

Eksresi CK-16 pada Penyembuhan Luka Superfisial dengan Penambahan Hialuronat pada Amnion *Freeze-Dried*

Meianti Harjani, Imam Susilo

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo
Surabaya

ABSTRAK

Latar belakang

Penyembuhan luka merupakan proses yang dinamis, melibatkan sejumlah mediator, sel darah, matriks ekstra seluler serta sel parenkim. Pada penyembuhan luka epidermal, *cytokeratin (CK)-16* berfungsi menstimulasi reorganisasi susunan filamen keratin yang terjadi sebelum migrasi keratinosit ke area perlukaan. Asam hialuronat adalah salah satu komponen penting matriks ekstraseluler yang memegang peranan penting dalam morfogenesis jaringan, migrasi, diferensiasi serta adesi sel.

Tujuan

Untuk menganalisis pengaruh penambahan hialuronat LMW pada *amnion freeze-dried* terhadap ekspresi protein *CK-16* dalam penyembuhan luka.

Bahan dan cara

Luka superfisial dibuat dengan melakukan sayatan eksisional pada punggung 32 ekor tikus jantan galur Wistar. Sampel dibagi menjadi kelompok kontrol dan perlakuan. Kelompok perlakuan diterapi dengan membran amnion *freeze-dried* yang ditambahkan hialuronat LMW 1%. Kelompok kontrol diterapi dengan membran amnion *freeze-dried* saja. Masing-masing kelompok kemudian dibagi menjadi 2 sub kelompok. Tiap sub kelompok terdiri dari 8 ekor tikus yang akan dilakukan pengorbanan pada hari ke 3 dan 7 setelah pembuatan luka. Evaluasi histopatologi dilakukan dengan mengukur ketebalan dan jumlah lapisan sel epitel, serta ekspresi protein *CK-16*.

Hasil

Kelompok perlakuan menunjukkan peningkatan ketebalan dan jumlah lapisan sel epitel serta ekspresi *CK-16* dibanding kelompok kontrol pada 3 dan 7 hari. Uji statistik *t-test* menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p \leq 0.05$).

Kesimpulan

Penambahan hialuronat LMW pada amnion *freeze-dried* dapat mempercepat penyembuhan luka dan epitelialisasi yang ditandai oleh ekspresi *CK-16*.

Key words: penyembuhan luka, *low molecular weight hyaluronate*, epitelialisasi, *CK-16*

ABSTRACT

Background

Wound healing is a dynamic process involving mediators, blood cells, extracellular matrix and parenchymal cells. In epidermal wound healing, the function of *cytokeratin (CK)-16* could be to promote reorganization of the cytoplasmic array of keratin filaments, an event that precedes the onset of keratinocyte migration into the wound site. Hyaluronic acid is one of the essential components of extracellular matrix, which plays a predominant role in tissue morphogenesis, cell migration, differentiation, and adhesion.

Objective

To evaluate the effects addition of Low Molecular Weight Hyaluronate of amnion freeze-dried on expression of protein *CK-16* in wound healing.

Material and methods

Superficial-thickness excisional wounds were created along the backs of 32 adult wistar rats. Sample were divided into 2 groups. Test group was treated by freeze-dried amnion and 1% Low Molecular Weight Hyaluronate. Control group was treated by freeze-dried amnion only. Each of the groups was divided into 2 sub groups. Each of the sub groups composed of 8 wistar rats based on the periode of termination: 3rd and 7th day after wounded. Histological evaluation was done to measure the thickness and amount of epithelial layer and expression of *CK-16*.

Results

Test group showed not only higher thickness and amount of epithelial layer but also that expression of *CK-16* compare to control group on 3 and 7 days. Statistic test of *t-test* showed significant differentiated ($p \leq 0.05$).

Conclusion

Addition of low molecular weight hyaluronate on freeze-dried amnion could accelerate wound healing and epithelialization characterized by *CK-16* expression.

