



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2011년 2월  
석사학위 논문

골유도 재생술을 위한  
PLLA/키토산 차단막의  
제조 및 특성 분석

조선대학교 대학원

치의생명공학과

변 주 희

2011년

2월

석사학위논문

골유도 재생술을 위한

PLLA/키토산 차단막의 제조 및 특성 분석

변 주 희



골유도 재생술을 위한  
PLLA/키토산 차단막의  
제조 및 특성 분석

Preparation and Characterization of PLLA/Chitosan  
Membrane for Guided Bone Regeneration

2011년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

변 주 희

골유도 재생술을 위한  
PLLA/키토산 차단막의  
제조 및 특성 분석

지도교수 김 수 관

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2010년 10월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

변 주 희

# 변주희의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 병 훈 (인)

위 원 조선대학교 교수 이 숙 영 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 수 관 (인)

2010년 11월

조선대학교 대학원

# 목 차

Abstract .....	iv
제 1 장 서 론 .....	1
제 2 장 연구재료 및 방법 .....	3
제1절 시약 및 재료 .....	3
제2절 차단막의 제조 .....	4
제3절 차단막의 물리·화학적 특성 분석 .....	4
제4절 차단막의 열적 특성 분석 .....	7
제5절 조골세포를 이용한 <i>in vitro</i> 실험 .....	7
제 3 장 결과 .....	9
제1절 차단막의 물리·화학적 특성 평가 .....	9
제2절 차단막의 열적 특성 평가 .....	17
제3절 조골세포를 이용한 <i>in vitro</i> 생물학적 특성 평가 .....	19
제 4 장 고찰 .....	25
제 5 장 결론 .....	27
참고문헌 .....	28

## List of Table

Table 1. The XPS data of element contents on surfaces of PLLA, PLLA/Chitosan,  $\text{NH}_2$  treated PLLA, and PLLA/Chitosan membranes · 14



# List of Figures

Figure 1. Chemical structure of (a) PLLA. and (b) Chitosan .....	3
Figure 2. Schematic diagram of contact angle measurement .....	6
Figure 3. FE-SEM images of (a) PLLA, (b) PLLA/Chitosan, (c) NH <sub>2</sub> treated PLLA, and (d) NH <sub>2</sub> treated PLLA/Chitosan membrane. ..	10
Figure 4. ATR-FTIR spectra of (a) PLLA, (b) PLLA/Chitosan, (c) NH <sub>2</sub> treated PLLA, and (d) NH <sub>2</sub> treated PLLA/Chitosan membranes. ....	12
Figure 5. XPS spectra of PLLA, PLLA/Chitosan, NH <sub>2</sub> treated PLLA, and NH <sub>2</sub> treated PLLA/Chitosan membranes. ....	14
Figure 6. Contact angles on the surface of PLLA, PLLA/Chitosan, NH <sub>2</sub> treated PLLA, and NH <sub>2</sub> treated PLLA/Chitosan membranes. ....	16
Figure 7. Contact angles on the surface of NH <sub>2</sub> treated PLLA membranes a) 0 min b) 1 min, c) 5 min. ....	16
Figure 8. DSC thermograms of (a) PLLA and (b) PLLA/Chitosan membranes. ....	17
Figure 9. TGA thermograms of (a) PLLA and (b) PLLA/Chitosan membranes. ....	18
Figure 10. SEM images of MG-63 osteoblasts on (a) PLLA, (b) PLLA/Chitosan, (c) NH <sub>2</sub> treated PLLA, and (d) NH <sub>2</sub> treated PLLA/Chitosan membranes for 4 hr after cell seeding. ....	20
Figure 11. SEM images of MG-63 osteoblasts on (a) PLLA, (b) PLLA/Chitosan, (c) NH <sub>2</sub> treated PLLA, and (d) NH <sub>2</sub> treated PLLA/Chitosan membranes for 48 hr after cell seeding. ....	22
Figure 12. MTT assay of MG-63 cells on the surface of membranes for 2 days after cell seeding. ....	24

# ABSTRACT

## Preparation and Characterization of PLLA/Chitosan Membrane for Guided Bone Regeneration

By Ju-Hee Byeon

Advisor : Prof. Su-Gwan Kim D.D.S. Ph.D.  
Department of Bio Dental Engineering,  
Graduate School of Chosun University

Recently, the implant surgery literature has reported on a variety of implant procedures designed to regenerate lost bone tissue. To place implants at their ideal sites rather than on existing bone tissue, the regeneration of lost bone tissue is required, and diverse procedures have been developed to achieve this result. Guided bone regeneration (GBR) and guided tissue regeneration (GTR) are based on the dual concepts of excluding undesirable tissues from areas of defect and selectively enabling the access of healthy tissue required for regeneration. Membranes used for GBR or GTR should exhibit biocompatibility, histocompatibility, cell blocking capacity, nutrient-carrying capacity, and clinical ease of manipulation, among other properties. Membranes should be placed securely in the bone defect areas, and they should have a functional surface that can prevent the proliferation of connective tissue cells. The purpose of this study was to improve the biological, physical, and chemical properties of GBR membranes. New types of GBR membranes were fabricated to use poly(L-lactic acid) (PLLA) and chitosan via the solution casting method. PLLA has been used to prepare scaffolds to guide tissue regeneration in the field of tissue engineering research.

However, one of the limitations of PLLA as an ideal biomaterial is its high hydrophobicity.

To improve the hydrophilicity of PLLA, PLLA/Chitosan GBR membranes were enhanced with introducing  $\text{NH}_2$  groups to surfaces via plasma polymerization. The morphology and components of the membranes were characterized by scanning electron microscopy (FE-SEM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and Attenuated Total Reflectance - Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR). The hydrophilicity of the membranes was examined by measuring their water contact angles. MG-63 cells were cultured on each sample and cell viability was examined using an MTT assay. The addition of Chitosan and  $\text{NH}_2$  treated membranes ensured improvements in hydrophilicity and cell viability. These results suggested that the membrane may be useful in guided bone regeneration (GBR).

# 제 1 장 서 론

최근 임플란트 기술이 보편화 되면서 유실된 골조직을 재생하기 위한 다양한 외과적 술식이 시도되고 있다. 여러 가지 골형성 술식 중, 차단막을 이용한 guided bone regeneration (GBR)은 널리 사용되고 있는 예견성 있는 술식으로 guided tissue regeneration (GTR)의 개념에서 발전되었다 [1, 2]. GBR에 사용되는 차단막은 혈병을 보호하며, 연조직 세포의 증식을 배제하고, 결손부에 교직골(woven bone)의 형성과 골 침착을 위한 지지체(scaffold) 역할을 한다 [3, 4]. GBR에 사용되는 차단막은 비흡수성과 흡수성 2종류로 구분되는데, 흡수성 차단막으로는 유산, 글리콜산 중합체, 또는 이 둘의 혼합물과 콜라겐이 주성분으로 된 흡수성 차단막이 개발되어 사용되고 있으며 [5, 6], 흡수성 물질의 최종 대사산물은 인체에 무해하나 최종 대사가 되기 전에 재료의 기계적인 견고성이 떨어져 작은 조각들로 분쇄되며 이러한 중간 부산물의 화학적인 성질과 물리적인 성질 때문에 국소적인 조직반응이나 전신적인 반응을 일으킬 수 있다 [7].

