

누드마우스를 이용한 다양한 피부 대체물의 성능비교

이원재 · 이동원 · 허재영 · 이영대 · 박병윤 · 나동균

연세대학교 의과대학 성형외과학교실, 인체조직복원연구소

Evaluation of the Various Artificial Skin Substitutes Implanted onto Nude Mice

Won Jai Lee, M.D., Dong Won Lee, M.D.,
Jae Young Hur, M.D., Young Dae Lee, M.D.,
Beyoung Yun Park, M.D., Dong Kyun Rah, M.D.

Institute for Human Tissue Restoration, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: The purpose of this study is to evaluate the remodeling process of the various skin substitutes in 4th and 6th weeks following the transplantation when transplanted onto nude mice.

Methods: Three types of artificial skin substitutes, such as PLGA scaffold with keratinocyte sheets(group 1), acellular human dermis(Surederm™) and keratinocyte sheet(group 2), bioengineered skin(Neoder™)(group 3), were applied to the wound on nude mice. All mice were killed in 2, 4 weeks and/or 6 weeks after grafting and tissue samples were harvested from the back of mice. The changes in wound size, degree of angiogenesis, formation of basement membrane and epidermis, density of collagen fibers and neural restoration were examined.

Results: There was no significant changes in wound size among the three groups. However, the size of wound decreased in the non-substituted group due to contracture. Degree of angiogenesis and synthesis of collagen or neurofilaments were mostly increased in bioengineered skin(Neoder™)(group 3), followed by acellular human dermis(Surederm™) and keratinocyte sheet(group 2), PLGA scaffold with keratinocyte sheets (group 1). However, group 3 and group 2 showed similar thickness of basement membrane and epidermis.

Conclusion: We found that degree of angiogenesis, formation of basement membrane and skin appendages, density of collagen fibers and neurofilaments can be the

categories to evaluate the success of artificial skin substitution in early stages.

Key Words: Artificial skin, Efficiency evaluation

I. 서 론

손상된 피부를 대체하는 생체 이식용 인공피부는 큰 화상이나 외과수술 시 피부 결손이 있는 창상에 적용되어 창상 피복제 역할을 하며 본래의 피부조직이 재생하는 것을 돕는 기능도 있어서, 깊은 2도 이상의 화상, 욕창, 난치성 궤양, 연골손상, 당뇨병성 피부괴사의 치료 등에 이용되고 있다. Yannas와 Burke는 광범위 화상 환자의 치료를 위하여 화상 부위를 피복할 물질을 찾던 중 인공피부를 착안하였고, 세포 외 기질을 구성하는 성분의 하나인 불용성 콜라겐과 glycosaminoglycan(GAG)으로 구성된 인공피부를 개발하였으며,^{1,2} Matsuda 등은 불용성 콜라겐 대신 아테콜라겐을 사용하였다.³

인공피부는 크게 창상 피복제(wound dressing), 인공진피(artificial dermis) 그리고 조직공학적 피부(bio-engineered skin) 등 세 가지로 나눌 수 있다. 창상 피복제는 손상을 입은 피부가 회복될 때까지 일시적으로 환부를 보호, 체내로부터의 수분 노출이나 감염 등을 방지하는 것으로 그 종류로는 젤, 폴리우레탄 막, 키틴 등이 있다. 인공진피는 전층 피부 결손이 있는 창상에 주로 사용되며, 섬유모세포가 쉽게 침투할 수 있는 통로를 제공하고 본래 피부조직으로 재생되는 것을 도우며, 인체 내 분해, 흡수됨을 기본으로 한다. 조직공학적 피부는 피부조직 채취 후 배양 및 증식시켜 인공진피에 부착하여 조직을 형성한 것으로 이식 시 거부반응이 거의 없고 크기를 얼마든지 크게 할 수 있어 화상 정도가 심하고 광범위한 경우 사용된다. 또한, 구성 성분에 의해서도 분류할 수가 있는데, polylactic acid(PLA), poly(lactide-co-glycolide)(PLGA) 등 합성 고분자 재료를 지지체로 하여 배양한 것과 콜라겐, 키토산, 젤라틴, hyaluronan, glycosaminoglycan(GAG) 등 천연 고분자 재료를 이용한 것으로 구분할 수 있다. 그러나 이러한

