

3차원 다공성 콜라겐지지체의 제조 및 특성 분석

김진태^{1,2} · 임수민² · 김병수² · 이득용³ · 최재하¹

¹충북대학교 신소재공학과, ²(주)네오바이오텍 R&D센터, ³대림대학교 의공융합과

Fabrication and Characterization of 3-D Porous Collagen Scaffold

Jin-Tae Kim^{1,2}, Sumin, Lim², Byoung Soo Kim², Deuk Yong Lee³ and Jae Ha Choi¹

¹Department of Advanced Material Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

²R&D Center, Neobiotech Co. Ltd., Seoul 152-789, Korea

³Department of Biomedical Engineering, Daelim University, Anyang 431-715, Korea

(Manuscript received 5 September 2014; revised 16 October 2014; accepted 21 October 2014)

Abstract: Collagen scaffolds were synthesized by cross linking into a solution mixture of 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochlorid(EDC) in ethanol, followed by pressing, cleaning and lyophilization process after the type I atelo-collagen solutions in D.I water(pH3). The experimental conditions are collagen concentration of 1.0 wt%, 3.0 wt%, 5.0 wt% and differential concentration of cross-linker. Then, parametric studies were performed by varying the parameters to investigate the morphology, the porosity, the swelling ratio and the thickness and genotoxicity of the scaffolds. The scaffolds thickness pattern was regular to concentration of the degree of cross-linker and collagen. It was observed that the swelling ratio, the degree of crosslink, and the pore size(thickness of scaffold) can be controlled by adjusting the collagen, crosslinker. Among the parameters investigated, the smallest thickness can be achieved by collagen, crosslinker concentrate condition. The collagen scaffold is induced no genotoxicity. The lowest swelling ratio, as an indication of the highest degree of crosslink, can be obtained by adding crosslink agent.

Key words : Collagen, 3-D porous, Scaffold, Genotoxicity

1. 서 론

손상된 조직을 대체, 또는 치료하기 위하여 현재 사용되고 있는 재료들은 인간 기증자에 의한 동종재료, 환자 자신의 자가재료, 생물로부터 유래된 생체재료, 인공적으로 제조된 합성재료 등이 있다. 동종재료이식은 제한적인 기증자의 수로 인하여 공급이 매우 부족하고, 자가재료 이식은 공여부에 대한 2차 치료가 동반되며 채취되는 조직의 양이 한계

가 있다. 또한 동물로부터 유래된 이종재료는 질병의 감염 우려와 면역학적 문제가 남게 된다. 따라서 상대적으로 공급이 원활한 인공재료의 개발이 선행되었으며 지금 까지 사용되어온 인공재료들은 손상된 조직을 구조적으로 대체하거나, 일부기능을 대체하는 수준으로서 생물학적 안전성과 조직학적 생체적합성에 대한 문제가 야기되므로 해결되어야 할 과제가 잔류한다. 이러한 문제 해결의 방법에 있어서 최근 많은 연구자들이 인공재료에 대하여 생체조직을 대체하거나 재생을 유도하는 기능을 부여하는 등 조직공학적 접근을 시도하고 있으며 면역반응이 없고, 조직 재생 및 생물학적 안전성이 우수한 생분해성 천연재료의 접근도 진행되고 있다[1-8].

대표적인 생분해성 천연재료로는 콜라겐[9], 히알루론산[10], 키토산[11] 등이 있으며 조직공학적 지지체로 이용하기 위해서는 신생조직이 생착, 성장할 수 있도록 공간을 유지하는 강도와 지지체에 침투된 재생 조직들이 영양소를 공급받

Corresponding Author : Jae Ha Choi
Dept. of Advanced Materials Engineering, Chungbuk National University, 52, Naesudong-ro, Seowon-gu, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea
TEL:+82-43-261-2414 / FAX: +82-43-2717-3222
E-mail: jachoi@chungbuk.ac.kr

이 논문은 2014학년도 충북대학교 연구년제 지원에 의하여 연구되었음(This work was conducted during the research year of Chungbuk National University in 2014).

