

## In Vitro 환경에서 엘라스틴을 혼합한 콜라겐 진피 지지체의 내구성

유대현 · 홍종원 · 탁관철

연세대학교 의과대학 성형외과학교실, 인체조직복원연구소

### The Durability of Elastin-Incorporated Collagen Matrix for Dermal Substitute *in Vitro* Condition

Dae Hyun Lew, M.D., Jong Won Hong, M.D.,  
Kwan Chul Tark, M.D., Ph.D., F.A.C.S.

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

**Purpose:** Since the report of artificial dermis manufacturing method using collagen by Yannas in 1980, collagen has been effectively used as dermal substitute with its merits such as, lower antigenicity, controllable biodegradation rate, and minimal inflammatory cytotoxic properties in the dermal tissue engineering field. However, weak mechanical durability was the main drawback of collagen dermal substitute. To improve its stability, mechanical or chemical cross-linking was used. Despite of such process, its clinical use was restricted due to weak durability. To improve the durability of collagen matrix, we designed elastin-incorporated collagen matrix and compared its durability with conventional collagen matrix.

**Methods:** 15 mm diameter with 4 mm thick collagen dermal matrix was made according to Yannas protocol by mixing 0.5% bovine collagen and chondroitin-6-sulfate followed by degassing, freeze drying, dehydrodermal cross-linking and chemical cross-linking procedure. In elastin incorporated collagen matrix, same procedure was performed by mixing elastin to previous collagen matrix in 4 : 1 ratio(collagen 80% elastin 20%). In comparison of the two dermal matrix *in vitro* tests, matrix contracture rate, strain, tensile strength, was measured and stiffness was calculated from comparative analysis.

**Results:** In terms of matrix contracture, the elastin-incorporated added collagen dermis matrix showed 1.2 times more contraction compared to conventional

collagen matrix. However, tensile strength showed 1.6 times and stiffness showed 1.6 times increase in elastin-incorporated matrix.

**Conclusion:** Elastin incorporated collagen matrix manufactured by our team showed increased durability due to improvement in tensile strength and stiffness compared to previous collagen matrix(Integra®).

**Key Words:** Elastin, Collagen, Dermis, Durability

### I. 서론

인간의 진피(human dermis)는 주로 connective tissue와 vascular network로 구성되어 있으며 구성성분은 주로 콜라겐(collagen)과 glycosaminoglycans으로 이루어져 있어, 피부의 유연성과 물리적 저항에 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한 진피는 상처의 치유와 재생 과정(wound healing and remodeling)에 있어 세포의 이동을 유도하고 촉진하는 역할을 한다.<sup>1</sup> 따라서 진피 대체물(dermal substitute)은 상처의 치유를 촉진할 뿐 아니라 상처의 구축을 감소시킴으로 피부의 유연성과 질감을 개선시켜 미용적, 기능적인 결과를 개선시키는 작용을 한다. 이와 같은 진피 대체물을 만들기 위하여는 1) 지혈성을 지니고 생체에 부착성이 있으며, 2) 상처 치유 과정의 초기에는 내구성을 지니고 점차 흡수될 수 있으며, 3) 적절한 생체 내 분해 시간을 지니며, 4) 상처의 상피화(epithelization)를 촉진하는 등의 성상을 지니고 있어야 하며 이런 이상적인 진피 대체물을 개발하기 위한 많은 연구가 있어 왔다. 그 동안 진피 대체물의 구성 성분으로 콜라겐, hyaluronic acid, chitosan, polyglycolic, polylactic acid 등의 다양한 재료들이 연구되었으나, 그 중에서도 콜라겐은 낮은 항원성(lower antigenicity), 조절 가능한 생체 내 분해율(controllable biodegradation rate), 낮은 염증 반응 및 세포 독성(minimal inflammatory cytotoxic properties) 등과 같은 장점들로 인해 임상적으로 유용하게 사용되어 왔다. 그러나 물리적, 화학적 교차 결합(mechanical, chemical cross-linking)에도 불구하고 물리적 취약성(weak mechanical stability)으

