

각막 간질 대체물로 콘드로이틴 설페이트가 결합된 콜라젠 스폰지의 생체 적합성 평가

^{1,2}장 인근 · ¹안재일 · ¹서영권 · ²김재찬 · ³송계용 · † ¹박정극
¹동국대학교 생명화학공학과, ²중앙대학교 부속 용산병원 안과, ³중앙대학교 의과대학 병리학교실
(접수 : 2006. 7. 11., 게재승인 : 2006. 11. 10.)

The Evaluation of Biocompatibility of Collagen/Chondroitin Sulfate Sponge as a Scaffold for Corneal Stromal Layer

In-Keun Jang^{1,2}, Jae-Il Ahn¹, Jae-Chan Kim², Kye-Yong Song³, and Jung-Keug Park^{† 1}

¹Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea,

²Department of Ophthalmology, Chung-Ang University Hospital, Seoul 140-757, Korea,

³Department of Pathology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

(Received : 2006. 7. 11., Accepted : 2006. 11. 10.)

Biocompatibility and tissue regenerating capacity are essential characteristics in the design of collagenous biomaterials for tissue engineering. Attachment of glycosaminoglycans to collagen may add to these characteristics by creating an appropriate micro-environment. In this study, porous type I collagen matrices were crosslinked using dehydrothermal treatment and 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide, in the presence and absence of chondroitin sulfate (CS). The scaffold like discs in 3 mm diameter were inserted into the intralamellar stromal pockets of rabbit cornea. In 8 weeks of follow up, clinical evaluation including corneal neovascularization, opacity and transparency of the graft scaffold was performed, and the inflammatory reaction and migration of corneal fibroblast were evaluated histologically. No inflammation, neovascularization and opacity in any of the implant were observed. CS increased the corneal fibroblast invasion and the transparency. It is concluded that the type I collagen sponge showed a biocompatibility in corneal stromal layer and addition of CS slightly improved the quality of the bioartificial corneal stromal layer. These results could be useful for the development of corneal substitutes.

Key Words : Collagen sponge, corneal stroma, biocompatibility, chondroitin sulfate

서 론

정상각막은 맑고 투명하여 빛을 통과시키고, 굴절시키는 기능을 한다. 이러한 각막은 상피층 (epithelial layer), 보우만층 (Bowman's layer), 간질층 (stromal layer), 데스메막 (Descemet's membrane), 내피층 (endothelial layer)의 5층으로 구성된다(1, 2). 간질층은 각막두께의 85-90%를 차지하고 투명도를 유지하는데 중요한 역할을 담당하고 있다. 간질층은 콜라젠 (collagen)과 프로테오글리칸 (proteoglycan)이

주요 구성성분을 이루고 있고, 1형 콜라젠이 70% 정도 존재한다(3). 각막에 질환이 생기면 투명성이 떨어지고 심한 경우 혼탁이 생긴다. 각막혼탁은 약물이나 수술로 완치되지 않아 시력을 되찾기 위한 유일한 방법은 혼탁이 생긴 각막을 떼어내고 기증자로부터 받은 각막을 이식하는 것이다. 현재 각막의 수요와 공급을 충족시키는 유일한 나라는 미국이고, 대부분의 나라는 각막의 심각한 부족현상을 겪고 있어(4) 이를 대체할 수 있는 인공각막이 필요하다. 현재 폴리머와 같은 합성재료로 만든 인공각막이 있으나 이러한 인공각막은 이식 후 생착이 잘 되지 않고, 공막 괴사 등의 합병증으로 인해 운부 결막 환자와 같은 환자에게 제한적으로 시술되고 있다.