으며 성장하도록 기공들이 상호 연결된 다공망의 형성, 조직의 재생과 더불어 서서히 분해되어 최종에는 체내에 남아 있지 않도록 하는 생분해성의 제어가 필요하다.

콜라겐은 결합조직의 주요구성성분이며 다양한 종류의 동물세포에 대한 천연기질로서 동물조직 내의 다른 단백질에 대하여 비교적 많은 양을 함유하고 있으며 인체를 구성하는 피부, 연골 등에 다량 존재하는 주요 단백질로서 체내 단백질의 약 30%가 콜라겐 구조를 가지고 있다. 기본적인 구조는 tropocollagen으로서 triple chain에 의해 교차결합되어 있으며 생화학적으로는 세포외부의 간질성분에 존재하는 접착성 물질로 세포 간 접착을 유도하여 연결해주므로 조직공학적 응용재료로 광범위하게 사용되고 있다.

본 연구에서는 치조골 재생 시 사용되는 치과용 차폐막 개발을 목적으로, 3차원적 다공망 형성과 막 형태의 가공을 시도하기 위해 type I의 atelo-collagen sponge를 용해한 후 동결건조법과 화학적 가교법을 이용하여 콜라겐 지지체를 제조하였다. 예비 실험 단계로서 적절한 팽윤성을 부여하기 위해 각각 다른 농도의 콜라겐과 가교제를 사용하였으며, 제조된 콜라겐 지지체는 생물학적 안전성 평가의 일부로서 유전독성평가를 시행하였으며 약물의 담지 및 원할한 혈행특성을 파악하기 위하여 팽윤실험과, 형태관찰에 대한 물리적 특성 평가를 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. Materials and basic experimental method

돼지 피부에서 추출한 type I Atelo-collagen 스펀지 (Bioland, Korea)를 pH3으로 조절된 3차 증류수에 각각 1.0 wt%, 3.0 wt%, 5.0 wt%의 농도로 실온에서 용해한 후 collagen수용액을 미리 준비된 성형 몰드에 분주한 후 -40°C의 저온 냉동고(BF-160DFC, Biofree Co., Ltd., Korea)에서 2시간 예비 냉동을 시행하였다. 냉동된 collagen수용액을 동결건조기(FD-8508, Ilshinbiobase, Co., Ltd., Korea)에서 -86°C, 5 mTorr 조건으로 24시간 동결건조를 시행한 후 건조된 다공성 collagen 지지체를 5ton으로 10분간 일축가압(#3912, Carver INC., USA)하여 지지체를 성형하였다. 가교제로 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochlorid(EDC) (Sigma aldrich, USA)를 ethanol (99.5%, Daejung, Korea)에 0.005 mol%, 0.03 mol%의 농도로 분류하여 제조 하였으며 collagen 수용액의 농도에 따라 실험군(표 1)을 나누어 각각 24시간 침지하여 가교를 시행하고 6시간씩 4회를 순수에 세척하였다. 세척이 완료된 collagen 지지체는 다시 예비 냉동 후 동결건조를 시행하여 최종적으로 가압된 디스크 형태의 collagen 지지체를 제작하였다.

표 1. 실험조건.

Table 1. Experimental design.

concentration of collagen [wt%]	concentration of EDC [mol%]	
1.0		
3.0	0.005	0.03
5.0		

제작된 collagen 지지체는 SEM(S-3000H, Hitachi, Japan)으로 표면 및 단면의 형태, 미세다공층을 관찰하였으며 팽윤실험을 하기위하여 건조된 collagen 지지체의 중량을 측정하고 PBS(NaH_2PO_4)에 24시간 침지시킨 후 중량을 측정하여 팽윤도를 구하였다. 팽윤도는 다음 식으로 계산 하였다.

$$\text{Swelling \%} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100[\%]$$