Received August 30, 2007

Revised February 1, 2008

Address Correspondence: Dong Kyun Rah, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Yonsei University College of Medicine, 134 Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea. Tel: 02) 2228-2215 / Fax: 02) 393-6947 / E-mail: dkrah@yuhs.ac

인공피부들은 면역반응이 일어나 쉽게 탈락되기 쉽거나 분해속도가 빠르기 때문에 장기간 효과적으로 피부 역할을 수행하는데 어려움이 있다. 또한 여러 종류의 인공피부들이 생체 내에서 어떠한 과정을 거쳐서 생착 및 변화가 되며, 그 이후 인공피부의 성능을 어떠한 기준을 이용해서 평가해야 하는지에 대한 확립된 기준이 없어서 이를 체계화 하는 것이 시급하다고 생각된다.

본 연구는 인공진피에 해당하는 PLGA scaffold와 Surederm[®](한스바이오메드, 한국), 조직공학적 피부에 해당하는 Neoderm[®](테고사이언스, 한국) 세 가지 인공피부를 누드마우스의 등에 이식한 후 생착 과정 중 발생하는 변화를 육안적, 조직학적 및 면역화학적 염색법 등을 이용하여 창상 크기변화, 기저층 형성 정도, 혈관 생성 정도, 교원질 발현, 표피층 형성 및 신경섬유 발현 등으로 평가하여 인공피부의 성능 평가에 기초를 마련하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

가. 실험방법

생후 약 6-8주된 누드마우스(male BALB/c-nu 체중: 30-40g) 30마리를 사용하였다. 마취는 Ketamine 45 mg/kg(케타민[®], 유한양행, 한국), xylazine(rompun[®], Bayer HealthCare, Germany) 3 mg/kg를 복강에 주사하여 마취유도 후에 누드마우스의 등쪽 털을 제거하였다. 베타딘(betadine)과 알코올로 환부를 소독한 후 8 mm 피부조직 검사기를 이용해서 누드마우스 등의 위, 아래 두 곳에 전층 피부 결손 창상을 만들었다. 실험군 별로 PLGA scaffold, Surederm[®], Neoderm[®]을 각각 이식한 후 봉합사를 이용하여 고정하고 Tegaderm[®](3M, USA)으로 완전히 밀봉 드레싱을 시행하였다(Fig. 1). 실험군1(PLGA scaffold)과 2(Surederm[®])는 실험군 3(Neoderm[®])과 달리 표피층이 없으므로 인공피부 이식 10일 후에 keratinocyte sheet(Kaloderm[®], 테고사이언

스, 한국)를 사용하여 표피이식을 시행하였다. 실험군 1과 2는 수술 후 4주, 6주에 실험군 3은 수술 후 2주, 4주 후에 안락사 시킨 후 위, 아래 창상으로부터 전층 조직 생검을 시행하였다. 결과 판정을 위해서 Hematoxylin and eosin 염색, Masson's trichrome 염색, neurofilament 면역화학 염색, Ki67 염색을 시행하였다.

나. 실험에 사용된 인공피부

- 1) PLGA scaffold(REGEN Biotech., USA): 합성고분자 지지체로 10 mm 직경과 3 mm 두께를 가지는 것을 사용하였다.
- 2) Surederm[®](한스바이오메드, 한국): 세포성 면역반응의 항원 대상인 표피층과 진피 내 세포들을 제거한 후 동결 건조로 진피층의 3차원 구조를 그대로 유지한 동종 진피(allogenic human dermis)이다. 면역학적 반응이 없는 상태에서 섬유모세포의 유입, 신경, 혈관 재생성에 필요한 골격을 마련해 준다.
- 3) Neoderm[®](테고사이언스, 한국): 섬유모세포(fibroblast)와 콜라겐 젤로 구성된 진피와 keratinocyte가 다층으로 구성된 표피층이 존재하는 3차원 배양피부이다.
- 4) Kaloderm[®](테고사이언스, 한국): 동종의 피부조직으로 배양하여 기저층 위에 분화층이 존재하는 정상 표피조직과 유사한 keratinocyte로 구성된 배양피부이다.