Received July 10, 2007  
Revised October 25, 2007

**Address Correspondence:** Dae Hyun Lew, M.D., Ph.D.,  
Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Yonsei  
University College of Medicine, Box 8044, Seoul, Korea. Tel:  
02) 2228-2217 / Fax: 02) 393-6947 / E-mail: dhlew@yuhs.ac

로 인해 자유로운 임상 적용에 제한이 있다. 상용화되어 있는 인조 진피인 Integra<sup>®</sup>나 Terudermis<sup>®</sup> 등은 약한 내구성을 보완하기 위해 표면에 Silicon sheet를 부착하였지만, 여전히 내구성에 문제점을 보이고 있어 구강 내와 같이 굴곡이 심한 부위에서는 직접적인 봉합이 불가능하여 임상 적용에 제한이 있어 왔다.

보다 물리적인 내구성이 강하고 독성이 없는 기질을 개발하기 위해 본 연구에서는 진피의 구성 성분으로 수축과 장력에 관계하는 엘라스틴을 콜라겐에 첨가하여 새로운 진피 기질을 제조하였고, 이의 물리적 내구성을 기존의 콜라겐만으로 제조된 진피 기질(Integra<sup>®</sup>)과 비교 분석하였고 조직 공학에서 가장 흔하게 사용되는 진피 기질의 작성 방법에 대하여 고찰해 보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 콜라겐 진피 지지체(Collagen Glycosaminoglycan)의 제조

기존의 콜라겐 진피 기질은 Yannas 등이 최초로 기술한 protocol<sup>2,3</sup>에 따라 제조하였다. 0.5% bovine hide collagen(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 0.05 M acetic acid(pH 3.2)에 섞은 후 4°C의 온도를 유지할 수 있도록 냉장 관류가 가능한 재킷을 가진 blender에서 1500rpm로 90분간 혼합(blending)하여 콜라겐 현탁액(collagen slurry)을 제조하였다. 이 현탁액에 다시 chondroitin 6-sulfate(Type C, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 1.375 mg/mL/min 속도로 섞으면서 혼합한 후 다시 1500 rpm에서 15분간 더 혼합하였다.

생성된 현탁액을 삼각 플라스크에 옮기고 음압에 의하여 약 1시간 동안 degassing과정을 거쳐 모든 공기 기포를 제거하였다. 만들어진 콜라겐 현탁액을 15 mm 직경을 갖는 둥근 templates에 기포가 발생하지 않도록 조심하면서 0.7 mL씩 분주하였다. 분주된 콜라겐 현탁액은 -40°C에서 24시간 동안 냉동 건조(freeze drying procedure: Virtis Unitop 800L, Virtis, Gardiner, NY, USA)시킨 후, 103°C에서 20시간 동안 건조 물리적 공유 결합(dehydrodermal cross linking: 103°C, <math>7.0 \times 10^{-2}</math> mmHg × 20 hours)을 유도하여 직경 15 mm, 두께 4 mm의 다공성 기질(porous matrix)로 제조하였고 이후 0.025% glutaraldehyde(GA)에 24시간 동안 담가 화학적 교차 결합을 유도하였다. 콜라겐에 엘라스틴(Elastin from bovine neck ligament, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 제조한 지지체 기질은 기존의 콜라겐 기질에 엘라스틴을 4:1의 비율로 혼합한 후 상기 서술한 것과 같은 방법으로 제조하였다.

### 나. 각 진피 기질의 내구성 측정

두 진피 기질의 내구성 비교는 *in vitro* 상에서 각각 기질의 수축률(matrix contracture rate)과 긴장도(strain), 장력(tensile strength, stress)을 측정 후, 이를 토대로 강직도(stiffness)를 산출하여 비교 분석하였다.<sup>4</sup> 기질의 수축력은 신체 내 조건과 같은 조건을 갖춘 인큐베이터(37°C, 40% CO<sub>2</sub>) 내에서, Dulbecco's modified eagle medium(Invitrogen-Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 약 6일간 콜라겐 스폰지를 유지 시킨 후 최초 크기와 비교 지지체의 변화 정도를 %로 계산하여 측정하였다. 수축 전·후 사진을 디지털 이미지를 통하여 day 0와 day 6에 찍고 이 사진을 크기 보정작업을 통하여 image analysis program인 Scion-image<sup>®</sup>(NIH-Scion corporation, USA)을 이용 면적을 측정하였다. 측정된 면적은 다음 공식에 의하여 수축률을 측정하였다.