Ws : 팽윤된 collagen 지지체의 무게

Wd : 건조된 collagen 지지체의 무게

2. Biocompatibility test(Genotoxicity test)

본 연구에서 제작된 collagen 지지체의 안전성 여부를 확인하기 위하여 유전독성시험 중 미생물 복귀돌연변이 시험을 시행하였다. 대한민국 식약처 의료기기의 용출조건[12]을 기준으로 극성용매와 비극성 용매로 용출하기 위해 음성대조 물질로 멸균생리식염수(Dahan Pharm Co. Ltd., Korea)와 dimethyl sulfoxide(DMSO) (Wako Pure Chemical industries, Ltd., Japan)를 사용하였으며 양성대조물질로는 OECD 가이드라인[13-14]에 명기되어 있는 물질인 sodium azide(S9)와 9-aminoacridine(9-AA), 2-aminoanthracene (2-AA) (Sigma Aldrich, USA), 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide(AF-2) (Wako Pure Chemical industries, Ltd., Japan)를 사용하였다.

Collagen 지지체 4 g당 20 mL의 비율로 멸균생리식염수와 DMSO를 각각 넣고 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 72시간 용출한 후 상층액을 시험액으로, collagen 지지체를 넣지 않은 멸균생리식염수와 DMSO를 사용하여 동일한 방법으로 처리한 용액을 음성 대조용액으로 사용하였고 sodium azide는 증류수에, 다른 3개의 양성대조군 물질은 DMSO에 용해하여 양성대조 용액으로 사용하였다. 시험액의 처리는 pre-incubation 방법[15]으로 하였다. 견열 멸균한 tube에 시험액 0.1 mL, S9mix, 0.5 mL, 균배양액 0.1 mL를 넣고 37°C 에서 20분간 120rpm으로 진탕처리 후 top agar를 2 mL씩 분주한 다음 혼합하고 즉시 minimal glucose agar plate에 부어 전체적으로 퍼지게 하여 응고시켰다. 음성대조군은 시험물질 용액 대신 용매 0.1 mL를, 양성대조군은 양성대조물질용액을 같은 방법으로 실시하였다. 시험액 및 S9 mix의 무균성을 확인하기 위해 시험액 0.1 mL와 S9mix 0.5

mL를 각각 2 mL의 top agar에 혼합하여 플레이트를 제작하였다. 제작 후 top agar가 응고되면 플레이트를 뒤집어 37°C에서 72시간 배양 후 복귀돌연변이 집락을 계수하였으며 처리군 당 3개의 플레이트를 사용하였다. 시험결과는 실험군당 3개의 플레이트로부터 얻은 집락 수의 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

II. 결 과

1. Morphology and swelling ratio of collagen scaffold

Type1 Atelo-collagen을 각각 1.0 wt%, 3.0 wt%, 5.0 wt%의 농도로 실온에서 용해한 후 동결건조와 성형, 가교, 동결건조의 공정을 거쳐 직경 20 mm, 두께 200~300 μm의 collagen 지지체를 제작하였다(그림 1). 지지체의 단면에 대한 SEM 관찰결과를 그림 2에 나타내었다. 이들 결과로 collagen의 농도와 가교제의 농도조건에 따라 동일한 방법으로 제작한 지지체의 두께가 미세한 차이점이 발생하는 것을 볼 수 있다. Collagen의 농도가 높을수록 지지체의 두께가 증가했다. 이는 동일한 가압조건에서 collagen의 농도가 증가함에 따라 탄성이 작용되며, 또한 기공층이 감소하고 기공층간을 이루는 콜라겐층이 두께가 증가하여 지지체 전체적으로는 collagen의 밀도가 증가됨이 확인된다. 또한 가교제의 농도가 높을수록 미세하게 존재하는 단면층간의 기공층의 크기가 감소되며 층간을 이루는 collagen층 역시



그림 1. Collagen 지지체.
Fig. 1. Collagen scaffold.

조밀해지는 것을 고려할 때 가교제에 의한 밀도증가를 유추할 수 있다.