골 재생능력을 증진시키기 위해 최근에는 천연 고분자물질로부터 채취된 다양한 약재나 재료가 개발되어 사용되고 있으며, 이러한 물질 들 중에서도 키틴으로부터 추출된 탄수화물 생중합체인 키토산(chitosan)에 대한 관심이 증가하고 있다. 키틴은 생중합체 중 셀룰로스 다음으로 풍부한 물질로서, 갑각류(예; 새우, 게, 가재 등)의 외골격, 진균의 세포벽, 곤충의 큐티클을 이루는 구조 성분이다. 키틴의 화학적 구조를 보면, 안정된 다당류로서 1,4- $\beta$  glucosamine 단위의 선형 중합체이다 [8]. 키토산은 이런 키틴의 유도체로서 키틴 분자를 N-acetylation시킴으로써 형성된다. 가장 이상적인 키토산은 키틴을 100% 아세틸화(acetylation)시킨 glucosamine기만으로 이루어진 것을 말하나 60% 이상을 가진 것이면 일반적으로 키토산으로 불린다. 키틴과 키토산은 효소에 의해 가수분해 되어 단량체 형태로 흡수되는데, 주로 라이소자임(lysozyme)에 의해서 분해된다 [9-11]. 키틴과 키토산은 상처치유 촉진 효과가 있는 글루코사민과 구조가 유사하여 의학 분야에서는 새로운 소재로 더욱 관심을 갖기 시작하였고 생체 재료로써 이용하기 위한 검토가 시작되었다.

키티와 비교할 때 키토산은 유리 아미노기에 의해서 단백질, 콜레스테롤 등과 같은 여러 물질을 잘 흡착시키는 특징이 있고 친수성이 있어 혈액이나 조직액과 같은 생리적인 매개체와 접촉하면 팽창하여 탄력성을 보유하는 특성이 있다. 또한 생체 흡수성이 있어 생체 내에서는 확실하게 흡수되는 장점이 있다 [12]. 한편, poly(L-lactide) (PLLA)는 생분해성 고분자 재료 중 가장 주목 받는 재료로, 옥수수나 설탕과 같은 천연물질을 원료로 하여 만들어진다. 고결정성 물질로서 용점이 높고 물성이 우수하여 생체재료용부터 약물전달용까지 폭 넓게 이용되고 있다 [13-15]. 특히 생체내에서 분해되는 생분해성이 있으며, 생분해 과정에서 생겨나는 부산물인 젖산은 피루빅산으로 변하고 최종적으로 TCA사이클에 의해 물과 이산화탄소로 분해된다. 메틸기의 소수성으로 인해 분해속도가 늦고 생체 내에서 약 6개월 이상의 강도유지기간을 갖는다. 이처럼 늦은 분해속도는 뼈와 같은 경조직의 지지체로 폭 넓게 사용된다 [16-18]. 또한 고분자 재료의 표면 물성 향상을 위한 개질 방법으로는 열표면처리, 화학적 표면처리, 전기화학적 표면처리, 플라즈마 표면처리, 표면박막코팅 및 커플링제 처리 등이 있으며, 특히 플라즈마 처리법은 저온 건식 방법으로 기저물질의 물성에는 영향 없이 반응이 표면층에 국한되어 균일하게 일어나므로 처리된 표면을 안정하게 다룰 수 있음과 동시에 저온에서 안정한 모든 물질을 처리할 수 있어 표면처리의 폭 넓은 장점을 지니고 있다 [19-22]. 그 중에 저압 플라즈마의 표면 처리효과는 우수하나 진공장치를 필요로 하여 비교적 장치가 복잡하고 많은 비용을 수반하며 시료 크기에 따른 제한이 있다. 그러나 대기압 플라즈마 처리는 진공장치를 수반하지 않아 비교적 저렴하며 저압 용기에 따르는 시료처리 크기에 제한을 받지 않아 수월하게 고분자 표면 개질에 사용할 수 있는 장점이 있다.

따라서 본 연구의 목적은 생분해성 고분자인 PLLA에 생체친화성과 생물학적 가능성이 있는 키토산을 첨가하여 차단막을 제조하고, NH<sub>2</sub> 플라즈마 표면처리를 시행하여 그 특성을 분석하는데 있다. 차단막의 구조와 성분은 입계주사전자현미경(FE-SEM), XPS, ATR-FTIR 측정에 의해 분석하였고, 친수성은 접촉각 측정기에 의해 확인하였다. 그리고 제조된 차단막의 세포특이성을 확인하기 위하여 MG-63 조골세포를 각 시료위에 배양하여 시간에 따른 세포의 형태학적 특성 및 MTT 분석법을 통해 세포 생존율을 조사하였다.

## 제 2 장 연구재료 및 방법

### 제1절 시약 및 재료

본 실험에 사용한 poly(L-lactic acid) (PLLA, MW 85,000-160,000)와 천연 고분자인 키토산(medium molecular)은 Aldrich사에서 구입하여 사용하였다. 용매로 사용된 클로로포름(Chloroform)과 아세트산은 Aldrich사에서 구입하여 사용하였다. MG-63 조골세포(KCLB No.21427)는 한국세포주은행에서 구입하여 배양하였다. 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA), 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco Eagle's minimum essential medium (DMEM, Gibco, USA)을 배지로 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% 습도를 유지하는 CO<sub>2</sub> 배양기(VS-9180MS, Vision Scientific Co., Korea)내에서 배양하였다.

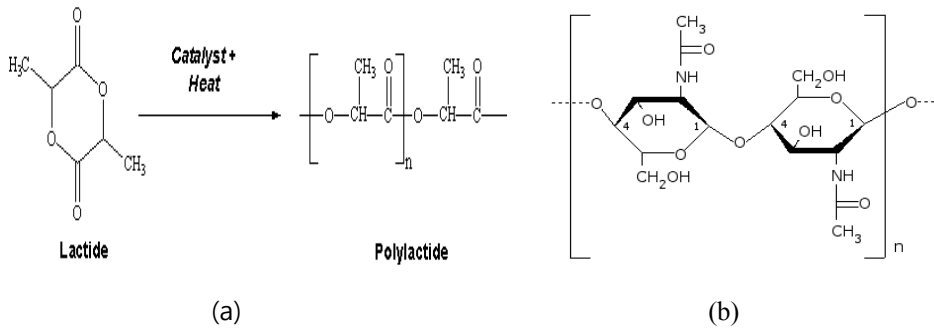


Figure 1. Chemical structure of (a) PLLA and (b) Chitosan.

## 제2절 차단막의 제조

### 1. PLLA 차단막

PLLA를 클로로포름에 용해시킨 후 용해된 혼합물을 유리판 위에 붓고 Knife Film Applicator를 이용하여 일정한 두께로 제작한 후 상온에서 24시간 동안 건조시켰다. 그리고 제조된 PLLA 차단막은  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동보관 하였다.

### 2. PLLA/키토산 차단막

PLLA/키토산 차단막은 PLLA를 클로로포름에 용해시킨 후 2% (w/v)의 키토산 수용액을 PLLA 용액에 첨가하여 교반기를 이용하여 균일하게 교반하였다. 이때 사용된 2% (w/v) 키토산 수용액은 키토산을 2% (v/v) 아세트산 수용액에 용해한 것이다. 용해된 혼합물은 PLLA 차단막 제조방법과 동일한 조건으로 제조하였다.

### 3. 플라즈마 표면처리

제조된 차단막의 표면개질은 플라즈마(UM1000134-001 A miniplasma station, PLASMART, KOREA)장치를 이용하여 수행하였다. 플라즈마 처리 장치의 챔버내에 차단막을 넣은 후 200 mTorr 진공상태에서 Allyamine (AA) 모노머로 PLLA의 표면을 활성화하는 AA 플라즈마 방식으로 50 W에서 5분간 처리하여 최종 아민기가 표면에 처리된 PLLA 및 PLLA/키토산 차단막을 제조하였다.