$$\text{수축률(Matrix contracture rate)} = \frac{(SA_{\text{day0}} - SA_{\text{day6}})}{SA_{\text{day0}}}$$

(SA<sub>day0</sub>=Surface Area Day 0, SA<sub>day6</sub>=Surface Area Day 6)

기질의 최대 길이는 기질이 끊어지기 전까지의 길이를 6" digital electronic caliper를 이용하여 측정하였으며(L) 최초길이는 L<sub>0</sub>로 표기하고 기질 긴장도(strain)는 다음 공식에 의하여 측정하였다.

$$\text{긴장도(strain: } \epsilon) = \frac{(L - L_0)}{L_0}$$

(L: elongated length, L<sub>0</sub>: original length)

기질의 최대 장력(Maximal matrix tensile strength, stress)은 digital force gauge(DFI 10: Chantillon, San Leandro, CA)를 이용 스폰지가 둘로 나누어지기 시작하는 순간의 힘을 측정하고 이를 다시 기질의 단면적으로 나뉘서 기질의 최대 장력(stress)를 계산하였다.

$$\text{최대 장력(stress: } \sigma) = \frac{\text{Force}}{\text{Area (N/cm}^2\text{)}}$$

이와 같이 산출한 최대 장력을 긴장도로 나눈 값을 기질의 강직도(Modulus of elasticity, stiffness)로 정의했다.

$$\text{강직도(Stiffness)} = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

### 다. 통계

모든 결과는 중앙값과 IQR(사분의 편차)로 표시되었다. 통계적 유의성은 통상적인 정규분포를 예측할 수 없어 비모수검정인 만-위트니 U 검정(Mann-Whitney

U test)으로 분석하였다. 모든 자료는 Box & Whisker plot을 이용하여 표현하였으며 box 내 선은 중앙값 (median value)을, 바(bar)는 최대값과 최소값을 표시하고 있다. 모든 통계 분석에는 SPSS(version 12.0, SPSS, Inc, Chicago)를 사용하였다.

### III. 결 과

기질 수축률은 엘라스틴이 배합된 콜라겐 진피 지지체가 48.66(43.01, 50.37)%로 기존의 콜라겐 진피 기질

(Integra<sup>®</sup>)의 수축률 40.59(38.09, 44.18)%에 비하여 1.2 배 더 많은 수축을 보였다( $p < 0.1$ , Fig. 1). 긴장도에서는 엘라스틴이 배합된 콜라겐 진피 지지체가 3.13(2.46, 3.87)로 콜라겐 진피 대체물 4.14(3.57, 4.45)보다 작게 나왔다 (Fig. 2). 그러나 물리적 내구성의 척도인 장력의 경우에는 엘라스틴이 배합된 콜라겐 진피 지지체가 0.0034 (0.0032, 0.0044) LB/mm<sup>2</sup>로 기존의 콜라겐 진피 기질 0.0023(0.0018, 0.0028) LB/mm<sup>2</sup>에 비하여 1.5배 우수한 결과를 나타내었다( $p < 0.05$ , Fig. 3). 강직도의 경우도 엘라스틴이 배합된 콜라겐 진피 지지체가 0.0012(0.0010,



Fig. 1. Comparison between collagen-based dermal matrix and elastin incorporated collagen matrix for contraction (n=4). The elastin incorporated collagen dermis showed matrix contracture rate of 48.66(43.01, 50.37)%, 1.2 times more contraction compared to conventional collagen matrix (Integra) which showed contracture rate of 40.59(38.09, 4.18)% (\* $p < 0.1$ , Elastin inco: elastin added collagen matrix).