Key words: wound healing, low molecular weight hyaluronate, epithelialization, *CK-16*

PENDAHULUAN

Perluasan kulit cukup sering dijumpai dalam kehidupan sehari-hari, baik luka akut maupun kronik yang dapat menimbulkan komplikasi berupa infeksi, nekrosis, ulkus bahkan sepsis yang bisa berakhir dengan kematian.¹ Di Amerika Serikat lebih dari 1,25 juta orang mengalami luka bakar dan 6,5 juta mengalami ulkus kulit kronik yang disebabkan oleh stasis vena atau diabetes melitus. Oleh karena itu dibutuhkan penanganan luka yang optimal agar tercapai penutupan luka secepatnya dan memberikan bekas luka yang estetik. Ada beberapa macam perawatan luka superfisial yang telah dikenal diantaranya menggunakan membran amnion.^{2,3,4} Pada tahun 1910 Davis pertama kali melaporkan penggunaan membran fetal untuk transplantasi kulit.⁵

Sediaan membran amnion yang banyak dipakai pada penanganan luka adalah *freeze-dried amniotic membrane*. Membran amnion yang telah diawetkan secara *freeze-dried* praktis digunakan dan mudah didistribusikan tanpa memerlukan medium & suhu penyimpanan tertentu, akan tetapi ternyata kadar *Growth Factor* yang ada didalamnya mengalami penurunan yang cukup signifikan.^{6,7,8,9,10} Hal ini yang menyebabkan membran amnion yang diawetkan efektif sebagai *biological dressing*, yang setara dengan *synthetic polymer sheet* atau *transparent dressing*, yang dapat menghambat evaporasi luka dan berfungsi sebagai barrier terhadap bakteri patogen.^{11,12}

Asam hialuronat, yang dihasilkan oleh sel fibroblast merupakan komponen glikosaminoglikan dalam matriks ekstraseluler yang berperan dalam proses penyembuhan luka.¹³ Kandungan hialuronat ini ditemukan dalam sejumlah besar membran amnion segar. Hialuronat terdiri dari dua kelompok yakni *High Molecular Weight Hyaluronate* dan hasil degradasinya yang berupa *Low Molecular Weight Hyaluronate* (Hialuronat LMW). Penelitian terdahulu membuktikan bahwa hialuronat LMW mampu memacu angiogenesis, mitosis dan migrasi sel keratinosit, fibroblas dan sel endotel^{14,15,16}, serta memacu produksi *Growth Factor* oleh makrofag dan memodulasi respon inflamasi pada proses penyembuhan luka. Beberapa penelitian menunjukkan hialuronat LMW mempercepat proses epitelialisasi

dibandingkan kontrol.¹⁶ Fungsi *CK-16* adalah merangsang terjadinya reorganisasi susunan filamen keratin di dalam sitoplasma, yang mendahului terjadinya migrasi keratinosit ke arah tempat luka.¹⁷ Proses epitelialisasi dievaluasi dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi sitokeratin (*CK*)-16 yang terinduksi jika ada cedera pada epitel bertatah. Penelitian ini dilakukan untuk mengamati ekspresi *CK-16* pada penyembuhan luka superfisial dengan menambahkan hialuronat LMW membran amnion *freeze-dried*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga pada bulan April 2011 setelah mendapat sertifikat laik etik dari Komisi Etik & Humaniora Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Penelitian ini menggunakan rancangan *post test only control design* dengan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) jantan sebagai populasi penelitian, usia 40-60 hari dengan berat badan 200-300 gram, dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dan dipilih secara *simple random sampling*. Pada kedua kelompok dibuat luka superfisial dengan cara eksisi tangensial. Eksisi dilakukan pada punggung tikus sampai tampak adanya bintik-bintik perdarahan atau lapisan dermis yang berkilat. Luka diamati pada hari ke-3 dan ke-7 paska cedera secara histopatologis untuk mengetahui proliferasi sel keratinosit serta tahapan epitelialisasi.

Pada kelompok kontrol luka ditutup dengan membran *amnion preserved*, sedang kelompok perlakuan luka diolesi dengan larutan *low molecular weight hyaluronate* 1% kemudian ditutup dengan *amnion preserved*. Masing-masing luka ditutup dengan kassa tebal yang difiksasi dengan jahitan menggunakan silk 4.0. Kedua kelompok dilakukan pengamatan secara histopatologis pada hari ke-3 dan ke-7 setelah dilakukan pengorbanan tikus dengan cara dekapitasi.