## 제3절 차단막의 물리·화학적 특성 분석

### 1. 표면 형상 관찰

차단막의 표면형상은 PLLA차단막과 키토산을 첨가시킨 PLLA/키토산 차단막 그리고 아민기가 코팅된 차단막의 표면을 백금 코팅하여 임계주사전자 현미경(FE-SEM, Hitachi, S4800, Japan)으로 관찰하였다.

## 2. ATR-FTIR 분석

차단막의 고분자 사슬간의 결합구조를 관찰하기 위하여 제조한 시료를 Attenuated Total Reflectance - Fourier transform infrared (ATR-FTIR, Nicolet 6700/8700, ThermoFisher Scientific)을 이용하여 적외선 분광 분석하였다.

## 3. 표면 원소 분석

표면에 존재하는 원소와 화학결합 구조를 측정하기 위하여 X-ray photoelectron spectroscopy (XPS, MultiLab2000, UK)를 이용하였다. XPS 분석을 통하여 표면의 조성, 화학적 결합상태, 구성원소를 분석하였다.

## 4. 표면 친수성 분석

제조된 차단막 표면의 친수성과 표면에너지를 측정하기 위해 접촉각 측정기(Contact angle micrometer)를 사용하였고, 측정방법은 일반적으로 많이 사용되는 sessile drop method를 사용하였다. 필름을 접촉각 측정기에 장착하고 필름의 2 cm 상부에서 복합재료의 표면에 물방울 1 $\mu$ l를 직각으로 떨어뜨리고 접촉각 측정기(SEO, phoenix-300, Korea)를 통해 복합재료의 표면과 액체의 접촉각을 측정하였다. 액체는 3차 증류수를 사용하였다.



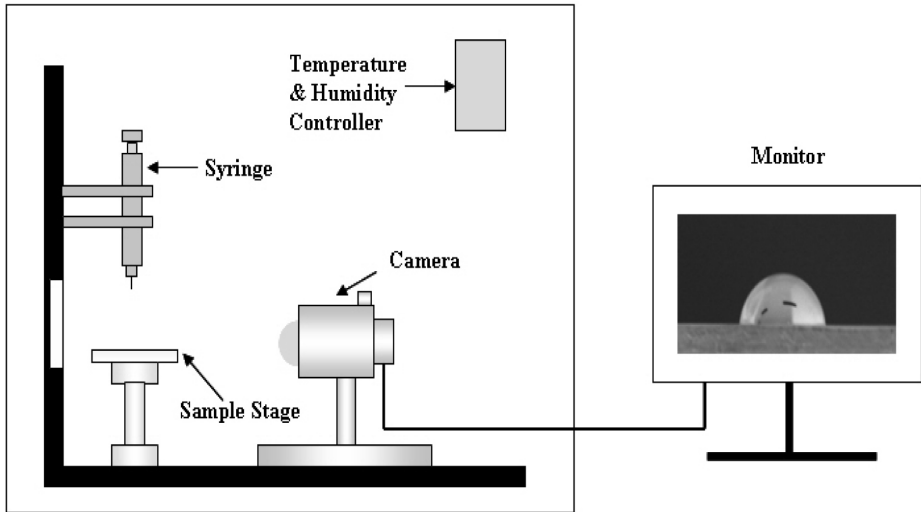


Figure 2. Schematic diagram of contact angle measurement.

## 제4절 차단막의 열적 특성 분석

### 1. 시차주사열량분석(DSC)

차단막의 열안정성과 열적거동은 DSC (Differential scanning calorimeter, DSC2010, TA Instruments, U.S.A)를 이용하여 분석하였다. 측정조건은 질소 순환조건에서 10 °C/min의 가열속도(heating rate)로 승온 및 강온 속도로 0-220°C의 온도범위에서 측정하여 유리전이온도(T<sub>g</sub>), 결정화온도 및 용융 온도(T<sub>m</sub>) 등을 측정하였다.

### 2. 열 질량 분석(TGA)

제조된 차단막을 TGA (Thermogravimetric analysis, TA Instrument Q50, U.S.A)를 이용하여 질소 분위기 하에서 약 15-20 mg의 시료를 10 °C/min의 승온 속도로 0-900°C 범위에서 측정하여 열분해 온도를 측정하였다.

## 제5절 조골세포를 이용한 *in vitro* 실험

### 1. MG-63 조골세포의 배양

MG-63 조골세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA), 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco Eagle's minimum essential medium (DMEM, Gibco, USA)을 배지로 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% 습도를 유지하는 CO<sub>2</sub> 배양기(VS-9180MS, Vision Scientific Co., Korea)내에서 배양하였다.

### 2. MTT 분석

*in vitro* 실험을 위해 제작되어진 직경 14 mm 차단막을 24 well plate에 실리콘링을 이용하여 고정시키고 배양된 MG-63 조골세포를 1.5×10<sup>5</sup> cell/mL로 seeding하여 배양하였다.

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide)용액을 0.5 mg/mL로 첨가하고 4시간 배양한 후 formazan을 DMSO (dimethylsulfoxide, Sigma)로 용해시켜 96well plate에 100 μl씩 옮긴 후

ELISA Reader(E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. MG-63 조골세포의 표면부착

MG-63 조골세포의 초기 부착을 관찰하기 위하여 모든 시편을 EO가스로 멸균 처리한 후 MG-63 조골세포를 시편 당  $1.5 \times 10^5$ 개씩 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 배양하였다. PBS로 미부착 세포를 제거하고 2% paraformaldehyde-glutaraldehyde로 고정한 후 여분의 1차 고정액을 0.1M PBS로 10분씩 2회 수세하였다. 지질의 성분을 보호해 주면서 시료를 안정화(경화)시키기 위하여 1% OsO<sub>4</sub> (osmium tetroxide)로 1시간 동안 고정하고 OsO<sub>4</sub> 와 알코올이 직접 만나면 시료 내외에 검은 염색성이 나타나는 것을 방지하고자 0.1M PBS로 다시 10분간 수세하였다. 수세과정 후 세포를 탈수시키기 위하여 50%, 70%, 90%, 95%, 100% 알코올로 10분씩 탈수과정을 거쳤다. 위의 탈수과정으로 건조된 시료는 백금으로 코팅을 하여 임계주사전자 현미경(FE-SEM, Hitachi, S4800, Japan)으로 관찰하였다.

## 제 3 장 결과

### 제1절 차단막의 물리·화학적 특성 평가

#### 1. 표면 형상

용매캐스팅법으로 제조한 PLLA차단막과 키토산을 첨가시킨 PLLA/Chitosan 차단막 그리고 아민기가 코팅된 차단막의 표면을 주사전자현미경으로 관찰한 결과를 Figure 3에 나타내었다. 순수 PLLA 차단막 (a)의 경우 매끄러운 표면 형상이 나타남을 확인하였고, 키토산이 혼합된 차단막 (b)의 경우 차단막 표면에 미세 기공들이 형성됨을 확인할 수 있었다. 또한  $\text{NH}_2$  플라즈마 표면 처리 된 순수 PLLA 차단막 (c)는 플라즈마 처리전과 비교하여 표면 거칠기를 나타내었으며, PLLA/Chitosan 차단막에 플라즈마를 처리한 경우는 폴리아릴아민 고분자막이 차단막 표면의 미세기공을 덮어버린 형태를 관찰할 수 있었다 (d).