다. 실험군 및 대조군 설정

- 1) 실험군 1: PLGA scaffold와 Kaloderm[®]을 이식한 군(n=6)
- 2) 실험군 2: Surederm[®]과 Kaloderm[®]을 이식한 군(n=8)
- 3) 실험군 3: 표피층을 포함하는 3차원 배양피부, Neoderm[®]을 이식한 군(n=6)

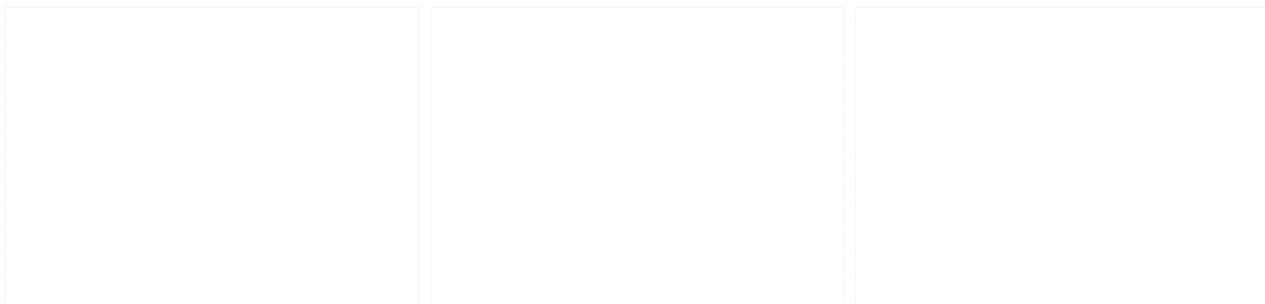


Fig. 1. Method, (Left) Wound formation, (Center) Artificial skin graft, (Right) Fixation with Tegaderm taping.

4) 대조군: 인공피부를 이식하지 않은 군(n=10)

라. 결과관정

1) 창상면적의 측정

각 실험군에서 인공피부이식 후 3일, 7일, 21일째에 디지털 카메라를 이용하여 영상을 얻고 이를 이용해서 실험군의 창상의 면적을 영상분석방법인 image analysis program인 Scion-image®(NIH-Scion corporation, USA)를 통해서 비교하였다. 이를 통해 각 실험군의 창상의 크기와 대조군을 비교해서 창상의 수축 정도를 평가하고자 하였다. 처음 창상과 백분율로 표시하여 Table I과 같이 4단계로 나누어 평가하였다.

2) 혈관의 수

Hematoxylin and eosin 염색을 실시한 후 400배 배

율의 광학현미경으로 한 개의 조직 슬라이드에서 각기 다른 10개의 시야에서 혈관 수를 측정하였다. 평균 혈관 수(angiogenesis index)를 이용하여 각각의 실험군을 Table II와 같이 비교하였다.

3) 기저층(basement membrane, BM)의 형성

실험군에서 수술 후 생검한 조직을 Hematoxylin and eosin 염색과 PAS 염색을 실시하고, 광학현미경으로 관찰하여 기저층 형성 정도를 다음과 같은 기준을 이용하여 각각의 실험군을 Table III과 같이 평가하였다.

4) 교원질(collagen)의 발현

조직을 생검한 후 Masson's trichrome 염색을 실시하고, 광학현미경으로 관찰하여 교원질 발현 정도를 Table IV와 같은 기준으로 평가하였다.

Table I. 창상의 크기 변화 평가기준

평가점수	평가기준
+3	처음 창상의 면적 75% 이상을 유지하며 창상 수축의 정도가 미미한 경우
+2	처음 창상의 면적 50% 이상을 유지하며 경도의 창상 수축을 보이는 경우
+1	처음 창상의 면적 25% 이상을 유지하며 중등도의 창상 수축을 보이는 경우
+0	처음 창상의 면적 25% 이하를 유지하며 심한 창상 수축을 보이는 경우

Table II. 신생혈관 형성 정도 평가기준

평가점수	평가기준
+3	신생혈관 수가 평균 4개 이상을 유지
+2	신생혈관 수가 평균 3개를 유지
+1	신생혈관 수가 평균 2개를 유지
+0	신생혈관 수가 평균 1개 이하를 유지

Table III. 기저층 형성 정도 평가기준

평가점수	평가기준
+3	정상피부의 기저층과 구분할 수 없을 정도로 정상적인 기저층을 유지
+2	기저층의 유지가 확인되지만 정상의 기저층과는 구분됨
+1	정확한 기저층을 형성하지는 않지만 기저층 형성의 흔적을 보임
+0	기저층을 형성하지 않음