Parameter yang diuji adalah tebal epitelialisasi, jumlah lapisan sel epitel dan ekspresi *CK-16*. Pemeriksaan ekspresi *CK-16* dilakukan dengan cara melakukan penghitungan

sel epitel yang tercat positif dengan antibodi CK-16, ditandai sitoplasma sel epitel tercat warna coklat yang terlihat dengan pemeriksaan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran obyektif 40x. Pemeriksaan jumlah lapisan sel epitel dilakukan dengan cara melakukan penghitungan rata-rata jumlah lapisan sel epitel yang terbentuk mulai dari lapisan paling bawah yakni stratum basalis hingga stratum corneum yang dilihat pada pembesaran obyektif 40x dan pengukuran dilakukan pada 3 tempat pada setiap sediaan yakni bagian pinggir kanan, pinggir kiri dan tengah. Sedangkan pemeriksaan tebal epitel dilakukan dengan cara melakukan pengukuran rata-rata tebal lapisan sel epitel mulai dari sel epitel silindris pada lamina basalis sampai lapisan epitel pipih pada permukaan paling atas menggunakan pengukur mikrometer pada pembesaran obyektif 40x pada 3 tempat secara acak pada setiap sediaan yakni bagian pinggir kanan, pinggir kiri dan tengah.

Hasil parameter ini dibandingkan dengan uji statistik *Independent t-test* jika data berdistribusi normal, dengan tingkat kesalahan 5% untuk mengetahui adanya perbedaan tebal epitel, jumlah lapisan sel epitel dan ekspresi protein CK 16 antara kedua kelompok. Hasil perhitungan dikatakan bermakna bila diperoleh harga $p \leq 0,05$. Namun bila data tidak berdistribusi normal dilakukan uji *Wilcoxon-Mann-Whitney test*. Untuk menguji normalitas digunakan uji *Kolmogorov Smirnov*. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabulasi, dan teks tulisan untuk menjelaskan tabulasi tersebut

HASIL

Eksprei Protein CK-16

Pemeriksaan ekspresi protein CK-16 yang dilakukan pada hari ke-3 dan ke-7 dengan cara melakukan penghitungan sel epitel yang tercat positif dengan antibodi CK-16, ditandai sitoplasma sel epitel tercat warna coklat yang terlihat dengan pemeriksaan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran obyektif 40x. Hasil penghitungan ekspresi protein CK-16 ditampilkan pada tabel 1 dan 2 di bawah ini :

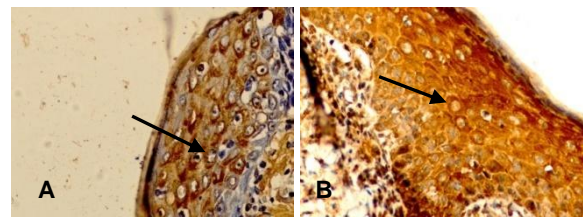
Tabel 1. Ekspresi protein CK-16 pada hari ke-3

Kelompok	N	Ekspresi protein CK-16			
		Rata-rata (Mean)	Standar deviasi (SD)	Minimum	Maksimum
K	8	151,13	15,887	-0,197	0,171
P	8	241,13	33,694	-0,135	0,205

Tabel 2. Ekspresi protein CK-16 pada hari ke-7

Kelompok	N	Ekspresi protein CK-16			
		Rata-rata (Mean)	Standar deviasi (SD)	Minimum	Maksimum
K	8	490,50	22,716	-0,145	0,137
P	8	757,88	33,008	-0,194	0,148

Dengan uji *independent samples t- test* variansi heterogen pada hari ke-3 dan uji *independent samples t- test* variansi homogen pada hari ke-7 didapatkan nilai $p = 0,000$, artinya terdapat perbedaan yang bermakna antara ekspresi protein CK-16 kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada hari ke-3 dan ke-7.



Gambar A. Ekspresi protein CK-16 positif pada sitoplasma sel keratinosit pada kelompok perlakuan hari ke-3. Tanda panah menunjukkan ekspresi CK-16 pada sitoplasma (Imunohistokimia, obyektif 40x)

Gambar B. Ekspresi protein CK-16 positif pada sitoplasma sel keratinosit lebih banyak pada kelompok perlakuan hari ke-7. Tanda panah menunjukkan ekspresi CK-16 pada sitoplasma (Imunohistokimia, obyektif 40x)

Jumlah lapisan sel epitel

Pemeriksaan jumlah lapisan sel epitel yang dilakukan pada hari ke-3 dan ke-7 dengan cara melakukan penghitungan rata-rata jumlah lapisan sel epitel yang terbentuk mulai dari lapisan paling bawah yakni stratum basalis hingga stratum corneum yang dilihat pada pembesaran obyektif 40 x dan pengukuran dilakukan pada 3 tempat pada setiap sediaan yakni bagian pinggir kanan, pinggir kiri, tengah.