이들 결과는 팽윤도 에서도 일치하는 결과로 나타나며 그림 3에서 나타내었다. 팽윤도 에서는 3.0 wt%와 5.0 wt%의 collagen 농도에서 감소차이가 비교적 크지 않지만 전체적인 감소추이를 나타내고 가교제의 농도가 낮을수록 높게 측정됨을 알 수 있다. 이는 각각의 재료의 투여에 있어서 기공층의 감소 및 기공층간을 이루는 collagen 층의 두께가

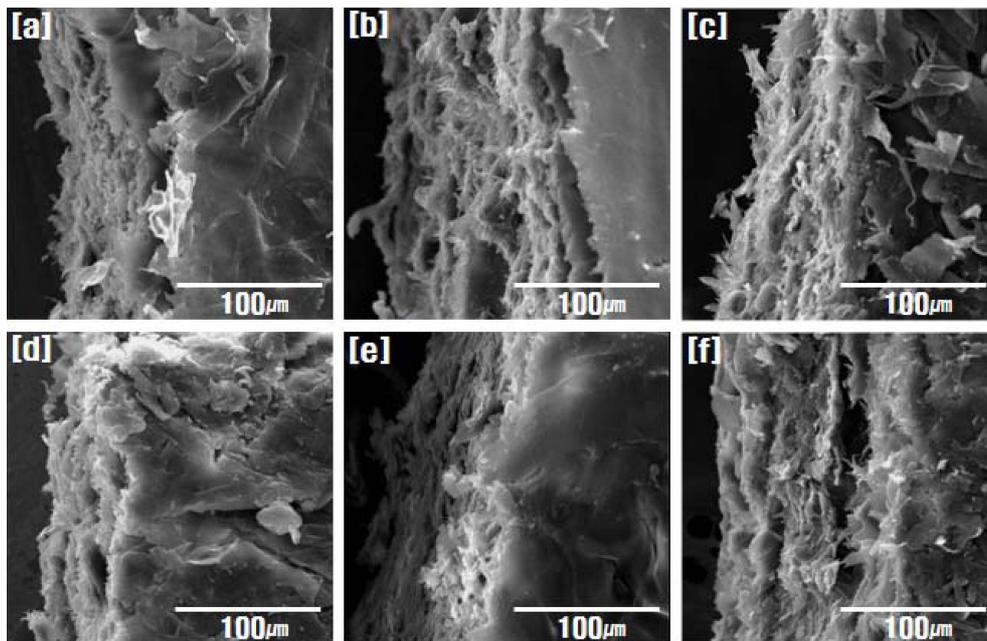


그림 2. SEM관찰을 통한 collagen 지지체의 단면. 각각 collagen 농도와 가교제 농도에 대한 (a) 1.0 wt%, 0.03 mol%, (b) 3.0 wt%, 0.03 mol%, (c) 5.0 wt%, 0.03 mol%, (d) 1.0 wt%, 0.005 mol%, (e) 3.0 wt%, 0.005 mol%, (f) 5.0 wt%, 0.005 mol%.
Fig. 2. SEM image of collagen scaffold (cross section), (a) 1.0 wt%, 0.03 mol%, (b) 3.0 wt%, 0.03 mol%, (c) 5.0 wt%, 0.03 mol%, (d) 1.0 wt%, 0.005 mol%, (e) 3.0 wt%, 0.005 mol%, (f) 5.0 wt%, 0.005 mol% each concentration of collagen and cross linker.

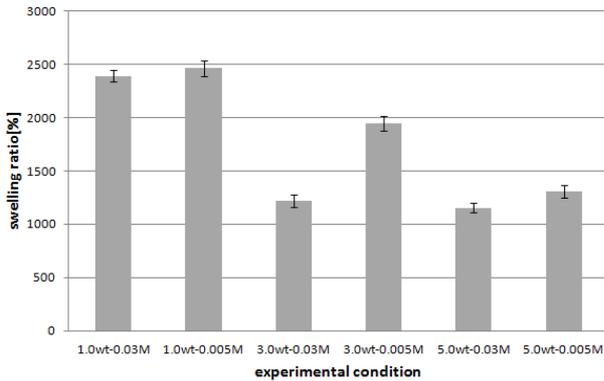


그림 3. Collagen 지지체의 팽윤특성 결과.
Fig. 3. Swelling ratio[%] of collagen scaffold by different collagen and cross linker concentration.