최근 조직공학을 이용하여 인공각막을 제조하려는 연구가 시도되고 있다(4). 조직공학 (Tissue engineering)은 조직의 기능을 유지하고 회복하거나 발전시키는 학문이며 생

† Corresponding Author : Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea,

Tel : + 82-2-2260-3365, Fax : +82-2-2271-3489

E-mail : jkpark@dongguk.edu

물학적 인공지지체를 포함한다(5). 콜라젠은 생체재료의 대표적인 재료로 피부, 연골, 뼈 등 다양한 조직의 지지체로서 사용되고 있으며 생체적합성이 우수한 특성을 가지고 있다(6). 그러나 콜라젠은 생분해 (biodegradation)가 빠르고, 기계적 강도가 약해 사용하는데 제약이 따른다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 가교결합을 사용하는데, 가교결합 방법은 크게 물리적 방법과 화학적 방법으로 나눌 수 있다. 물리적 방법에는 탈수 열처리 (dehydrothermal treatment), 자외선 처리, 광산화 (photooxidation)와 같은 방법이 있고, 화학적 방법에는 글루타르알데하이드 (glutaraldehyde), 카보디이미드 (1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide, EDC) 처리와 같은 방법이 있다(7). 그러나 콜라젠으로 지지체를 만들어 사용하기에는 물리적 처리방법만으로 기계적 강도가 부족하므로 가교결합 시약으로 처리하는 화학적 방법을 동시에 사용하고 있다. 화학적 방법에서 글루타르알데하이드는 생체재료의 가교결합에 가장 널리 사용된다. 글루타르알데하이드를 이용한 가교 방법은 생체재료의 강도는 크게 증가시키지만 세포독성 (cytotoxicity)의 문제가 있는 반면, EDC는 강도는 크게 증가시키지는 못하지만 생체적합성 (biocompatibility)이 우수한 것으로 알려져 있다(8).

글리코사미노글리칸 (Glycosaminoglycans, GAGs)은 세포 외기질 (extracellular matrices)과 세포 표면을 이루는 성분으로 세포부착과 효소, 단백질분해 저해제, 싸이토카인의 조절에 관여한다(9, 10). 각막 간질층의 콜라젠 섬유 사이에 케라탄 설페이트 (keratan sulfate), 콘드로이틴 설페이트 (chondroitin sulfate, CS) 등과 같은 다양한 GAGs가 있다. 체외 세포 배양 실험을 통해 이러한 GAGs가 각막의 수분 함량을 조절하여 각막이 투명하도록 유지하는데 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되어졌으나(11, 12), 지지체를 각막에 이식하여 생체 내에서의 효과 및 병리학적 현상에 대한 연구는 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 콜라젠과 GAG를 이용하여 가교결합 방법에 따른 실제 각막 간질층 내에서의 거동을 확인하고자 하였다. 이를 위하여 탈수 열처리의 물리적 가교결합만으로 제조한 콜라젠 스폰지와 화학적 가교결합시약인 EDC로 가교결합한 콜라젠 스폰지의 토끼 각막 간질 내 이식을 통하여 생분해 정도와 세포독성 정도를 비교하였다. 또한 EDC로 화학적 가교결합한 스폰지와 EDC 화학적 가교결합시 CS가 결합한 스폰지의 생체적합성과 세포에 미치는 영향 또한 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 체중 2-3 Kg이 되는 성숙한 뉴질랜드산 흰색 집토끼 18마리를 암수 구별 없이 사용하였다. 양쪽 각막이 정상임을 확인한 후, 오른쪽 눈의 각막 간질에 콜라젠 스폰지를 이식하였다.

이식 조직의 준비

1형 콜라젠 용액 (Nitta-gelatin Co., 0.3%, Japan)을 초저온

냉동고 (-80℃)에서 12시간 이상 냉동시킨 후 -80℃에서 24시간동안 동결건조 (Freeze dry system, Samwon, SFDSM06, Korea)하였다. 동결건조한 스폰지 형태의 콜라젠 지지체를 탈수 열처리 (dehydrothermal treatment) 방법을 이용하여 일차로 가교결합하였다. 탈수 열처리는 진공 오븐 (Fisher Scientific, Pennsylvania, USA)에서 110℃의 온도로 24시간 동안 처리한다. 24시간동안 탈수 열처리한 스폰지 형태의 콜라젠 지지체를 A군으로 하였다.

