*, **6**: 186-193.
 - 29) Maeda M, Sano A, Fujioka K, Inui K and Koike T (1995): Local sustained release formulation for fracture treatment, basic fibroblast growth factor minipellet. *Proc Int Symp Control Release Bioact Mater*, **22**: 494-495.
 - 30) Matsuoka J, Sakagami K, Shiozaki S, Uchida S, Fujiwara T, Gohchi A and Orita K (1988): Development of an interleukin-2 slow delivery system. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, **34**: 729-731.
 - 31) Minabe M, Takeuchi K, Tamura K, Hori T and Umemoto T (1989): Subgingival administration of tetracycline on a collagen film. *J Periodontol*, **60**: 552-556.
 - 32) Minabe M, Uematsu A, Nishijima K, Tomomatsu E, Tamura T, Hori T, Umemoto T and Hino T (1989): Application of a local drug delivery system to periodontal therapy: I. Development of collagen preparations with immobilized tetracycline. *J Periodontol*, **60**: 113-117.
 - 33) Nathan C and Sporn M (1991): Cytokines in context. *J Cell Biol*, **113**: 981-986.
 - 34) O'Keefe EJ, Patne RE, Russell N and Woodley DT (1985): Spreading and enhance motility of human keratinocyte on fibronectin. *J Invest Dermatol*, **85**: 125-130.
 - 35) Odell EW, Oades P and Lombardi T (1994): Symtomatic foreign body reaction to haemostatic alginate. *Br J Oral Maxillofac Surg*, **32**: 178-179.
 - 36) Pachence JM, Berg RA and Silver FH (1987): Collagen: its place in the medical device industry. *Med Device Diagn Ind*, **9**: 49-55.
 - 37) Piez KA (1984): Molecular and aggregate structure of the collagens. pp. 1-39. In: Pies KA, Redda AH, (eds). "Extracellular matrix biochemistry", Elsevier, New York.
 - 38) Pilcher BK, Sudbeck BD, Dumin JA, Welgus HG and Parks WC (1998): Collagenase-1 and collagen in epidermal repair. *Arch Dermatol Res*, **290**: 37-46.
 - 39) Purna Sai K and Babu M (2000): Collagen based dressings: a review. *Burn*, **26**: 54-62.
 - 40) Rennekampff HO, Hansbrough JF, Woods V and Schröder JM (1997): Role of melanoma growth stimulatory activity on keratinocyte function in wound healing. *Arch Dermatol Res*, **289**: 204-212.
 - 41) Robinson JB and Friedman RM (1995): Wound healing and closure, abnormal scar, tatoos, envenmation, and extravasation injuries. *Selected readings Plast Surg*, **8**: 1-36.
 - 42) Rosby M and Clauss LC (1990): Cytotoxicity test of wound dressings using nrmal human keratinocytes in culture. *J Biomed Mater Res*, **24**: 363-377.
 - 43) Rothe M and Falanga V (1989): Growth factors. Their biology and promise in dermatologic diseases and tissue repair. *Arch Dermatol*, **125**: 1390-1398.
 - 44) Royce PM, Kato T, Ohsaki K and Miura A (1995): The enhancement of cellular infiltration and vascularisation of a collagenous dermal implant in the rat platelet-derived growth factor. *J Dermatol Sci*, **10**: 42-52.
 - 45) Ruoslahti E and Yamaguchi Y (1991): Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*, **64**: 867-869.
 - 46) Saarialho-Kere UK, chang ES, Welgus HG and Parks WC (1993): Expression of interstitial collagenase, 92 kDa gelatinase, and TIMP-1 in granuloma annulare and necrobiosis lipoidica diabetorum. *J Invest Dermatol*, **100**: 335-342.
 - 47) Saarialho-Kere UK, Kovacs SO, Pentland AP, Olerud J, WelgusHG and Parks WC (1993): Cell-matrix interactions modulate interstitial collagenase expression by human keratinocytes actively involved in wound healing. *J Clin Invest*, **92**: 2858-2866.