Table IV. 교원질 발현량 평가기준

평가점수	평가기준
+3	정상 진피조직과 유사한 교원질의 양과 배열을 보임
+2	발현되는 교원질의 발현 양의 정도는 정상이지만 교원질의 배열이 불규칙적
+1	발현되는 교원질의 발현량이 부족함
+0	이식된 진피 층 전체에서 미미한 교원질 발현을 보임

5) 표피층(epidermal layer)의 형성

조직을 생검한 후 Ki67(clone MIB, Dako) 염색을 실시하고, 광학현미경으로 관찰하여 표피층의 형성 정도를 Table V와 같은 기준으로 평가하였다.

6) 신경섬유(neurofilament)의 발현

조직을 생검한 후 신경 표지자인 neurofilament에 대한 면역화학염색을 실시한 후 광학현미경으로 관찰하여 신경섬유의 발현 정도를 Table VI과 같은 기준으로 평가하였다.

III. 결 과

가. 창상의 크기 변화

처음의 창상면적을 100%로 하였을 때 각 군에서 평균 면적백분율(창상 크기 척도)의 변화는 실험군 1은 3, 7, 21일에서 각각 97.5%(+3), 92.5%(+3), 57.5%(+1), 실

험군 2에서 87.5%(+3), 82.5%(+3), 47.5%(+0)였으며 실험군 3에서는 85.0%(+3), 77.5%(+2), 47.5%(+0)이었다. 아무것도 이식하지 않은 대조군에서는 3주가 지나면 심한 창상 수축이 진행되어 처음 창상의 10% 미만만을 유지하였다(Fig. 2). 실험군에서는 대조군보다 창상의 크기를 유지하면서 생착되는 것을 관찰할 수 있었다 ($p<0.05$).

나. 신생혈관 수의 변화

이식 후 2주째부터 실험군 3에서 혈관 신생이 관찰되었으며 이식 후 6주째에는 모든 실험군에서 혈관 신생이 관찰되었다. 혈관의 수는 실험군 1에서 4주째 1.6개 6주째 0.3개였고 실험군 2에서는 4주째 3.4개, 6주째 2.6개였으며, 실험군 3에서는 2주째 3.7개, 4주째 4.0개로 실험군 1에서 신생혈관이 더 적게 관찰되었다(Fig. 3). 이것을 신생혈관 숫자 척도를 이용하여 나타내보면 다음과 같다(Table VII).

Table V. 표피층의 형성 정도 평가기준

평가점수	평가기준
+3	전형적인 5개 세포층(기저층, 유극층, 과립층, 투명층, 각질층)을 유지
+2	평균 3-4개의 세포층을 유지
+1	평균 2-3개의 세포층을 유지
+0	평균 1개 세포층 이하를 유지

Table VI. 신경 섬유 발현 평가기준

평가점수	평가기준
+3	이식된 피부의 진피 및 표피층 모두에서 신경섬유의 발현이 잘 관찰됨
+2	이식된 조직의 진피에서 풍부하게 관찰되지만 표피층에서는 발현이 관찰되지 않음
+1	이식된 조직의 진피에서 관찰되지만 발현 정도가 적음
+0	이식피부와 정상 조직간의 경계에 국한됨

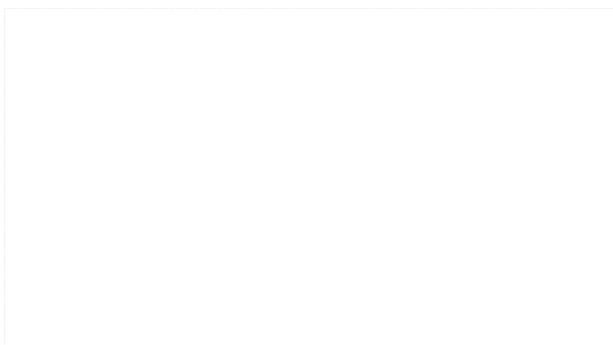


Fig. 2. Wound size change in postoperative 3, 7 and 21 days.