Hasil penghitungan jumlah lapisan sel epitel ditampilkan pada tabel 3 dan 4 dibawah ini :

Tabel 3. Jumlah lapisan sel epitel pada hari ke-3

Kelom pok	N	Jumlah lapisan sel epitel (lapis)			
		Rata-rata (Mean)	Standar deviasi (SD)	Mini mum	Maksi mum
K	8	3,50	0,535	-0,325	0,325
P	8	5,00	0,756	-0,250	0,250

Tabel 4. Jumlah lapisan sel epitel pada hari ke-7

Kelom pok	N	Jumlah lapisan sel epitel (lapis)			
		Rata-rata (Mean)	Standar deviasi (SD)	Mini mum	Maksi mum
K	8	8,13	1,356	-0,203	0,287
P	8	10,13	0,835	-0,228	0,185

Dengan uji *Independent samples t- test* variansi homogen didapatkan nilai $p = 0,000$ (pada hari ke-3) dan $p = 0,003$ (pada hari ke-7) artinya terdapat perbedaan yang bermakna antara jumlah lapisan sel epitel kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada hari ke-3 dan ke-7.

Tebal Epitel

Pemeriksaan tebal epitel yang dilakukan pada hari ke-3 dan ke-7 dengan cara melakukan pengukuran rata-rata tebal lapisan sel epitel mulai dari sel epitel silindris pada lamina basalis sampai lapisan epitel pipih pada permukaan paling atas menggunakan pengukur mikrometer pada pembesaran obyektif 40 x pada 3 tempat secara acak pada setiap sediaan yakni bagian pinggir kanan, pinggir kiri, tengah. Hasil pengukuran tebal lapisan epitel ditampilkan pada tabel 5 dan 6 dibawah ini:

Tabel 5. Tebal epitel pada hari ke-3

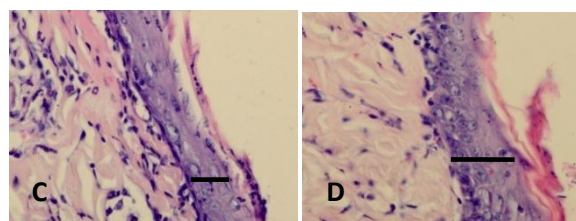
Kelom pok	N	Tebal epitel (mm)			
		Rata-rata (Mean)	Standar deviasi (SD)	Mini mum	Maksi mum
K	8	0,3250	0,19086	0,131	0,302
P	8	0,4750	0,22520	0,216	0,255

Dengan uji *independent samples t- test* variansi homogen didapatkan nilai $p = 0,173$, artinya terdapat perbedaan yang tidak bermakna secara statistik antara tebal epitel kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada hari ke-3.

Tabel 6. Tebal epitel pada hari ke-7

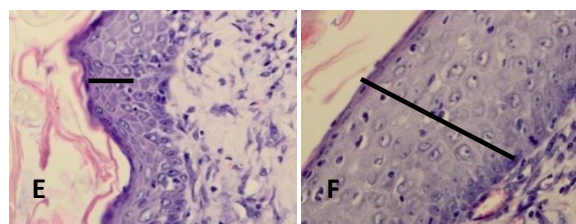
Kelom pok	N	Tebal epitel (mm)			
		Rata-rata (Mean)	Standar deviasi (SD)	Mini mum	Maksi mum
K	8	0,5750	0,04629	-0,455	0,295
P	8	0,9375	0,16850	-0,287	0,213

Dengan uji *independent samples t-test* variansi heterogen didapatkan nilai $p = 0,000$, artinya terdapat perbedaan yang bermakna antara tebal epitel kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada hari ke-7.