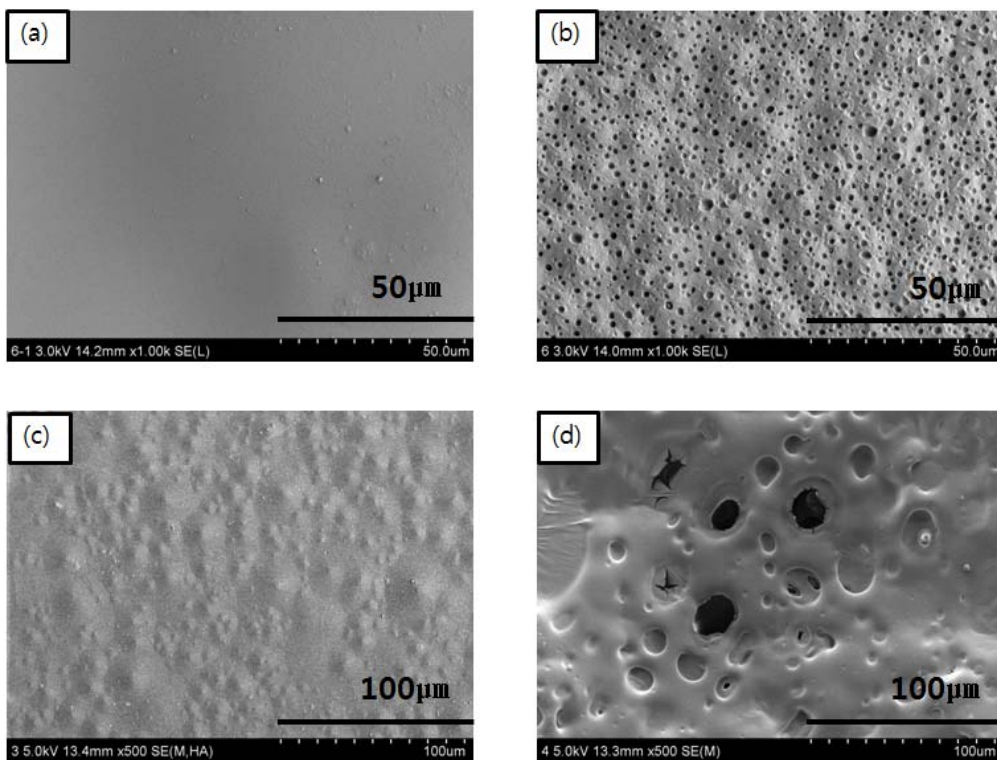


Figure 3. FE-SEM images of (a) PLLA, (b) PLLA/Chitosan, (c) NH<sub>2</sub> treated PLLA, and (d) NH<sub>2</sub> treated PLLA/Chitosan membranes.

## 2. 표면 화학 특성(ATR-FTIR)

적외선 분광 분석법을 통하여 지지체의 고분자 결합 형태를 분석하여 Figure 4에 나타내었다. 분석결과 PLLA 차단막에서는 카르보닐기와 에스터기가 각각  $1700\text{ cm}^{-1}$ ,  $1750\text{ cm}^{-1}$ 에서 나타남을 확인하였고, PLLA/키토산 차단막에서는 카르보닐기( $1700\text{ cm}^{-1}$ )와 아마이드 ( $1560\text{ cm}^{-1}$ ,  $1650\text{ cm}^{-1}$ ) 및 에스터기 ( $1730\text{ cm}^{-1}$ )의 피크를 확인 할 수 있었다. 즉 PLLA control은 lactide에 의한 에스터의 특성 피크가 크게 나타났으며, 표면처리 전과 후의 스펙트럼을 비교해 보면 아민기가 처리된 PLLA 차단막과 PLLA/키토산 차단막에서 카복실기의 증가를 확인할 수 있었다.

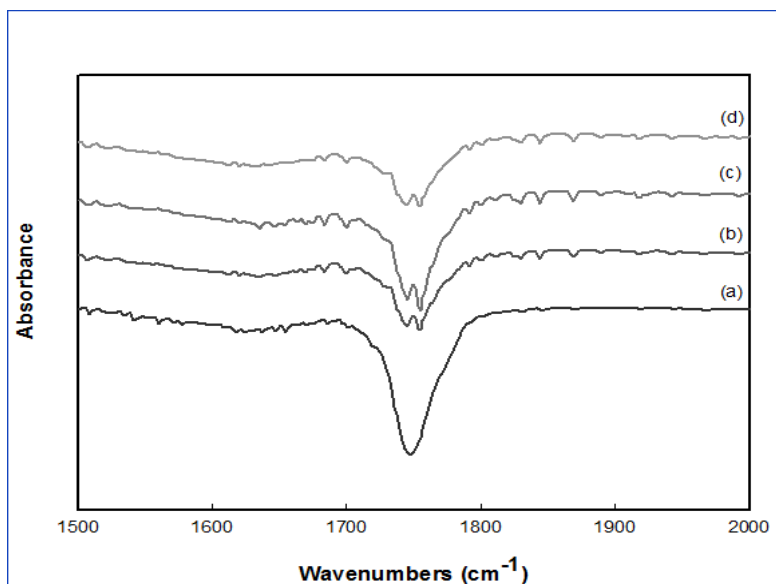
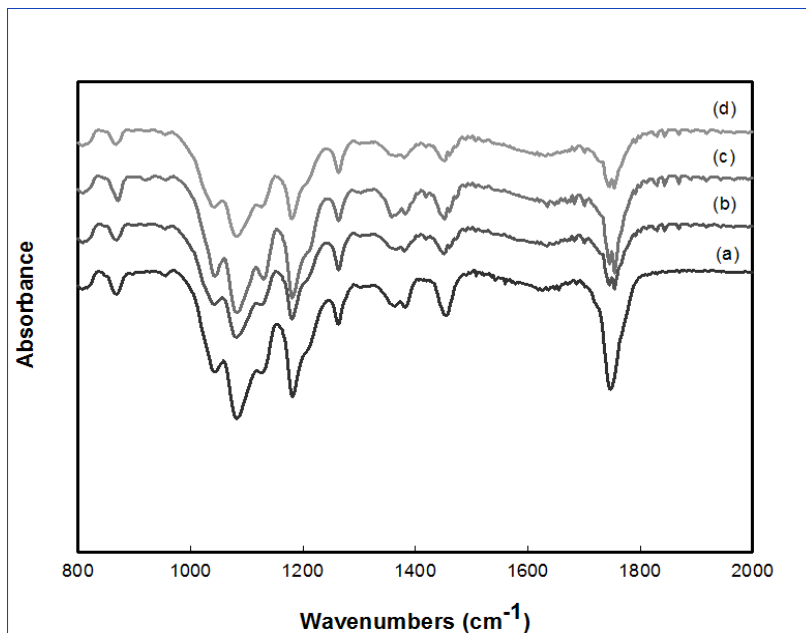


Figure 4. ATR-FTIR spectra of (a) PLLA, (b) PLLA/Chitosan, (c)  $\text{NH}_2$  treated PLLA, and (d)  $\text{NH}_2$  treated PLLA/Chitosan membranes.