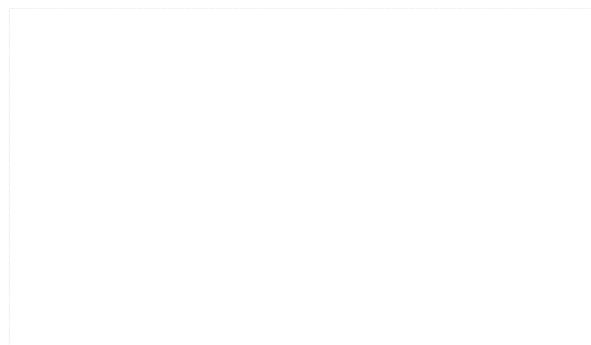


Fig. 3. Degree of angiogenesis.

다. 기저층 형성 정도

기저층 형성 정도는 실험군 2, 3에서는 정상 피부와 유사한 기저층을 관찰할 수 있었으나 실험군 1에서는 기저층의 흔적만을 관찰할 수 있었다(Table VII).

라. 교원질(collagen)의 발현량 비교

이식 2주째 실험군 3에서 표피와 진피 일부에서 신생 교원질의 형성이 일어나기 시작하였으며, 4주째에 실험군 3에서는 2주군에서보다 다소 밀집되어 있었고 진피 전체에 걸쳐 교원질이 증가하였고 교원질의 배열이 더 질서가 있어 성숙된 양상을 보였다. 이식 4주째 실험군 1에서는 교원질이 관찰되지 않았고 실험군 2에서는 미

미한 교원질의 형성이 관찰되었으며, 6주째 실험군 1에서는 표피층에서만 교원질의 형성이 관찰되나 실험군 2에서는 표피와 진피 전체에 걸쳐 고르게 관찰되었고 교원섬유가 섬세하였으며 배열양상도 질서가 있었다(Fig. 4). 교원질의 발현 정도를 성능평가 기준으로 평가하여 보면 Table VII와 같다.

마. 표피층(epidermal layer)의 형성 정도 비교

실험군 1, 2의 경우에서 이식 4주 후부터 표피층의 생성이 관찰되었고 6주 후에 명확한 표피층이 관찰되었으며, 실험군 3의 경우 이식 4주 후에 이미 명확한 표피층의 형성이 관찰되었다(Fig. 5). 이것을 성능평가 기준

Table VII. 인공피부이식 4주 후 신생혈관 형성, 기저층 형성, 교원질 발현, 표피층 형성 및 신경섬유 발현의 정도 평가

	신생혈관 형성	기저층 형성	교원질 발현	표피층 형성	신경섬유 발현
실험군 1	+1	+2	+1	+2	+1
실험군 2	+2	+3	+2	+3	+2
실험군 3	+3	+3	+3	+3	+3

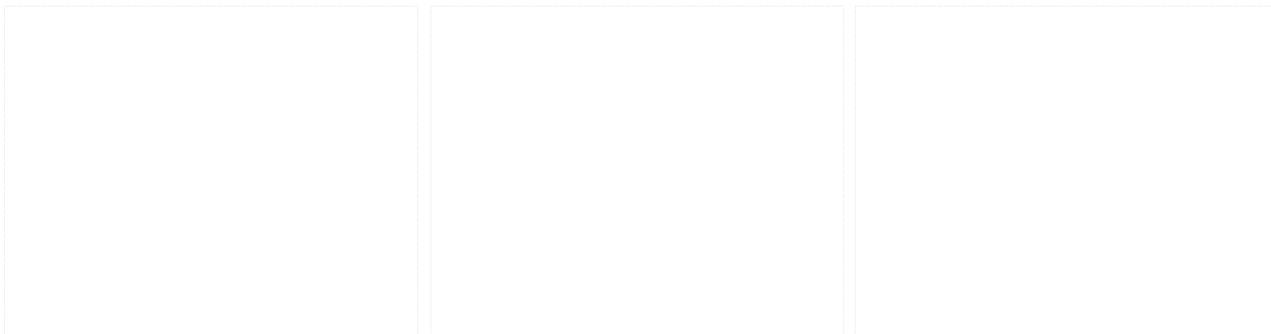


Fig. 4. Collagen synthesis after 4 weeks(Masson's trichrome stain, ×100). (Left) PLGA scaffold and keratinocyte sheet, scanty amount of collagen fibers in artificial dermis(score +1). (Center) Surederm[®] and keratinocyte sheet, abundant collagen fibers with irregular arrangement in artificial dermis(score +2). (Right) Neoderm[®], abundant collagen fibers with regular arrangement in dermis(score +3).