Gambar C. Menunjukkan jumlah dan tebal lapisan sel epitel kelompok kontrol pada hari ke-3. Garis putih menunjukkan tebal lapisan epitel. (Hematoxylin Eosin, obyektif 40x)

Gambar D. Menunjukkan jumlah dan tebal lapisan sel epitel kelompok perlakuan yang tampak lebih tebal pada hari ke-3. Garis putih menunjukkan tebal lapisan epitel. (Hematoxylin Eosin, obyektif 40x)



Gambar E. Menunjukkan jumlah dan tebal lapisan sel epitel kelompok kontrol pada hari ke-7. Garis putih menunjukkan tebal lapisan epitel. (Hematoxylin Eosin, obyektif 40x)

Gambar F. Menunjukkan jumlah dan tebal lapisan sel epitel kelompok perlakuan yang tampak lebih tebal pada hari ke-7. Garis putih menunjukkan tebal lapisan epitel. (Hematoxylin Eosin, obyektif 40x)

PEMBAHASAN

Tabel 5 dan 6 menunjukkan bahwa ekspresi protein *CK-16* pada kelompok perlakuan lebih banyak dari pada kelompok kontrol ($p = 0,000$). Hal ini diduga bahwa hialuronat LMW pada penyembuhan luka epidermis. (gambar D dan F).

Hasil ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa induksi dan akumulasi protein *CK-16* berperan pada proses aktivasi keratinosit yang berdampak positif pada epitelialisasi. Selain itu, *CK-16* menstimulasi reorganisasi filamen *CK-16* di dalam sitoplasma keratinosit yang teraktivasi yang ditandai oleh peningkatan mitosis, tanda hipertrofi sel serta peningkatan ekspresi protein *CK-16* di dalam sitoplasma.^{17,18} Uji statistik menunjukkan adanya perbedaan bermakna. Peneliti lain menjelaskan bahwa hialuronat mengendalikan respon epidermis terhadap jejas, melalui peranan hialuronat pada migrasi, proliferasi serta diferensiasi keratinosit dalam berbagai proses penyembuhan luka.¹⁹ Di samping itu, juga dijelaskan bahwa hialuronat berperan sebagai regulator aktif pada banyak proses seluler yang dinamis dan dalam migrasi, proliferasi serta diferensiasi seluler. Pada epidermis, kandungan hialuronat cukup banyak sebagai matriks diantara keratinosit terutama pada stratum spinosum, stratum basale juga pada stratum corneum, menjadikan hialuronat berperan penting dalam migrasi dan proliferasi sel. Akumulasi hialuronat meningkatkan proliferasi keratinosit sebagai respon terhadap perlukaan epidermis. Selain itu dijelaskan bahwa degradasi hialuronat epidermal akan meningkatkan diferensiasi keratinosit dengan diekspresikannya *CK-10* dan filaggrin yang merupakan marker dini dan lanjut diferensiasi epidermis, dimana *CK-10* diekspresikan lebih awal pada stratum spinosum, dan diikuti oleh ekspresi filaggrin pada stratum granulosum.¹⁹

Tabel 5 menunjukkan pertumbuhan tebal epitel belum optimal dibanding table 6. Uji statistik pada hari ke 3 antara tebal epitel kelompok kontrol dan kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan tidak bermakna ($p=0,173$). Sedangkan, uji statistik pada hari ke-7 menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p=0,000$). Hal ini diduga bahwa untuk mendapatkan penyembuhan yang sempurna dibutuhkan waktu yang lebih panjang. Hal ini sesuai dengan beberapa penelitian *in vivo* terdahulu yang menunjukkan bahwa proses reepitelialisasi luka pada kulit merupakan proses peningkatan aktivitas mitosis dan migrasi keratinosit di tepi luka yang membutuhkan waktu lebih dari 8 hari untuk penyembuhan luka.^{18,20} Hal ini juga sejalan dengan peneliti lain yang menyatakan

bahwa peranan hialuronat yang ditambahkan dapat memacu migrasi, proliferasi serta diferensiasi keratinosit dalam proses penyembuhan luka.¹⁹

Dari semua hasil di atas menunjukkan bahwa hialuronat terbukti mampu meningkatkan migrasi dan proliferasi sel-sel keratinosit dalam proses penyembuhan luka superfisial melalui induksi dan ekspresi *CK-16*.