### 3 XPS 결과

일반적으로 플라즈마 개질된 고분자 표면은 플라즈마에 의해 활성화된 반응기가 고분자 표면과의 재배열과 재결합을 통하여 친수성 작용기의 생성을 증가시켜 표면에너지의 증가를 가져오게 된다. 특히 아민기의 경우는 카르보닐(-C=H), 카르복실(-COOH), 알데하이드(-CHO) 그룹등을 생성하여 다른 물질과의 접착력을 향상시킨다. Figure 5는 플라즈마 처리 전후의 차단막 표면의 화학적 결합형태를 XPS로 분석한 결과를 나타내었다. 아민기의 표면처리에 의하여 N1s peak의 값이 상승함을 확인할 수 있었고 키토산이 PLLA와 잘 혼합됨을 확인할 수 있었다.

XPS 데이터를 바탕으로 C1s, O1s, N1s 스펙트럼으로부터 화학 조성 분석을 하였고, 결합에너지에서의 면적에 대한 %기여도를 Table 1에 나타내었다. 플라즈마 처리되지 않은 차단막 시편의 C1s 스펙트럼에서 특성 피크로 C-C/C-H (285.0 eV), C-OH 특성값은 플라즈마 처리 후에 기준치보다 모두 높게 측정되어 극성 작용기가 새롭게 형성된 표면을 구성하고 있음을 보여주었다.





Figure 5. XPS spectra of PLLA, PLLA/Chitosan, NH<sub>2</sub> treated PLLA, and NH<sub>2</sub> treated PLLA/Chitosan membranes.

Table 1. The XPS data of element contents on surfaces of PLLA, PLLA/Chitosan, NH<sub>2</sub> treated PLLA, and PLLA/Chitosan membranes

Samples*	atomic				
	C(%)	O(%)	N(%)	O/C	N/C
PLLA membrane	69.42	30.4	0.18	0.44	0.00
PLLA/Ch membrane	70.99	27.33	1.68	0.38	0.02
NH <sub>2</sub> treated PLLA	84.04	12.65	3.31	0.15	0.15
NH <sub>2</sub> treated PLLA/Ch	76.88	9.37	13.75	0.12	0.18

\*Ch : initial of chitosan

#### 4. 표면 친수성 평가

접촉각 측정은 시간경과에 따라 3번 측정하여 평균을 계산하였고, 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. PLLA 차단막과 PLLA/키토산 차단막의 접촉각은 70°에서 최대 55°까지 변화하였다, 또한 NH<sub>2</sub> 플라즈마 표면처리에 의하여 차단막들은 더욱 낮은 접촉각을 가지게 되었으며 즉, 친수성이 향상됨을 확인할 수 있었다. Fig. 7은 아민기가 처리된 PLLA 차단막의 0분, 1분, 5분경과에 따른 접촉각을 보여주는 사진이다.

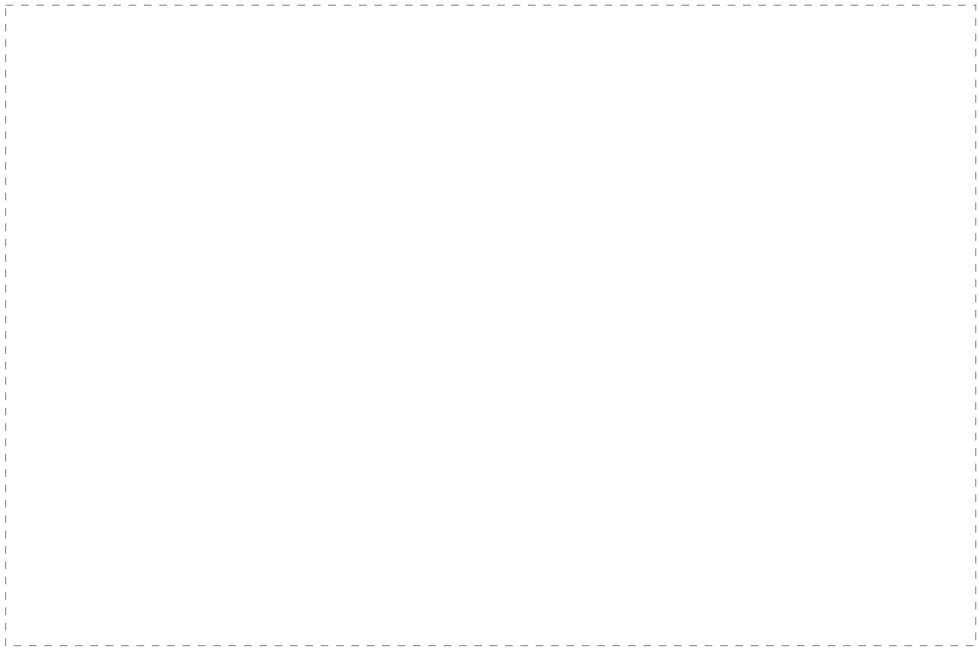


Figure 6. Contact angles on the surface of PLLA, PLLA/Chitosan,  $\text{NH}_2$  treated PLLA, and  $\text{NH}_2$  treated PLLA/Chitosan membranes.

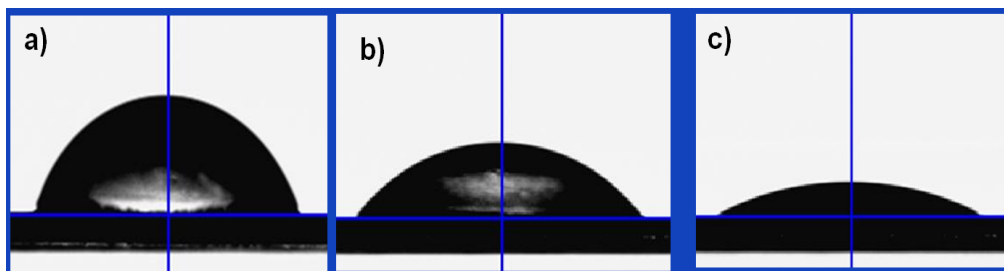


Figure 7. Contact angles on the surface of  $\text{NH}_2$  treated PLLA, membranes. a) 0 min b) 1 min, c) 5 min.

## 제2절 차단막의 열적 특성 평가

### 1. 차단막의 시차주사 열분석

키토산의 혼합에 따른 차단막의 열적특성을 관찰하기 위해 시차 주사열량계(DSC) 분석을 하였고, 이의 결과를 Figure 8에 나타내었다. 제조된 PLLA 차단막과 PLLA/키토산 차단막의 용융온도에는 큰 변화가 없는 것을 확인하였으며, 이에 키토산을 첨가했을 경우 PLLA 차단막의 물리적 특성에는 영향을 주지 않는 것을 확인하였다.

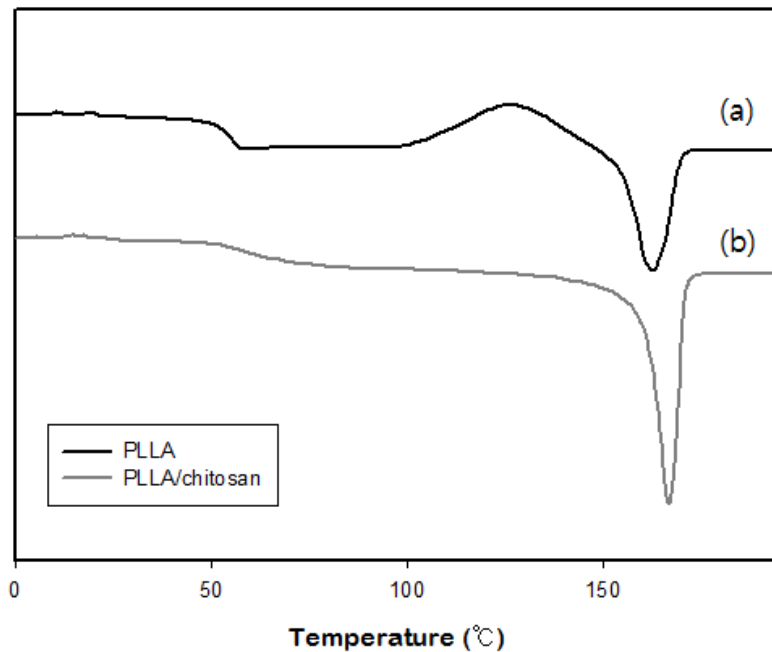


Figure 8. DSC thermograms of (a) PLLA and (b) PLLA/Chitosan membranes.