탈수 열처리로 일차 가교결합한 콜라젠 스폰지를 50 mM 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES, Sigma, USA) / 40% 에탄올에 30분 동안 방치한 후 50 mM MES / 24 mM EDC (Sigma, USA) / 40% 에탄올에서 4시간동안 처리하였다. EDC로만 가교결합한 것을 B군으로 하였고, EDC 가교결합시 2% CS (Sigma, USA)를 첨가하여 결합한 것을 C군으로 하였다. EDC로 가교결합 처리한 B군과 C군의 스폰지 형태의 콜라젠 지지체는 다음과 같은 세척 및 멸균 과정을 수행하였다. 0.1 M Na₂HPO₄ (pH 9.1, Sigma, USA)용액으로 1시간마다 2회, 1 M NaCl용액으로 2시간마다 2회, 2 M NaCl 용액으로 24시간동안 세척한 다음 70% 에탄올에 멸균한 후 PBS로 최종적으로 3회 세척한 콜라젠 스폰지를 이식에 사용하였다(13). Table 1에 이식한 실험군에 대하여 설명하였다.

Table 1. Process of collagen sponge preparation

Process	A group	B group	C group
Freezing	(-80℃)	(-80℃)	(-80℃)
	12 hrs	12 hrs	12 hrs
Lyophilization	(-80℃)	(-80℃)	(-80℃)
	24 hrs	12 hrs	12 hrs
Dehydrothermal treatment	(110℃)	(-80℃)	(-80℃)
	24 hrs	12 hrs	12 hrs
Crosslink agent		EDC	EDC
Additive			CS

EDC : 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide
CS : chondroitin sulfate

인장강도 측정

제조한 콜라젠 지지체의 인장강도를 측정하였다(14). 가로 5 mm, 세로 10 mm로 자른 뒤 인장강도 측정기기 (Universal Testing Machine, Model No. H5K-T, H. T. E, UK)로 0.1 mm/s의 속도로 잡아 당겨서 breaking load를 측정된 뒤 단면적으로 나누어 인장강도 (Ultimate Tensile Strength, UTS)를 측정하였다.

수술방법

케타민 (Ketamine hydrochloride, 유한양행)과 럽핀 (xylazine hydrochloride, 바이엘코리아)을 1 : 1의 비율로 대퇴부에 근육주사하여 토끼가 해로운 외부 자극에도 반응을 하지 않음을 확인하였다. 눈꺼풀을 벌려주기 위해 소아용 개검기를 삽입한 후 국소마취제 (proparacaine hydrochloride, Alcaine®, Alcon, USA)를 수회 점안하였다. 8 mm 정도 되도록 각막 윤부를 절개한 후 spatula와 Wescott scissor를 사용하여 각막 간질의 1/2 위치에 주머니형태의 공간을 만들었다. 3가지 콜라젠 스폰지를 3 mm 디스크 모

양으로 준비하고, 각막의 간질 주머니에 삽입하여 각막 중앙부에 위치하게 하였다(Fig. 1).

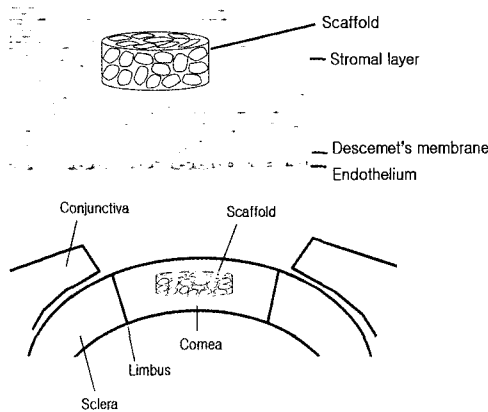


Figure 1. The scaffold like discs in 3 mm diameter were inserted into the intralamellar stromal pocket of rabbit cornea.