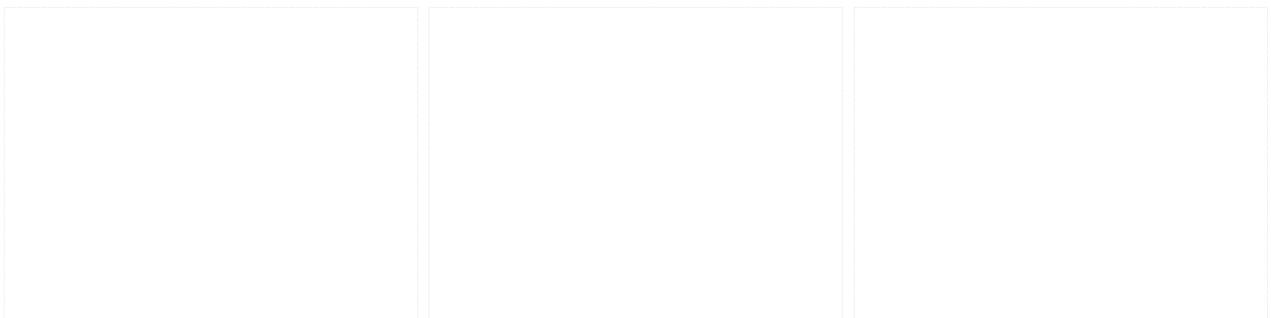


Fig. 5. Epidermis formation after 4 weeks(Ki67 stain, ×100). (Left) PLGA scaffold and keratinocyte sheet, 2 layers of epidermis(score +1). (Center) Surederm[®] and keratinocyte sheet, full layers of epidermis(score +3). (Right) Neoderm[®], full layers of epidermis(score +3). Arrows indicate the basal layer of epidermis.

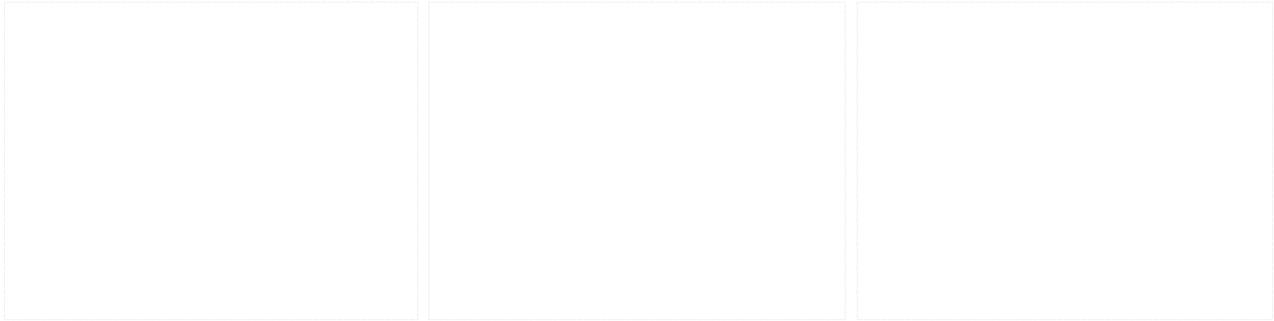


Fig. 6. Neurofilament synthesis after 4 weeks(neurofilament immunochemical stain, $\times 100$). (Left) PLGA scaffold and keratinocyte sheet, scanty amount of neurofilaments in artificial dermis(score +1). (Center) Surederm[®] and keratinocyte sheet, abundant neurofilaments in artificial dermis(score +2). (Right) Neoderm[®], both epidermis and dermis show abundant neurofilaments(score +3). Arrows indicate the neurofilaments.

에 맞추어 표시하면 Table VII과 같다.

바. 신경섬유(Neurofilament)의 발현

실험군 3에서는 이식 2주 후부터 진피 내에 신경섬유의 발현이 보였으며 이식 4주 후에는 진피와 표피층 모두에서 신경섬유 발현이 관찰되었다. 실험군 1의 경우 이식 6주 후가 되어야 진피층 내에서 신경섬유의 발현이 관찰되었으며 실험군 2의 경우 이식 4주 후에 진피층 내에서 발현되기 시작한 신경섬유가 이식 6주 후에는 표피층에서도 관찰되었다(Fig. 6). 이것을 기능평가 기준에 따라 표시하면 Table VII와 같다.