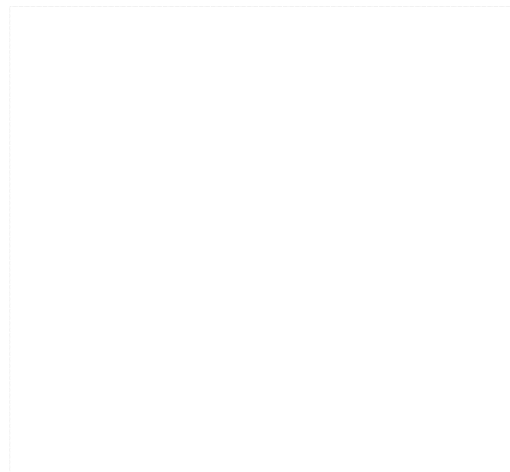


Fig. 3. Comparison of tensile strength between collagen-based dermal matrix and elastin incorporated dermal matrix. The elastin incorporated collagen dermal substitute reported 0.0034(0.0032, 0.0044)LB/mm<sup>2</sup>, 1.5 times greater results as to 0.0023(0.0018, 0.0028)LB/mm<sup>2</sup> of the conventional collagen matrix( $^{\dagger}p < 0.05$ ).

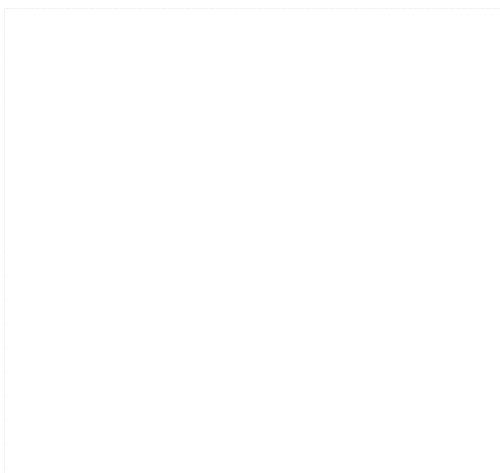


Fig. 2. Comparison between collagen-based dermal matrix and elastin incorporated Collagen matrix for strain. The elastin incorporated collagen dermal substitute reported 3.13(2.46, 3.87), lesser than conventional collagen matrix.

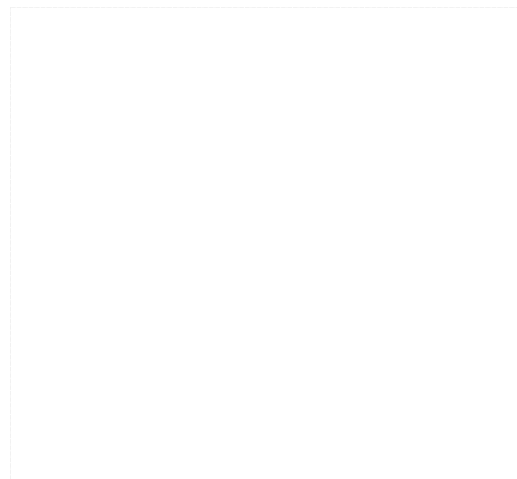


Fig. 4. The elastin incorporated collagen dermal substitute reported 0.0012(0.0010, 0.0013), 2 times more stiffness compared to 0.0006(0.0004, 0.0007) of the conventional collagen dermal matrix( $^{\dagger}p < 0.05$ ).

0.0013), 기존의 콜라겐 진피 기질 0.0006(0.0004, 0.0007)로 약 2배의 강직도 증가를 보였다( $p < 0.05$ , Fig. 4).

#### IV. 고 찰

최근 들어 조직공학의 눈부신 발전으로 상업적으로 이용 가능한 많은 인조 진피들이 개발되었다. 콜라겐을 이용한 지지체에 물리 화학적 교차결합을 거친 Integra<sup>®</sup>(Integrated Lifesciences Corporation, Plainsboro, NJ, USA)를 비롯 섬유아세포를 포함하는 Apligraf<sup>®</sup>(Organogenesis, Inc., Canton, MA, USA), 그리고 콜라겐 지지체에 물리적 교차결합만을 시행한 Terudermis<sup>®</sup>(Terumo Co., Tokyo, Japan), 그 외에도 Dermagraft<sup>®</sup>, Transcyte<sup>®</sup>(Smith and Nephew, Largo, FL, USA), Pelnac<sup>®</sup>(Johnson and Johnson, Tokyo, Japan) 등 많은 제품들이 출시되어 화상이나 광범위한 조직결손이 있을 경우 진피층의 재건이나 창상 치유를 위하여 사용되고 있다. 이들은 손상된 조직을 대체할 뿐만 아니라 원 조직이 자라 들어 올 수 있는 3차원 공간(scaffold)을 제공함으로써 창상 치유를 촉진시킨다. 그러나 이와 같은 제품들은 기본적으로 다공성의 콜라겐 지지체이므로 물리적 성상이 매우 약해 조직의 굴곡이 많거나 방수가 필요한 부위의 water tight 봉합이 필요한 경우에는 사용하지 못하는 단점이 있다.