안구표면 관찰

이식 거부 반응, 이식 조직의 투명정도, 각막으로의 신생혈관 형성 정도와 혼탁을 확인하기 위해 수술 직후와 수술 후 8주까지 육안 및 세극등 검사를 시행하여 합병증 유무와 그 경과를 관찰하였다. 수술 후 8주까지 각막 상태에 대한 평가를 위해 세극등 현미경 (SM-50F, Takaki, Japan)으로 16배의 배율로 사진 촬영하였다.

조직병리학적 검사

이식된 각막의 조직검사를 시행하기 위해 수술 후 2주, 4주, 8주에 안구를 적출하였다. 각막 윤부 주위 1 mm의 공막을 포함하여 각막을 절제한 후, 이식물이 있는 각막 중심부가 포함되게 각막 조직 절편을 잘라 조직표본을 만들어 헤마톡실린 (hematoxylin)과 에오진 (eosin) 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

전자현미경 검사

제조한 콜라젠 스폰지의 내부를 확인하기 위해 주사전자현미경 사진 (Scanning electron microscopy, SEM, JSM-35CF, JEOL, Japan)을 촬영하였다. 먼저 4% glutaraldehyde와 2% formaldehyde로 고정된 뒤 2% osmium tetroxide로 재고정하고 탈수 후 코팅하여 사진 촬영하였다.

결과 및 고찰

콜라젠 스폰지의 특성

제작된 콜라젠 스폰지를 주사전자현미경사진으로 관찰한 결과 스폰지의 형태는 50 - 100 μm의 지름을 가진 다공성 형태로 층상의 격자구조를 가지고 있고 일정한 공극 (pore size)을 가지고 있었다(Fig. 2). 가교결합에 따른 내부 형태의 차이는 없으나, 이식시 탈수 열처리로만 가교결합한 콜라젠 스폰지 (A군)는 EDC로 가교결합한 스폰지 (B, C군)

보다 강도가 약한 특성을 보였다. 또한 EDC로 가교결합한 콜라젠 스폰지는 이식시 강도가 있어 형태를 잘 유지하여 간질층에 삽입하기가 용이하였다. CS는 강도에 영향을 미치지 않았다(Fig. 3).

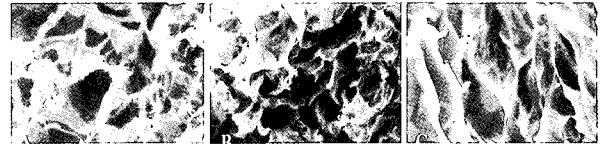


Figure 2. SEM images to show the cross section of the collagen sponge treated with EDC in presence/absence of chondroitin sulfate ((A) Dehydrothermal treatment (B) EDC treatment (C) EDC/chondroitin sulfate treatment).

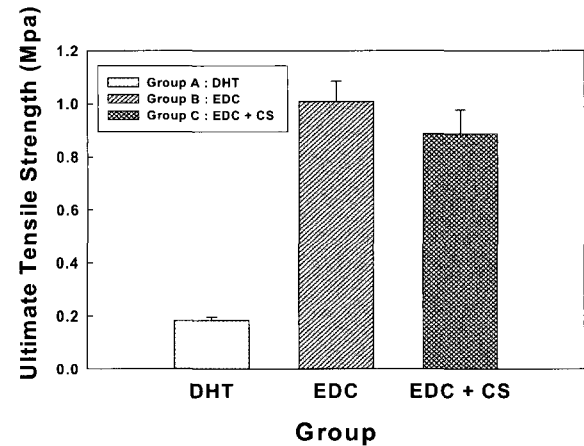


Figure 3. Ultimate tensile strength (UTS) of Collagen sponge. UTS of collagen sponge crosslinked with EDC was stronger than that of collagen sponge crosslinked with dehydrothermal treatment.