 - 48) Sabolinski ML, Alvarez O, Auletta M, Mulder G and Parenteau NL (1996): Cultured skin as a 'smart material' for healing wounds: experience in venous ulcers. *Biomaterials*, **17**: 311-320.
 - 49) Sakiel S and Grzybowski J (1995): Clinical application of collagen membranes in treatment of burn wounds. *Polym Med*, **25**: 19-24.
 - 50) Sefton MV and Woodhouse KA (1998): Tissue engineering. *J Cutan Med Surg*, **3**: 18-23.
 - 51) Shettigar UR, Jagannathan R and Natarajan R (1982): Collagen film for burn wound dressings reconstituted from animal intestines. *Artif Organs*, **6**: 256-260.
 - 52) Slavin J, Nash JR and Kingsnorth AN (1992): Effect of transforming growth factor beta and basic fibroblast growth factor in steroid impaired healing intestinal wound. *Br J Surg*, **79**: 69-72.
 - 53) Song SZ, Morawiecki A, Pierce GF and Pitt CG (1992): Collagen film for sustained delivery of proteins. Eur Patent 92305467.3
 - 54) Srivastava S, Gorham SD, French DA, Shivas AA and Courtney JM (1990): In vitro evaluation and comparison of collagen and collagen/glycosaminoglycan composite films and sponges as candidate biomaterial. *Biomaterials*, **11**: 155-158.

- 55) Steffan W, Stemberger A and Sorg KH (1985): Collagen insert containing an active ingredient for introduction into bones or soft parts. Eur Patent 82105341.
- 56) Stenn KS and Depalma L (1988): Re-epithelialization. pp. 321-335. In: Clark RAF and Hensen PM (Eds). "The molecular and Cellular Biology of Wound Repair", Plenum Press, New York.
- 57) Stähle-Bäckdahl M, Inoue M, Giudice GJ and Parks WC (1994): 92-kD Gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of the 180 kDa bullous pemphigoid autoantigen. *J Clin Invest*, **93**: 2202-2230.
- 58) Suzuki Y, Tanihara M, Nashimura Y, Suzuki K, Kakimaru Y and Shimizu Y (1997): A novel wound dressing with an antibiotic delivery system stimulated by microbial infection. *ASAIO J*, **43**: 854-857.
- 59) Wearing HJ and Sherratt JA (2000): Keratinocyte growth factor signalling: a mathematical model of dermal-epidermal interaction in epidermal wound healing. *Mathematical Bioscience*, **165**: 41-62.
- 60) Woodley DT, Bachman PM and O'Keefe EJ (1988): Laminin inhibits human keratinocyte migration. *J Cell Physiol*, **90**: 679-683.
- 61) Woodley DT, Wynn KC and O'Keefe EJ (1990): Type VI collagen and fibronectin enhance human keratinocyte thymidine incorporation and spreading in the absence of soluble growth factors. *J Invest Dermatol*, in press.
- 62) Yamata KM (1983): Cell surface interaction with extracellular materials. *Ann Rev Biochem*, **52**: 761-799.
- 63) Yang JY (1990): Clinical application of collagen sheet, YCWM, as a burn dressing. *Burns*, **16**: 457.
- 64) Yannas IV (1990): Biologically active analogues of the extracellular matrix: artificial skin and nerves. *Angew Chem Int*, **29**: 20-35.
- 65) Yurchenco PD, Tsilibary EC, Charonis AS and Furthmayr H (1986): Models for the self-assembly of basement membrane. *J Histochem Cytochem*, **34**: 93-102.
- 66) Ågren MS, Taplin CJ, Woessner JF, Eaglstein WH and Mertz PM (1992): Collagenase in wound healing: effect of wound age and type. *J Invest Dermatol*, **99**: 709-714.
-