증가함에 따라 함수율이 감소하기 때문에 사료된다.

일부의 적용에서는 collagen 및 가교제의 농도 증가에 의한 밀도상승에서 오는 지지체의 두께와 팽윤도의 결과에서 보듯 함수율이 늘어남에 따라 지지체가 부풀어 가압당시의 두께를 유지하지는 못한다는 단점이 있다. 이 경우 dehydro-thermal treatment(DHT)에 의하여 기공이 형성되지 않으며 매우 높은 밀도로 형성된 치과용 차폐막[16]에서와 같은 우수한 강도에 의한 연조직-경조직간의 차폐역할 수행은 곤란하다.

그러나 교차결합 되지 않은 collagen 지지체의 경우 섬유 아세포와의 친화성이 우수하며 본 연구에서와 같이 지지체로서의 역할을 우선한다면 3-D 구조의 기공 세포, 또는 성장인자를 담지[17-18]하는 등의 조직공학적 담체로서의 지지체에서는 오히려 재생효과가 우수하므로 치과용 차폐막으로서의 적용을 위해서는 높은 밀도의 차폐막 보다는 지지체 자체의 강도를 개선하고 기능 보안을 위해 기능별 재료에 의한 다층구조의 지지체[19] 형성 등의 방법이 고려되어야 할 것으로 보인다.

3. Genotoxicity test

본 연구에서 제작된 collagen 지지체는 이식 후 수개월에 걸쳐 체내로 흡수 및 생분해되는 고분자 물질로서 생물학적 안전성 평가를 위해 차기 세대에 영향을 미치는 장기적인 안전성 확보 여부를 확인 할 수 있는 방법 중 하나인 유전 독성평가를 시행하였다.

시험 결과 용출한 시험액 및 S9mix에 대한 무균시험결과 균의 오염은 관찰되지 않았으며 시험액 처리 시 특이사항은 발견되지 않았다. 본 평가는 극성용매(멸균생리식염수), 비극성용매(DMSO)로 용출한 시험액과 각각의 용매를 이용한 음성대조군 및 양성대조군과 함께 대사활성화법을 적용(S9+) 및 미작용(S9-)으로 시험을 실시하여 대사활성화법 적

표 2. 복귀돌연변이 실험결과.

Table 2. Result of bacterial reverse mutation assay (Group summary).

Tester strain	collagen scaffold	Dose	Colonies/plate(Mean ± S.D.)[Factor]	
			without S9 mix	with S9 mix
TA98	Test solution	SN	27 ± 8	31 ± 2
		DN	21 ± 2	35 ± 4
		SE	23 ± 4 [0.9]	34 ± 4 [1.1]
		DE	25 ± 8 [1.2]	34 ± 7 [1.0]
TA100	Test solution	SN	91 ± 10	95 ± 8
		DN	93 ± 14	106 ± 5
		SE	93 ± 10 [1.0]	108 ± 10 [1.1]
		DE	82 ± 4 [0.9]	100 ± 9 [0.9]
TA1535	Test solution	SN	17 ± 6	14 ± 4
		DN	14 ± 3	14 ± 4
		SE	12 ± 5 [0.7]	15 ± 6 [1.1]
		DE	14 ± 3 [1.0]	12 ± 2 [0.9]
TA1537	Test solution	SN	33 ± 9	36 ± 9
		DN	29 ± 3	38 ± 3
		SE	34 ± 4 [1.0]	37 ± 6 [1.0]
		DE	30 ± 4 [1.0]	34 ± 7 [0.9]
WP2uvrA	Test solution	SN	103 ± 12	121 ± 17
		DN	106 ± 18	110 ± 18
		SE	105 ± 16 [1.0]	121 ± 22 [1.0]
		DE	115 ± 8 [1.1]	121 ± 8 [1.1]
Positive controls				
TA98	AF-2	0.10	438 ± 2 [18.3]	
TA100	AF-2	0.01	344 ± 5 [3.7]	
TA1535	NaN ₃	0.50	273 ± 14 [17.1]	
TA1537	9-AA	80.00	733 ± 10 [23.6]	
WP2uvrA	AF-2	0.01	340 ± 16 [3.2]	
TA98	2-AA	0.50		158 ± 10 [4.8]
TA100	2-AA	1.00		432 ± 8 [4.3]
TA1535	2-AA	2.00		173 ± 7 [12.4]
TA1537	2-AA	2.00		194 ± 9 [5.2]
WP2uvrA	2-AA	10.00		305 ± 8 [2.6]