임상양상

토끼의 각막 간질부위에 이식 후 8주 동안 염증반응, 면역거부 반응, 각막 혼탁, 신생 혈관의 변화, 이식조직의 투명도 변화를 관찰하였다. 각막은 다른 조직과 달리 혈관이 없고 투명한 조직이기 때문에 외관상 세극등 현미경 관찰로 쉽게 직접 면역거부반응이나 염증반응을 확인할 수 있다. 염증반응이나 면역거부반응은 항상 신생혈관의 생성을 동반하는데 모든 실험군에서 신생혈관 생성이 나타나지 않음을 관찰할 수 있어 염증반응과 면역거부 반응을 보이지 않는다는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 또한 모든 군에서 이식한 부위를 쉽게 관찰할 수 있어 각막 혼탁이 진행되지 않았음을 쉽게 관찰할 수 있었다. 그러나 탈수 열처리한 콜라젠 스폰지를 이식한 A군은 이식 2주 후부터 이식한 위치가 어디인지 알 수 없을 정도로 정상적인 각막 투명도를 나타내었고, EDC로 가교결합한 콜라젠 스폰지는 8주 후에도 이식한 콜라젠 스폰지를 관찰 할 수 있었다. 8주 후에는 CS가 첨가된 C군이 GAGs가 첨가되지 않은 B군보다 더 투명해 진 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

조직 소견

이식 후 2주, 4주, 8주째 콜라젠 스폰지가 이식된 각막을 적출하여 헤마톡실린과 에오진 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다(Fig. 5). 탈수 열처리 가교결합만을

실시한 콜라겐 스폰지를 이식한 A군은 2주 후부터 거의 형태를 알아볼 수 없게 분해되었고, 4주 후에는 흔적만 남아 있었다. 반면 EDC로 가교결합한 콜라겐 스폰지를 이식한 B군과 C군은 8주 후까지 조직이 분해되지 않았고 콜라겐 스폰지 자체의 다공성도 일정하게 유지하고 있었다. 모든 군에서 이식조직 주변부와 내부에 염증세포의 침윤이 관찰되지 않았고, 각막 간질과 이식된 조직이 괴리없이 잘 융화되었다. 이러한 결과는 임상양상에서처럼 염증이거나 각막혼탁이 보이지 않는 결과와 일치한다.

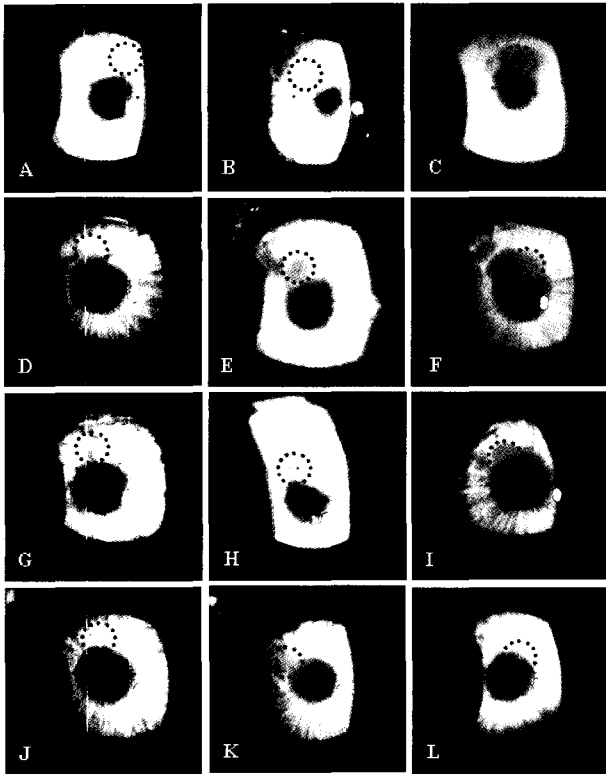


Figure 4. Photographs of inserted collagen sponge in cornea at postoperative 1 day (A, B, C), 2 weeks (D, E, F), 4 weeks (G, H, I) and 8 weeks (J, K, L).