이와 같은 진피 지지체들이 임상에서 효과적으로 쓰이기 위하여서는 고정 혹은 봉합이 가능할 정도로 피부와 비슷한 정도의 내구성이 제공되어야 하며 아울러 일정 기간 동안 이들이 생분해 되지 않고 지지체를 유지해 주어야 한다. 또한 지지체 내로 조직의 재생 및 세포 및 혈관의 성장이 유도될 수 있도록 지지체내 독성이 없어야 한다.

Koide와 Daito<sup>5</sup>는 콜라겐을 이용한 지지체의 경우 효소에 의한 분해에 취약하여 기계적으로 약한 성상을 나타낸다고 하였다. Yannas와 Burke<sup>2</sup>는 이와 같이 취약한 물리적 성상을 강화하기 위하여 생성한 지지체에 물리적 혹은 화학적 교차결합을 시도하였다.

그러나 이와 같은 방법으로 만든 오늘날 보편적으로 사용되는 콜라겐 진피 대체물들은 여러 가지 교차결합에도 불구하고 이들이 수술적인 봉합사를 유지할 만큼 튼튼한 내구성을 지지고 있지 못하여 대부분의 제품의 경우 폴리에틸렌 필름제재를 지지체 위층에 덮어 사용하고 있다.

뿐만 아니라 이들 합성된 콜라겐 지지체들은 인체 피부에서 세포성분을 제거하여 만든 무세포 진피물(Alloderm<sup>®</sup>)에 비하여 혈관이나 창상치유에 작용하는

많은 세포들이 지지체로 자라 들어가는 시간이 길어 생착력이 떨어지므로 동시에 피부이식을 할 수 없는 단점이 있다.<sup>6</sup> 이는 내구성을 위하여 지지체의 두께를 무세포 진피물에 비하여 두껍게 작성한 것도 하나의 원인으로 볼 수 있는데 생착을 위하여 지지체의 두께를 얇게 할 경우 내구성은 더 떨어지게 된다.

이러한 콜라겐 지지체의 내구성을 증가시키는 방법은 크게 물리적이거나 화학적 방법을 이용 조직의 교차결합을 유도하는 방법과 그 구성 성분자체를 변화시켜 내구성을 증가시키는 방법으로 나누어 생각할 수 있다. 교차결합은 다시 물리적인 방법과 화학적인 방법으로 나눌 수 있으며 물리적 교차결합에는 대표적으로 열을 이용하는 방법(dehydrothermal treatment)과 적외선(ultra-violet light treatments) 등을 이용하는 방법이 있다. 그러나 자외선에 의한 방법은 자외선이 도달하는 깊이가 지지체의 표면에 국한하므로 지지체가 두꺼울 경우 내부까지 균일하게 교차결합을 유도하기 어렵다는 점과 교차결합의 강도가 약하다는 점, 그리고 적정 시간 이 지날 경우 오히려 지지체가 부서지는 등 적외선 투여량이 적정화(optimization)가 되어 있지 못하다는 단점이 있어 현실적으로 잘 사용되지 않고 있다. 화학적인 교차결합에는 대표적으로 GA, isocyanates, alcohol, formaldehyde, imidoesters(Chvapil) 등이 이용되고 있다. 이들 가운데 GA는 단백질의 amino lysine groups을 교차결합으로 연결하여 각 콜라겐을 격자모양의 네트워크로 만들므로 지지체를 더욱 강하고 단단하게 만든다. 오늘날 GA는 화학적 교차결합의 대표적인 방법으로 이용되고 있으며 이와 같은 방법을 이용한 대표적 제품이 Integra<sup>®</sup>이다.