## 2. 차단막의 열 질량 분석

키토산의 혼합에 따른 PLLA/키토산 차단막의 열 분해 거동을 알아보기 위하여 TGA 측정 결과를 Figure 9에 나타내었다. 순수 PLLA와 PLLA/키토산 차단막의 초기 열분해 온도는 150°C 부근에서 시작되었으며, 감량률은 순수 PLLA 차단막이 좀 더 낮게 나타났지만, 두 차단막에 있어서 무게 감량의 큰 차이가 없음을 알 수 있었다.

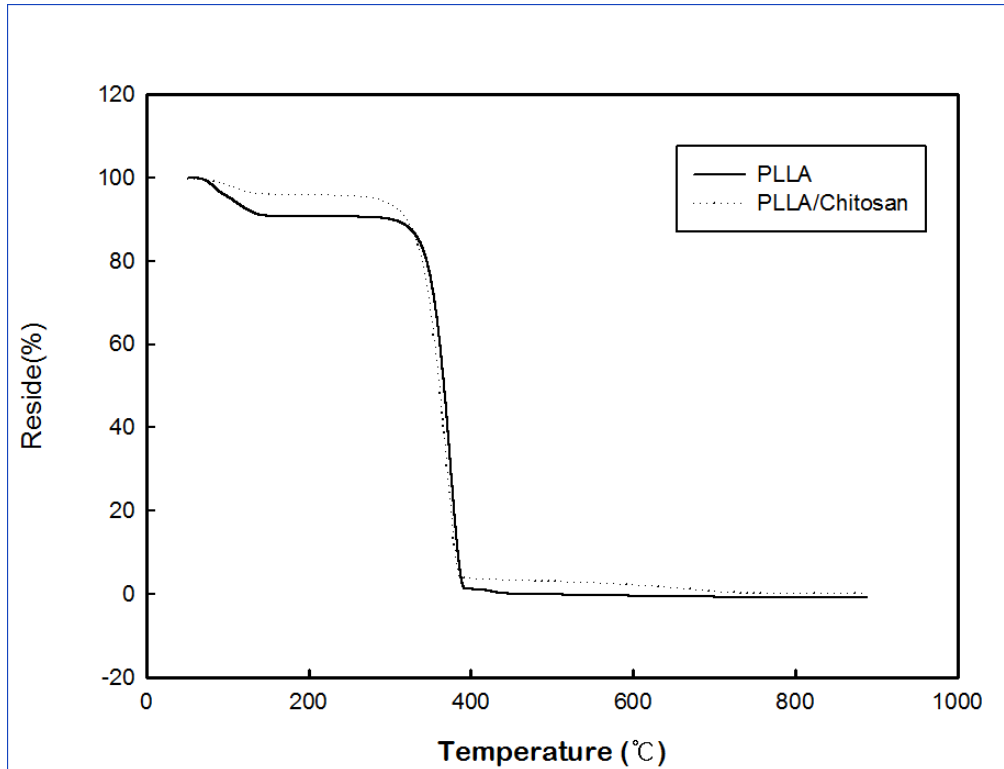


Figure 9. TGA thermograms of (a) PLLA and (b) PLLA/Chitosan membranes.

### 제3절 조골세포를 이용한 *in vitro* 생물학적 특성 평가

#### 1. 차단막의 조골세포에 대한 부착 특성

Fig. 10은 4시간 배양후, 차단막에 대한 조골세포의 부착양상을 나타낸 것이다. PLLA 차단막 (a)에 대한 조골세포의 부착양상을 살펴보면 막에 대한 세포의 부착율은 아민기를 처리한 PLLA 차단막 (c)에서 다소 양호하게 나타났다으며, 부착양상은 크게 두가지로 구분되는데 타원형 세포들과 섬유아세포형 세포들을 볼 수 있었다. 타원형 세포들은 단일세포로 부착되어 있기보다는 두 개 이상의 세포들이 근접하여 무리지어 있는 것을 알 수 있으며, 섬유아세포형 세포들은 타원형 세포들과 인접한 부분에서 매우 활동적으로 막 표면에 밀착된 형태로 관찰되었다. 또한 타원형으로 융기된 세포들의 경우엔 PLLA 차단막의 표면에 서서히 밀착하기 위하여 활동적으로 변화되어져 가는 것이 관찰되었다.

PLLA/키토산 차단막 (b)에 대한 조골세포의 부착양상을 살펴보면 대부분의 세포가 섬유아세포형으로 관찰되었는데 이와같은 현상은 조골세포가 빠른 속도로 다공질성의 막 표면에 매우 안정적으로 부착되어졌음을 의미한다. 또한 세포들이 전체적으로 막의 표면에 균일하게 배열 부착되어 있음을 알 수 있으며. 최대한의 크기로 신장되어진 세포들은 막의 표면에 형성되어있는 pore들을 커버하면서 발달되어 있으며 동시에 인접한 세포들과도 강하게 연결되어 있음을 알 수 있었다. 아민기가 처리된 PLLA/키토산 차단막 (d)의 표면에서는 밀착되어져 있는 세포로부터 바깥쪽으로 돌출 신장된 미세한 사상 위족(filopodia)이 관찰되었으며, 막 표면상의 커다란 함몰부위에서도 세포가 매우 안정적으로 정착되어 있으며 세포질로부터 돌출되어진 수많은 filopodia들이 비함몰 부위쪽으로 길게 신장 부착되면서 인접 세포들과 밀착되어 있었다.