A, D, G, J: dehydrothermal treatment
 B, E, H, K: EDC treatment,
 C, F, I, L: EDC/chondroitin sulfate treatment

2주 후 A군에서 이식된 콜라겐 스폰지를 확인하기가 쉽지 않았는데 이것은 이식물이 거의 분해되었기 때문이다. 2주 후부터 B군과 C군의 이식된 조직 주변에 각막 섬유모세포가 많이 관찰되었고, 4주 후에는 콜라겐 스폰지 가장 자리에까지 각막 섬유모세포가 이동함을 관찰할 수 있었다. 특히 8주 후 C군이 B군보다 각막 섬유모세포가 콜라겐 스폰지 내로 더 많이 이동하였음을 관찰할 수 있었다.

고찰

본 연구에서는 1형 콜라겐을 이용하여 스폰지 형태의 지지체를 만들고 탈수 열처리와 물리적 가교결합과 EDC를 이용한 화학적 가교결합 후 토끼 각막 간질에 이식하여 생체적합성을 확인하고자 하였다. 또한 GAGs 중 하나인 CS를 포함한 콜라겐 스폰지가 각막 간질내에서 어떤

영향을 미치는지를 알아보려고 하였다.

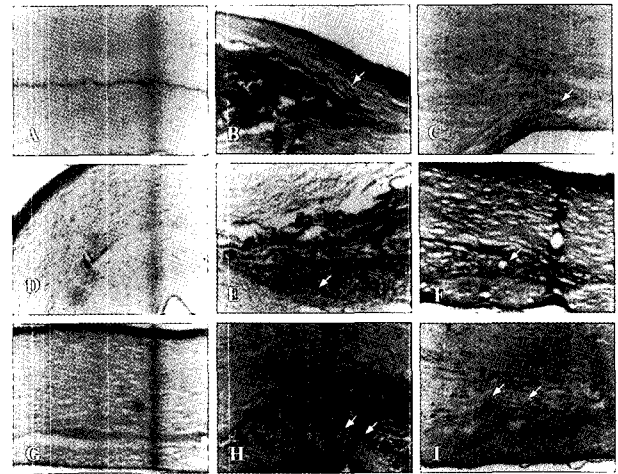


Figure 5. Histological cross-sectional views of inserted collagen sponge in cornea at postoperative 2 weeks (A, B, C), 4 weeks (D, E, F) and 8 weeks (G, H, I).

A, D, G: dehydrothermal treatment
 B, E, H: EDC treatment
 C, F, I: EDC/chondroitin sulfate treatment
 Arrow marks a invasive corneal fibroblast

지지체의 3차원적 다공성 구조는 세포의 유입과 증식에 좋은 환경을 제공할 수 있어야 한다. 다공성 구조를 더 견고히 하는 가교결합은 생체 내에서 지지체의 유지에 있어 매우 중요한 사항이라 할 수 있다. 현재 가교결합은 물리적 방법과 화학적 방법을 병행하는 경우가 많다. 화학적 가교결합제로는 글루타르알데하이드가 가장 좋은 물성을 가지게 하지만 EDC가 글루타르알데하이드보다 세포독성이 적고, 생체적합성이 좋은 것으로 알려져 있다(8). 현재 사용되는 화학적 가교결합제는 생체적합성이 완전하다고는 볼 수 없다. 따라서 본 연구에서 물리적 가교결합만으로도 지지체로서의 역할을 수행할 수 있는지를 시험하였으나 탈수 열처리로만 가교결합한 콜라겐 스폰지는 이식 2주 후 지지체로서 역할을 하지 못하였다. 그러나 EDC로 가교결합한 콜라겐 스폰지는 8주 후까지 원형대로 유지하였다.