IV. 고 찰

진피는 교원섬유와 탄성섬유 그리고 세포간 기질 단백질로 구성되어 있으며 피부의 탄력성, 안정성 및 외양을 결정해 준다. 진피 대체물로는 합성된 기질을 이용한 진피 대체물¹²과 동종피부에서 항원성을 가진 세포를 제거한 무세포 진피(acellular dermis) 등이 있다. 합성기질을 이용한 진피대체물은 생체 내 단백질성분의 1/3을 차지하는 교원질을 이용한 것으로 교원질은 조직과의 친화성이 높아 생체 내에서 자연스럽게 흡수되어 숙주의 조직과 치환되는 장점 때문에 조직 재구축 재료로 이용되고 있다.⁴ 이러한 인공진피들은 국내에서 현재 실제로 임상 적용되고 있으며 원래의 목적인 피부 결손의 재건 외에 여러 가지 분야에서 이용되고 있다.

진피 대용물질은 정상 진피가 갖는 특성에 가깝도록 고안되어야 한다. 정상진피는 콜라겐 섬유의 3차원적 배열에 의해 그 기능이 특징지어지며 콜라겐의 3차원적 배열구조의 이상은 진피의 정상적인 기능상실을 유발할 수 있다.⁵ 그렇기 때문에 인공진피는 구조적으로 창

상으로부터 창상치유 과정에 필요한 세포가 잘 이동할 수 있게 하는 일종의 골격과 같으며 이것에서 새로 형성되는 결체조직은 알맞은 3차원 구조를 이루어야 한다.⁶ 인공진피는 새로운 진피로 대체되기 전까지는 그 골격을 유지해야 하지만 서서히 생분해되어 새로운 신생 결체조직으로 대체되어야 하고 생물학적 유사성이 있어 면역반응이 최소화 되어야 한다. 또한 인공진피에서 세포독성이 있는 물질이 유리되어서는 안 되며 사용할 때 조작이 용이해야 한다.

본 연구에서는 인공피부가 창상수축에 미치는 영향을 평가하기 위해 각각의 인공피부를 이식한 실험군과 아무것도 이식하지 않은 대조군에서의 창상의 크기 변화를 비교하였는데 실험군 간에 미미한 차이는 있으나 대체로 창상의 크기를 유지하면서 생착되는 반면, 대조군에서는 심한 창상수축이 진행되어 처음 창상의 10% 미만의 크기로 줄면서 치유되었다. 이는 인공피부가 창상수축을 억제하는데 관여하는 것으로 생각된다.⁷ 정상진피는 이식하였을 때 창상 수축을 억제하는 능력이 있는데 아직까지 그 기전은 완전히 밝혀져 있지 않다. 창상 수축은 창상의 치유에 필요한 하나의 생물학적 기전이나, 임상적으로는 유방 보형물의 주위에 생기는 피막 구축, 피부의 반흔구축 등의 예에서 볼 수 있듯이 바람직하지 않은 결과를 초래할 수 있다.^{8,9} 창상수축의 기전에 대해서, Rudolph 등은 근섬유모세포가 중요한 역할을 한다고 하였으며,¹⁰ 최근에는 진피에서 콜라겐 간질의 중요성이 강조되고 있다.¹¹⁻¹³

인공진피가 수용자의 진피로 대체되기 위해서 혈관이나 섬유모세포 등이 인공진피 내로 침투가 잘 되어야 하는데, 본 실험결과 실험군 1보다 실험군 3에서 신생혈관이 잘 관찰되었다. 이러한 차이는 곧 인공피부의 혈액공급의 차이를 의미하기 때문에 인공피부를 이식