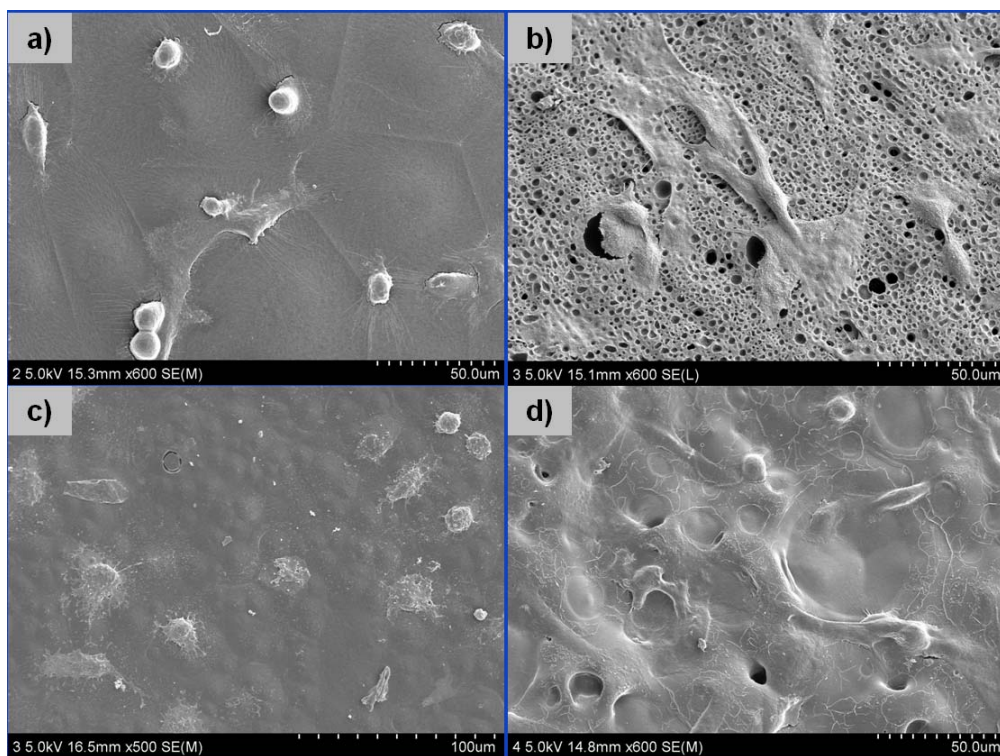


Figure 10. SEM images of MG-63 osteoblasts on (a) PLLA, (b) PLLA/Chitosan, (c) NH<sub>2</sub> treated PLLA, and (d) NH<sub>2</sub> treated PLLA/Chitosan membranes for 4 hr after cell seeding.

Fig. 11에서는 48시간 배양 후, 4종의 차단막에 부착된 세포들의 특성을 나타내었다. 4종의 차단막에서는 증상위족(lamellipodia)들도 잘 발달되어 있으며 불규칙적으로 filopodia과 lamellipodia이 형성되고 있음을 알 수 있었고, 그중에서도 아민기가 처리된 PLLA/키토산 차단막에서 둥그런 모양의 세포들과 넓게 펼쳐진 세포들이 서로 인접하여 있으며 막의 함몰부위에 부착된 세포들이 용기된 상태에서 형태적으로 변화되고 있는 것을 볼 수 있었다.



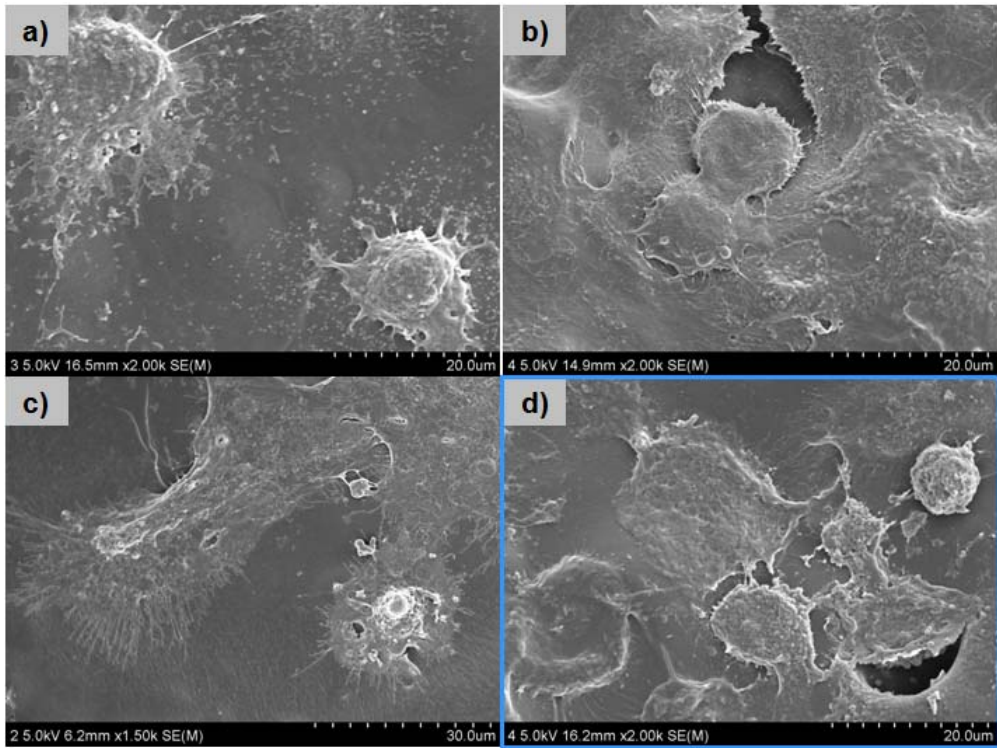


Figure 11. SEM images of MG-63 osteoblasts on (a) PLLA, (b) PLLA/Chitosa, (c) NH<sub>2</sub> treated PLLA, and (d) NH<sub>2</sub> treated PLLA/Chitosan membranes for 48 hr after cell seeding.

## 2. MTT 분석

탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium, 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 MTT 분석법을 이용하여 차단막의 초기 세포부착 및 증식률을 확인하였다. MG-63 조골세포를 4종의 차단막에 48시간씩 배양하여 세포 증식률을 Figure 12에 나타내었다. MTT 분석결과 PLLA 차단막, 아민기가 처리된 PLLA 차단막, 그리고 PLLA/키토산 차단막에서는 유의적 차이점은 확인할 수 없었으나 아민기가 처리된 PLLA/키토산 차단막에서는 다소 높은 MTT결과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

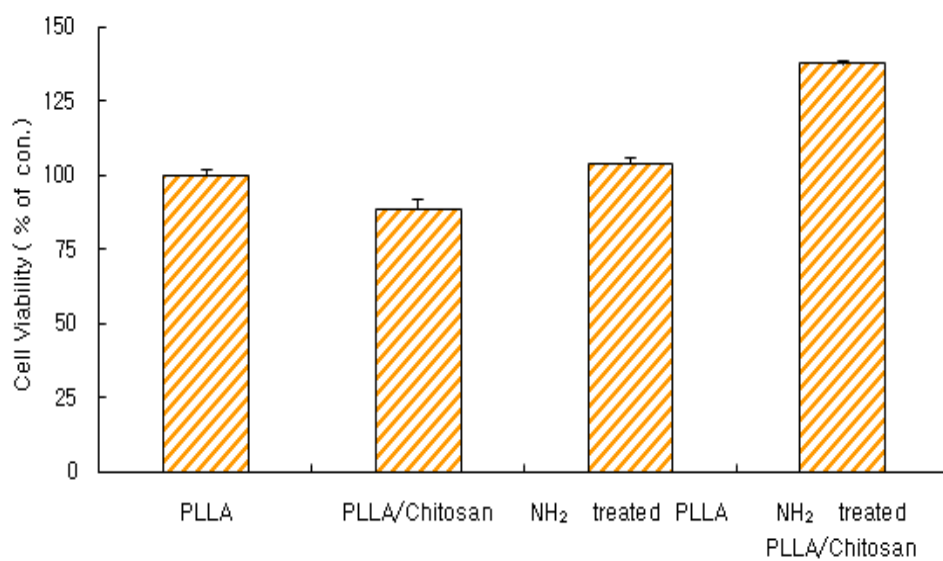


Figure 12. MTT assay of MG-63 cells on the surface of membranes for 2 days after cell seeding.