지지체를 이식할 때 가장 중요한 요소는 지지체의 생체적합성이다. 이러한 생체적합성은 염증반응과 조직의 재생으로 판단할 수 있다. 가교결합 방식에 상관없이 이식한 모든 콜라겐 스폰지는 조직병리학적 관찰에서 염증반응이 전혀 나타나지 않았고, 임상적 양상에서도 염증반응이 나타나는 각막혼탁과 신생혈관 유입이 전혀 발생하지 않았다. 조직의 재생은 이식한 조직 내로의 세포의 이동으로 판단할 수 있는데 탈수 열처리한 콜라겐 스폰지는 이식 후 흡수되어 세포의 유입을 관찰할 수 없었다. 그러나 EDC로 가교결합한 콜라겐 스폰지는 이식 2주 후 각막 섬유모세포가 콜라겐 스폰지 주위에 많이 모이기 시작하여 이식 4주 후에는 콜라겐 스폰지 내로 이동해 있는 모습을 확인할 수 있었다. 이식 8주 후에는 많은 세포들이 이식한 콜라겐 스폰지 내로 유입된 것을 관찰할 수 있었다.

세포외기질에서 가장 많은 부분을 차지하는 콜라겐은 인장강도를 제공하는 반면 프로테오글리칸은 압축력을 견디는 힘을 제공하고 공간을 메우는 상보적인 기능을 가진다. 프로테오글리칸은 음전하를 띤 다당류 복합체인 GAGs에 연결되어 있고 크기, 모양, 화학조성이 매우 다양하다. GAGs은 세포신호를 담당하는 성장인자와 다른 단백질에 결합할 수 있고, 세포의 이동을 방해하거나 촉진할 수 있다(9, 10). GAGs 중에서 CS를 첨가하여 콜라겐 스폰지를 제조하여 이식한 군에서 좀 더 많은 세포가 이동해 있는 것을 확인할 수 있었다. Andersen 그룹은 *in vitro*에서 CS가 각막 섬유모세포의 이동을 증가시킨다는 결과를 보고하였고(12) Orwin 그룹은 CS가 포함된 콜라겐 스폰지에 각막 섬유모세포를 배양하고 난 후에 투명도가 증가한다(15)는 결과를 보고하였다. 이러한 기존 *in vitro* 보고와 본 연구의 *in vivo* 연구결과는 일치하여 CS가 첨가된 콜라겐 스폰지를 이식한 군에서 각막의 투명도와 세포의 이동이 증가하는 것을 *in vivo* 내에서도 확인할 수 있었다. 또한 이러한 결과는 세포의 이동과 각막 조직의 투명도가 밀접한 관계가 있음을 보여주는 것이다.

본 연구를 통해서 EDC로 가교결합한 1형 콜라겐 스폰지는 각막 간질부분에서 면역기부반응없이 생체 적합성을 가진 지지체인 것을 확인하였다. 또한 GAGs인 CS와 함께 만들어진 콜라겐 스폰지는 투명성을 증가시키고, 세포의 유입도 촉진한다는 사실을 생체내 실험을 통해 확인하였다. 이러한 GAGs가 첨가된 1형 콜라겐 스폰지는 조직공학적 생인공각막의 지지체로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