Note
SN: saline negative, DN: DMSO negative, SE: saline extract, DE: DMSO extract
Factor: No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate
NaN₃: sodium azide

용의 유무와 관계없이 시험에 사용된 균주인 TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA에 시험액을 처리한 모든 균에서 복귀돌연변이 콜로니 수는 음성대조군에 비해 증가양상을 나타내지 않았고, 모든 양성대조군에서는 콜로니 수가 음성대조군에 비해 현저한 증가를 나타내었다(표 2).

이 결과를 보았을때 본 연구에서 제조된 collagen 지지체의 유전독성에 대하여는 음성인 것으로 나타났다.

IV. 결 론

동일한 양의 collagen 수용액과 방법으로 제조한 지지체

는 collagen의 함량과 가교제의 농도에 따라 두께의 차이가 수십 μm 였으나 증가 또는 감소의 추이를 나타냈으며 팽윤도는 유의성 있는 차이로 비례적인 결과가 나타났다. 생분해성 천연고분자의 3차원 다공망 지지체 적용에 있어 약물 담지, 지지체의 체적과 강도, 생분해도 등은 본 연구에서와 같이 주성분의 함량과, 가교제의 농도 이외에도 가교의 방법[20-21], 주성분의 합성[22] 등 많은 방법이 존재한다. 그러나 가장 기본적인 조건 적용에 대한 기초가 마련된다면 더욱 용이한 방법이 제시될 수 있으리라 사료된다.

본 연구에서는 주성분인 콜라겐의 함량과 가교제의 투여량에 대한 기본적인 조건의 조절에 의해 지지체의 두께, 기공이 한 개의 지지체 내에서 층간 이어지는 복합 3차원 망으로 구성될 수 있는 구조, 주성분의 층간밀도, 지지체의 팽윤성을 조절 할 수 있었다. 또한 이러한 방법에 의해 제조된 지지체에 대하여 체내 이식 후 수개월 또는 십 수개월 간 잔류하며 서서히 생분해 되어 체내에 흡수되는 점을 고려하여 가장 장기적인 독성발현을 예측할 수 있는 세대 간 독성발현 가능성 및 미생물에 있어서의 돌연변이 유발성 여부를 파악하기 위하여 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA98, TA100, TA1535, TA1537의 4개 균주와 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2uvrA 균주를 이용하여 복귀돌연변이 시험을 실시하였다. 평가결과 사용된 모든 균주에서 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 나타났으므로 장기적인 안전성을 확보한 것으로 사료된다. 결론적으로 본 연구에서 적용된 실험조건으로 안전성이 확보된 3차원 다공망을 가진 생분해성 천연고분자 지지체는 이후 진행될 후속연구에 대한 콜라겐의 함량과 가교제 투여량의 기초가 될 수 있을 것으로 보이며 속/서방형 약물 전달체, 조직공학용 지지체, 유착방지체에 응용할 수 있을 것이다. 또한 추후에 다양한 조건의 변수 적용과 이식을 통한 장기독성 평가 등의 광범위한 연구가 필요할 것이다.