하였을 때 생착률의 차이로 나타날 수도 있을 것이다. 기저층 형성 정도는 실험군 1에서는 그 흔적만을 볼 수 있었으나, 실험군 2, 3에서는 정상적인 기저층을 유지하였다. 표피세포는 기저막이 있는 부위에서 잘 부착되고 증식하여, 표피화가 잘 일어나는 것으로 되어 있다.¹⁴ PLGA 지지체와는 달리 무세포성 진피기질이나 3차원 배양피부에는 기저층이 유지되기 때문에 배양된 표피를 이식하였을 경우에도 표피와 진피 사이에 반결합소체(hemidesmosome)나 고정 섬유소 등이 유지가 잘 되어 다른 인공진피에 비해 술후 표피가 벗겨지거나 물질이 잘 생기지 않는다. Trichrome 염색으로 평가한 새로이 생성되는 교원질의 발현은 실험군 3, 2, 1 순서대로 정상 진피조직과 유사한 교원질 양과 배열을 보였으며, 이는 인공진피를 만들 때 콜라겐을 교차 결합시키는 과정에서 어떠한 물질을 사용하는가에 따라 생착률에 차이가 생길 수 있다는 것을 의미한다. 또한 실험군 2와 3에서처럼 동종진피에서 만들어진 인공피부의 경우 정상진피 구조를 가진 상태이기 때문에 수혜부 조직과의 친화성이 높아 조기에 섬유모세포의 침윤이 생기고 그로 인해 교원질의 생성이 빨리 나타난 것으로 보인다.

V. 결 론

본 연구는 누드마우스에서 인공피부를 이식 후 생착된 인공피부를 평가한 결과 창상의 면적 변화는 PLGA scaffold, 무세포 진피, 3차원 배양피부에서 모두 아무런 대체물도 이식하지 않은 대조군에 비해 구축이 적게 일어났으며, 신생혈관, 콜라겐과 neurofilament의 합성에서는 3차원 배양피부, 무세포 진피, PLGA scaffold 순서대로 활발하게 생성된 것으로 나타났다. 기저층과 표피층의 생성 정도를 알아본 실험에서는 3차원 배양피부, 무세포 진피에서 비슷하게 나타났으나 PLGA scaffold에서는 그 결과가 미미했다. 본 실험에서 사용한 기준은 인공피부의 이식 후 생착 및 성능을 평가하는데 좋은 지표가 될 수 있으며, 각각의 평가항목을 좀 더 수치화한다면 인체에 사용되는 인공피부의 성능 평

가에 좋은 지표로 이용할 수 있을 것이라 생각된다.

REFERENCES

1. Yannas IV, Burke JF: Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res* 14: 65, 1980
2. Burke JF, Yannas IV, Quinby WC Jr, Bondoc CC, Jung WK: Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg* 194: 413, 1981
3. Matsuda K, Suzuki S, Isshiki N, Ikada Y: Re-freeze dried bilayer artificial skin. *Biomaterials* 14: 1030, 1993
4. McPherson JM, Sawamura S, Armstrong R: An examination of the biologic response to injectable, glutaraldehyde cross-linked collagen implants. *J Biomed Mater Res* 20: 93, 1986
5. Burke JF: Observations on the development of an artificial skin: Presidential Address, 1982 American Burn Association Meeting. *J Trauma* 23: 543, 1983
6. Matsui R, Osaki K, Konishi J, Ikegami K, Koide M: Evaluation of an artificial dermis full-thickness skin defect model in the rat. *Biomaterials* 17: 989, 1996
7. Frank DH, Bonaldi LC: Inhibition of wound contraction: comparison of full thickness skin grafts, Biobrane and aspartate membranes. *Ann Plast Surg* 14: 103, 1985
8. Billingham RE, Medawar PB: Contracture and intussusceptive growth in the healing of extensive wounds in mammalian skin. *J Anat* 89: 114, 1955
9. Rudolph R, Abraham J, Vecchione T, Guber S, Woodward M: Myofibroblasts and free silicone around breast implants. *Plast Reconstr Surg* 62: 185, 1978
10. Rudolph R: Inhibition of myofibroblasts by skin grafts. *Plast Reconstr Surg* 63: 473, 1979
11. Brown D, Garner W, Young VL: Skin grafting: dermal components in inhibition of wound contraction. *South Med J* 83: 789, 1990
12. Agren MS, Mertz PM: Are excessive granulation tissue formation and retarded wound contraction due to decreased collagenase activity in wound in tight-skin mice? *Br J Dermatol* 131: 337, 1994
13. Corps BV: The effect of graft thickness, donor site and graft bed on graft shrinkage in the hooded rat. *Br J Plast Surg* 22: 125, 1969
14. Chetty BV, Boissy RE, Warden GD, Nordlund JJ: Basement membrane and fibroblast aberration in blisters at the donor, graft, and spontaneously healed sites in patients with burns. *Arch Dermatol* 128: 181, 1992