조직공학에서 생체재료의 생체적합성과 조직재생능력은 생체재료가 생체에 적합한지를 판단하는 가장 중요한 요소이다. 콜라겐은 인체조직을 이루는 주된 단백질이고, GAGs은 조직의 미세환경을 결정짓는 주요한 요소로 알려져 있다. 본 연구에서는 1형 콜라겐 스폰지를 탈수 열처리(A군)하고 EDC로 가교결합한 것(B군)과 CS를 첨가하여 EDC로 가교결합한 군(C군)의 스폰지 형태의 콜라겐 지지체를 제조하였다. 제작된 콜라겐 스폰지를 3 mm의 디스크 형태로 토끼 각막의 실질부위에 주머니형태로 이식하였다. 8주 동안 각막의 신생혈관 생성, 혼탁, 지지체의 투명도 정도를 확인하고, 2주, 4주, 8주 후에 적출하여 염증과 각막 섬유모세포의 이동을 확인하였다. 모든 군에서 염증, 신생혈관 생성, 혼탁은 일어나지 않았다. 그러나 CS가 첨가된 콜라겐 스폰지에 섬유모세포의 이동이 많았고, 이식물의 투명도가 증가하였다. 1형 콜라겐 스폰지는 각막 간질에의 생체적합성이 뛰어나 각막 간질로의 대체 가능성이 크고, CS가 첨가된 1형 콜라겐 스폰지는 조직공학적 생인공각막의 재구성에 큰 도움을 줄 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 보건복지부에서 지원한 보건의료기술연구개발사업의 제품화기술개발사업(과제번호 01-PJ1-PG4-01PT02-0002)에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Minami, Y., H. Sugihara, and S. Oono (1993), Reconstruction of corneal in three-dimensional collagen gel matrix culture, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**, 2316-2324.
2. Daniels, J. T., J. K. G. Dart, S. J. Tuft, and P. T. Khaw (2001), Corneal stem cells in review, *Wound Rep. Reg.* **9**, 483-494.
3. Trinkaus-Randall, V. (2000), Principle of Tissue Engineering, 2nd ed., p471-91. Academic Press, San Diego, CA.
4. Griffith, M., M. Hakim, S. Shimmura, M. A. Watsky, F. Li, D. Carlsson, C. J. Doillon, M. Nakamura, E. Suuronen, N. Shinozaki, K. Nakata, and H. Sheardown (2002), *Artificial human cornea, Cornea*, **21**(suppl. 2), S54-S61.
5. Langer, R. and J. P. Vacanti (1993), Tissue engineering, *Science* **260**, 920-926.
6. Pachence, J. M. (1996), Collagen-based devices for soft tissue repair, *J. Biomed. Mater. Res.* **33**, 35-40.
7. Lie, M., G. Changyou, M. Zhengwei, Z. Jie, and S. Jiacong (2004), Enhanced biological stability of collagen porous scaffold by using amino acids as novel cross-linking bridges, *Biomaterials* **25**, 2997-3004.
8. Human, H., D. Bezuidenhout, M. Torrianni, M. Hendriks, and P. Zilla (2002), Optimization of diamine bridges in glutaraldehyde treated bioprosthetic aortic wall tissue, *Biomaterials* **23**, 2099-2103.
9. Jackson, R. I., S. J. Busch, and A. D. Cardin (1991), Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes, *Physiol. Rev.* **71**, 481-539.
10. Witt, D. P. and A. D. Lander (1994), Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations, *Curr. Biol.* **4**, 394-400.
11. Weber, I. T., R. W. Harrison, and R. V. Iozzo (1996), Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis, *J. Biol. Chem.* **271**, 31767-31770.
12. Andresen, L., L. Thomas, H. Henrik, J. Kaj, and E. Niels (2000), The influence of corneal stromal matrix proteins on the migration of human corneal fibroblasts, *Exp. Eye. Res.* **71**, 33-43.
13. Pieper, J. S., A. Oosterhof, P. J. Dijkstra, J. H. Veerkamp, and T. H. van Kuppevelt (1999), Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate, *Biomaterials* **20**, 847-858.
14. Chen, C. S., I. V. Yannas, and M. Spector (1995), Pore strain behavior of collagen glycosaminoglycan analogues of extracellular matrix, *Biomaterials* **16**, 777-783.
15. Orwin, E. J., M. L. Borene, and A. Hubel (2003), Biomechanical and optical characteristics of a corneal stromal equivalent, *J. Biomech. Eng.* **125**, 439-444.