Reference

- [1] Gary D. Monheit, Kyle M. Coleman, "Hyaluronic acid fillers", *Dermatologic Therapy*, vol. 19, pp. 141-150, 2006.
- [2] JT Kim, DY Lee, TH Kim YS Song, NI Cho, "Biocompatibility of hyaluronic acid hydrogels prepared by porous hyaluronic acid microbeads", *Met. Mater. Int.*, vol. 20, no. 3, pp. 555-563, 2014.
- [3] E. Dawson, G. Mapili, K. Erickson, S. Taqvi, K. Roy, "Biomaterials for stem cell differentiation", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, no. 2, pp. 215-228, 2008.
- [4] John C. Middleton, Arthur J. Tipton, "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices", *Biomaterials*, vol. 21, pp. 2335-2346, 2000.
- [5] Dietmar W. Hutmacher, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage", *Biomaterials*, vol. 21, pp. 2529-2543, 2000.
- [6] Anthony D. Metcalfe, Mark W. J. Ferguson, "Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair", *Biomaterials*, vol. 28, pp. 5100-5113, 2007.
- [7] Currie L.J, Sharpe J.R, Martin R., "The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review", *Plast Reconstr. Surg.*, no. 108, pp. 1713-1726, 2001.
- [8] Murphy CM. Haugh MG, O'Brien FJ, "The effect of mean pore size on cell attachment proliferation and migration in collagen glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering", *Biomaterials*, vol. 31, pp. 461-466, 2010.
- [9] Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Akio Kishida, "Preparation of a collagen/polymer hybrid gel designed for tissue membranes. part I: Controlling the polymer-collagen cross-linking process using an ethanol/water co-solvent", *Acta Biomaterialia*, vol. 6, pp. 403-408, 2010.
- [10] JT Kim, DY Lee, JW Jang, TH Kim, YW Jang, "Characterization of cross linked hyaluronic acid microbeads by divinyl sulfone", *J. of Biomedical Engineering Research*, vol. 34, pp. 117-122, 2013.
- [11] Marguerite Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications", *Prog. Polym. Sci.* vol. 31, pp. 603-632, 2006.
- [12] Notice by KFDA 2011-58, "Common standard to biological safety of medical devices", 2011.
- [13] ISO 10993-3, "Biological evaluation of medical devices-Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity", 2003.
- [14] ISO 10993-12, "Biological evaluation of medical devices-Part 12: Sample preparation and reference materials", 2007.
- [15] OECD, "OECD Guidelines for the testing of chemicals. TG. N. 471 Bacterial reverse mutation test", 1997.
- [16] Kang-Mi Pang, Han-Wool Choung, Sung-Po Kim, et. al., "Absorbable guided bone regeneration membrane fabricated from dehydrothermal treated porcine collagen", *J. of KAM-PRS*, vol. 33, no. 2, pp. 112-119, 2011.
- [17] Toshia Fujisato, Toshinobu Sajiki, Qian Liu, Yoshito Ikada, "Effect of basic fibroblast growth factor on cartilage regeneration in chondrocyte-seeded collagen scaffold", *Biomaterials*, vol. 17, no. 2, pp. 156-162, 1996.
- [18] M. Geiger, R.H. Li, W. Friess, "Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 55, pp. 1613-1629, 2003.
- [19] Susan Liao, Wei Wang, Motohiro Uo, et. al., "A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration", *Biomaterials*, vol. 26, pp. 7564-7571, 2005.
- [20] JT Kim, DY Lee YS Oh, et al., "Swelling properties for cross-linking degree of hyaluronic acid hydrogels", *Biomaterials Research*, vol. 17, no. 1, pp. 37-40, 2013.
- [21] YH Kim, IK Lee, JT Kim et al., "Dependence of crosslinking temperature on swelling behavior of hyaluronic acid porous microbeads synthesized by a modified spray method", *J. of the Korean Ceramic Society*, vol. 49, no. 6, pp. 518-522, 2012.
- [22] SN Park, HJ Lee, KH Lee, H Suh, "Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide cross-linking", *Biomaterials*, vol. 23, no. 4, pp. 1205-1212, 2002.