KESIMPULAN

Penambahan hialuronat LMW pada amnion *freeze-dried* dapat meningkatkan kecepatan penyembuhan dan epitelialisasi yang ditandai oleh ekspresi *CK-16*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Singer AJ, Dagum AB. Current management of acute cutaneous wound. *N Engl J Med.* 2008; 359:1037-46.
2. Saputro ID, Noer MS. Aplikasi amnion pada perawatan luka bakar derajat II superficial di Lab/SMF. Bedah Plastik RSUD Dr. Soetomo Surabaya, Karya Akhir Penelitian. Surabaya: Lab/SMF. Bedah Plastik RSUD Dr. Soetomo; 2001.
3. Gajiwala K, Gajiwala AL. Use of banked tissue in plastic surgery. *Cell Tissue Banking.* 2003; 4:141-6.
4. Singh R, Purohit S, Chacharkar MP. Microbiological safety and clinical efficacy of radiation sterilized amniotic membrane for treatment of second-degree burns. *Burns.* 2007; 33:505-10.
5. Rafii AB, Aghayan HR, Arjmand B, Javadi MA. Amniotic membrane transplantation. *Iran J Ophthalmic Res.* 2007; 2 (1):58-75.
6. Wolbank S, Hildner F, Redl H, Griensven MV, Gabriel C. Impact of human amniotic membrane preparation on release of angiogenic factor. *J Tissue Eng Reg Med.* 2009; 3:651-4.
7. Thomasen H, Pauklin M, Steuhl KP, Meller D. Comparison of cryopreserved and freeze-dried amniotic membrane for ophthalmologic applications, *J Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50:1792.
8. Sri Subekti E, Yogiantoro D, Suhendro G. The difference of TGF β 2 concentration between fresh amniotic membrane and freeze-dried amniotic membrane. Surabaya:

- Koleksi Literatur Pusat Biomaterial/Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo; 2009.
9. Ihsan M. Perbedaan Kadar EGF pada membran amnion Segar dan membran amnion kering beku (freeze-dried). Surabaya: Koleksi Literatur Pusat Biomaterial/Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo; 2009.
 10. Pasaribu IA, Hoesin RG, Suhendro G. Pengaruh kriopreservasi -80°C terhadap Kadar basic fibroblast growth factor (bFGF) pada membran amnion. Surabaya: Koleksi Literatur Pusat Biomaterial/Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo; 2009.
 11. Kumar P. Classification of skin substitute. *Burns*. 2008;34:148-9.
 12. Padmani RD, Perdanakusuma DS. Perbandingan efektifitas pemakaian hemiselulose dressing dengan calcium sodium alginate, amnion dan tulle pada luka donor split thickness skin graft. Surabaya: Lab/SMF Ilmu Bedah Plastik RSUD Dr. Soetomo; 2008.
 13. Jenkins RH, Williams JD, Steadman R. Fibroblasts transformed to a wound healing phenotype accumulate a hyaluronan-rich extracellular matrix through reduced degradation. *Eur Cell Mater*. 2005; 10:69.
 14. Shay E, He H, Zhang S. Hyaluronan complex purified from human amniotic membrane extract inhibits proliferation of endothelial cells and macrophage. *J Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50:5560.
 15. Gomes JAP, Amankwah R, Richards AP, Dua HS. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro. *Br J Ophthalmol*. 2004; 88:821-5.
 16. West DC, Fan TPD. Hyaluronan oligosaccharides promotes wound repair. It's size-dependent regulation of angiogenesis. In: *The new angiotherapy*. 1st ed. England: Humana Press; 2001.
 17. Paladini RD, Takahashi K, Coulombe PA. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol*. 1996 Feb; 132(3):381-97.
 18. Wawersik MJ, Mazzalupo S, Nguyen D, Coulombe PA. Increased levels of keratin 16 alter epithelialization potential of mouse skin keratinocytes in vivo and ex vivo. *Am Soc Cell Biol*. 2001;12:3439-50.
 19. Maytin EV, Chung HH, Seetharaman VM. Hyaluronan participates in the epidermal response to disruption of the permeability barrier in vivo. *AJP*. 2004;165:1331-41.
 20. Martin P, et al. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75 (1997); doi: 10.1126/science.276.5309.75 (cited 2010 Jul 26). Available from: <http://www.sciencemag.org>