물론 모든 화학적 교차결합물질은 잠재적으로 세포 독성을 지니고 있다.<sup>7,8</sup> 그러나 그 중에서도 GA는 매우 강한 독성을 가진 물질로 비록 4-5회의 세척과정을 거친다 하더라도 매우 미량의 GA가 지지체 내에 남아 있게 되고<sup>9-11</sup> 지지체 내에 남아 있는 GA는 세포막의 단백질에 독성반응을 일으킨다. Huang-Lee 등은 이와 같은 독성 반응이 교차결합 후 약 6개월까지도 유지될 수 있음을 보고하였는데 실험적으로 화학적 교차결합을 시도한 건(tendon)에 있어서 건 주위에 섬유아세포가 증식하지 않음을 보고 하였다.<sup>11</sup> Torres 등은 거둬낸 세척에도 불구하고 화학적 교차결합 후 잔재한 GA가 세포 성장에 매우 독성 영향을 끼침을 보고하였다. 즉 GA로 교차결합을 유도한 지지체가 물리적 교차결합 UV-treated을 유도한 지지체에 비하여 특히 세포 배양 후 3-6일 이후 세포 성장률이 적음을 보고하였다.<sup>12</sup>

오늘날 사용되고 있는 진피 대체물 중 화학적 교차결



합으로 만들어진 Integra<sup>®</sup>의 경우 임상적으로 혈관화까지 약 2주의 기간이 소요되며 기관에 따라 약 10-20%에 있어서 피부 이식 후 생착 실패가 보고되고 있다. 따라서 이 경우 지지체 이식과 피부이식의 동시 시술이 불가능하며 일차적으로 지지체 이식 후 약 2주 이상의 혈관화 기간을 거친 다음 피부 이식을 시행하고 있다. 이와 같은 사실은 진피 지지체 내에 남아 있는 독성물질이 비록 인체 전체에 영향을 미칠 정도의 양은 아니더라도 지지체 내로의 세포의 성장에 부정적 영향을 미친다고 추정해 볼 수 있다.

교차결합 외에 지지체 자체의 구성 성분을 변화시킴으로써 지지체의 물리적 내구성을 증가시켜 보다 강한 인조 진피를 만들 수 있다. 현재까지 gelatin,<sup>13</sup> hyaluronic acid,<sup>14</sup> chitosan,<sup>15</sup> poly(lactic-co-glycolic acid)-collagen 등<sup>16</sup>의 많은 성분들을 배합한 지지체의 성상들이 연구되어 왔다. 그러나 내구성에 있어 별다른 차이를 보이지 않았으며 서할 등<sup>14</sup>은 인체 진피의 구성성분 중의 하나인 hyaluronic acid를 콜라겐과 혼합하여 지지체를 만든 결과 기존의 지지체와 비교하여 큰 차이가 없음을 밝히고 hyaluronic acid를 혼합하는 경우 그리 큰 이점이 없다고 하였다.

정상적인 진피에서 엘라스틴의 비율은 2-4%이나 대동맥과 같이 내구성이 높은 조직의 경우 그 비율은 약 50%에 이른다. 피부에서 엘라스틴의 비율이 극히 적지만 진피의 구성성분 중 탄력성이나 내구성에 관여하는 인자 중 가장 중요한 역할을 한다. 엘라스틴은 탄성 섬유 구조인 경단백질로 황색의 망상구조를 구성하고 있다. 이 단백질의 amino acid 조성은 glycine과 proline 함량이 많은 점이 콜라겐과 비슷하나 콜라겐 분자가 arginine과 hydroxyproline 함량이 많은 부분을 잃고 엘라스틴이 되는 것으로 추측된다. 열·알칼리·단백질 분해효소에 대한 저항성은 콜라겐보다 강하고 탄성섬유(elastic fiber)는 결합조직에 포함되는 교원 섬유에 비하여 신장성이 훨씬 크다.<sup>17</sup> 엘라스틴은 random coil의 구조를 많이 포함하고 있으며, glycine의 결사슬은 서로 cross linking을 많이 하고 있다. 이것이 높은 탄성의 원인으로 생각된다.

본 연구에서 엘라스틴의 비율은 정상 피부의 구성비율보다 높고 대동맥 보다는 낮은 중간 정도인 20%에서 실험을 디자인하였다. 콜라겐에 엘라스틴을 첨가하여 제조한 지지체는 기존의 콜라겐만으로 구성된 지지체(Integra<sup>®</sup>)에 비해 장력과 강직도가 향상됨으로써 내구성이 향상되는 결과를 보였다. 이것은 콜라겐만으로 제조된 진피 대체물(Integra<sup>®</sup>)보다 내구성이 강한 피부 대체물로 임상적으로 보다 유용하게 사용될 수 있을 것으

로 사료된다. 또한 다른 기질을 사용한 방법에 비하여 일차적인 수축이 매우 많아진다는 것이 문제점으로 대두되었다. 이는 따라서 향후 콜라겐과 엘라스틴의 혼합 비율에 따른 강도 및 수축에 대한 지속적인 연구를 통하여 혼합 비율의 적정화에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 물론 실험 조건이 진피의 주구성세포인 섬유모세포나 염증세포를 혼합배양하여 내구성의 정도를 측정하지는 못했지만 그 전 단계로서 온도와 습도의 조건에 국한함으로써 일정한 조건에서의 내구성에 국한시켰다. 따라서 엘라스틴을 배합한 지지체의 세포 반응 및 생체 내에서의 반응 등을 규명하기 위한 지속적인 연구 또한 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구자들이 엘라스틴을 첨가하여 제조한 콜라겐 지지체는 기존의 콜라겐만으로 구성된 지지체(Integra<sup>®</sup>)에 비해 장력과 강직도가 향상됨으로써 내구성이 향상되는 결과를 보였다.

## REFERENCES

1. Ruszczak Z: Effect of collagen matrices on dermal wound healing. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 1595, 2003
2. Yannas IV, Burke JF: Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res* 14: 65, 1980
3. Yannas IV, Burke JF, Gordon PL, Huang C, Rubenstein RH: Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res* 14: 107, 1980
4. Lew DH, Liu PH, Orgill DP: Optimization of UV cross-linking density for durable and nontoxic collagen GAG dermal substitute. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 82: 51, 2007
5. Koide T, Daito M: Effects of various collagen crosslinking techniques on mechanical properties of collagen film. *Dent Mater J* 16: 1, 1997
6. Chu CS, McManus AT, Matylevich NP, Goodwin CW, Pruitt BA Jr: Integra as a dermal replacement in a meshed composite skin graft in a rat model: a one-step operative procedure. *J Trauma* 52: 122, 2002
7. Oliver RF, Grant RA, Cox RW, Cooke A: Effect of aldehyde cross-linking on human dermal collagen implants in the rat. *Br J Exp Pathol* 61: 544, 1980
8. Petite H, Rault I, Huc A, Menasche P, Herbage D: Use of the acyl azide method for cross-linking collagen-rich tissues such as pericardium. *J Biomed Mater Res* 24: 179, 1990
9. Stenzel KH, Miyata T, Rubin AL: Collagen as a biomaterial. *Annu Rev Biophys Bioeng* 3: 231, 1974
10. Golomb G, Schoen FJ, Smith MS, Linden J, Dixon M, Levy RJ: The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. *Am J Pathol* 127: 122, 1987

11. Huang-Lee LL, Cheung DT, Nimni ME: Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks. *J Biomed Mater Res* 24: 1185, 1990
12. Torres DS, Freyman TM, Yannas IV, Spector M: Tendon cell contraction of collagen-GAG matrices *in vitro*: effect of cross-linking. *Biomaterials* 21: 1607, 2000
13. Kang HW, Tabata Y, Ikada Y: Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 20: 1339, 1999
14. Suh H, Lee JE: Behavior of fibroblasts on a porous hyaluronic acid incorporated collagen matrix. *Yonsei Med J* 43: 193, 2002
15. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, Han C: Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* 24: 4833, 2003
16. Ng KW, Tham W, Lim TC, Werner Hutmacher D: Assimilating cell sheets and hybrid scaffolds for dermal tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 75: 425, 2005
17. Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R: Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J* 7: 1208, 1993