## 제 4 장 고찰

골이식술이나 골유도재생술에 의한 골 재생은 치과임상에서 관심이 많은 분야로 특히 구강외과 영역이나 치주과 영역에서 결손된 골을 재생시키기 위한 많은 연구가 진행되어 왔다. 골유도 재생은 궁극적으로 골 결손부가 스스로 치유할 수 있는 재생력을 발휘할 수 있도록 환경 즉 기계적 방어막으로 격리 공간을 제공해 주는 것이다 [23]. 이러한 차단막이 갖추어야 할 물리적 특성에 대하여는 잘 알려진 바와 같이 생체 친화성, 상피세포들의 이주를 막을 수 있는 차단성, 다루기의 용이성, 공간을 유지하는데 적절한 견고성과 주의 조직과 잘 붙을 수 있는 결합성 등이 있다. 세포 차단막의 의미와 영양 물질의 공급이라는 측면에서 차단막의 투과성과 골 형성의 상관관계에 관하여 많은 연구가 있었는데, Hurley 등 [24]은 공의 실리콘 고무 차단막과 소구경의 초산 셀룰로오즈 차단막을 사용하여 척추 융합 실험을 한 결과 무공 차단막 하방에는 골 형성이 거의 없었으나 소구경 차단막 하에서는 골 형성이 일어났다고 하였다. 최근 생분해성 polyglycolide (PGA), poly(L-lactic acid) (PLLA), poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) 등의 합성 고분자 또는 콜라겐(collagen), 키토산(chitosan) 및 히알론산(hyaluronic acid) 등의 천연 고분자가 조직공학용 지지체로 많이 연구되고 있다 [25,26]. PLLA는 생분해성 고분자 재료 중 가장 주목받는 재료로 분해속도가 늦고 생체 내에서 약 6개월 이상의 강도유지기간을 갖는다. 그러나 높은 소수성을 지니고 있어 사용에 제한적인 부분이 있다.

키토산은 여러 물질을 잘 흡착시키는 특징이 있고 친수성이 있어 혈액이나 조직액과 같은 생리적인 매개체와 접촉하면 팽창하여 탄력성을 보유하는 특성이 있으며 생체 흡수성이 있어 생체 내에서는 확실하게 흡수된다. 생체 적합성과 항균작용, 창상 치유 촉진 등의 생물학적 작용, 우수한 기계적 특성으로 관심이 증가하고 있는 키토산은 키틴을 강알칼리로 처리하여 탈 아세틸화시킨 유도체로서 구조적으로 하이알유론산과 유사한 polycationic complex carbohydrate이며 분자량은 800-1500 kd인 생분해성 물질이다. 일반적으로 다당류의 경우에는 효소에 의해 가수분해가 일어나며, 키틴과 키토산의 경우

에도 이러한 기전으로 분해되는 것으로 보고되고 있는데 라이소자임 (lysozyme)이 가장 효과적인 효소로 알려져 있다 [27-29]. 라이소자임의 경우 외부 자극이 없는 경우에도 대식세포에 의해 지속적으로 분비되는데, 체내에 매식된 키토산은 대식세포를 자극하게 되어 라이소자임의 분비를 증진시키게 된다 [30-32]. Klokkevold 등 [33]과 Paik 등 [34]의 *in vitro* 실험에서 키토산이 백서 두개골 세포의 석회화 결정 형성에 영향을 미친다고 하였다. 또한 키토산이 조골세포와 같은 골전구세포의 이동과 분화를 촉진시키는 기질의 역할을 하는 반면에 골형성을 방해하는 세포의 기능을 억제하여 간접적으로 골 형성을 증진시킬 수 있다고 하였다. Malette 등 [12]이나 Muzzarelli 등 [35]은 동물실험을 통해 키토산이 골 형성을 증진시킨다는 사실을 보고하였다. 키토산에 대한 연구는 의학 분야, 식품분야, 약품 원료, 산업폐수 처리용 응집제, 섬유제조, 화장품 소재 등 각 분야에서의 연구가 활발히 진행되고 있다. Kienzle Sterzer 등 [36]은 키토산의 농도와 용매의 종류에 따른 키토산 필름의 기계적 물성에 미치는 영향을 조사하였으며, Caner 등 [37]은 용매로 사용한 산의 농도와 가소제의 농도에 따른 키토산 필름의 특성을 조사하였다. 이외에도 키토산 필름의 물성을 개선하기 위해 키토산을 다른 고분자와 함께 혼합하여 복합필름을 제조한 시도도 있었다. Lazaridou 등 [38]은 chitosan과 starch, chitosan과 pullulan 혼합필름의 thermophysical 특성에 대하여 연구하였다. 본 연구에서는 용매캐스팅법에 의하여 PLLA, PLLA와 Chitosan을 혼합한 차단막을 제조하였다. 또한 PLLA의 단점인 hydrophobic한 성질(소수성)을 개선하기 위해 NH<sub>2</sub> 플라즈마 표면처리를 시행하였다. 그 결과 키토산을 혼합하여 차단막을 제조하였을 때, 키토산의 용매인 아세트산의 증발로 인하여 표면에 다공이 형성됨을 확인할 수 있었고, 친수성으로의 표면 개질 기능 변화를 확인할 수 있는 물리적 척도로서 접촉각 측정기에 의해 친수성을 확인한 결과 키토산을 함유한 차단막과, NH<sub>2</sub> 플라즈마 표면처리에 의한 차단막에서 친수성이 향상됨을 확인할 수 있었다. MG-63 조골세포의 MTT분석 결과 PLLA, 아민기가 처리된 PLLA, PLLA/키토산 차단막에서는 유의적 차이점은 확인할 수 없었으나 아민기가 처리된 PLLA/키토산 차단막에서는 다소 높은 MTT결과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

## 제 5 장 결론

본 연구에서는 용매캐스팅법으로 PLLA, PLLA/키토산 차단막을 제조하고, 차단막의 표면적을 증가시키고 골 유착을 향상시킬 수 있는 플라즈마 표면처리법으로 아민기를 코팅하여 차단막의 특성변화를 고찰하였다. 차단막의 구조와 성분은 SEM, XPS, ATR-FTIR 분석에 의해 측정하였고, 친수성으로의 표면 개질 기능 변화를 확인 할 수 있는 물리적 척도로서 접촉각 측정기에 의해 친수성을 확인하였다. 또한 MG-63 세포를 각 샘플 위에 배양한 후 세포생존율은 MTT분석법으로 조사하였다. 그 결과 키토산의 첨가와 NH<sub>2</sub> 플라즈마 처리에 의하여 친수성의 증가와 세포생존율의 향상을 확인하였다.

1. 용매캐스팅을 하여 PLLA와 키토산을 혼합한 차단막을 제조하였을 때 아민기가 처리된 PLLA/키토산 차단막의 경우 PLLA와 키토산이 잘 혼합되었고, NH<sub>2</sub> 플라즈마에 의해 표면이 개질됨을 ATR-FTIR, XPS, SEM 으로 확인하였다. 그리고 순수 PLLA 및 PLLA/키토산 차단막보다 표면 친수성이 증가함을 접촉각 측정을 통하여 확인하였다.

2. 아민기가 처리된 PLLA/키토산 차단막의 경우 순수 PLLA와 PLLA/키토산 차단막보다 세포 특이성이 다소 우수하게 나타남을 MG-63 조골세포의 부착을 통해 SEM 분석으로 부터 확인할 수 있었다.

3. MG-63 조골세포의 MTT분석 결과 PLLA, 아민기가 처리된 PLLA, PLLA/키토산 차단막에서는 유의적 차이점은 확인할 수 없었으나 아민기가 처리된 PLLA/키토산 차단막에서는 다소 높은 MTT결과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

4. 이상의 결과들로부터 본 연구에서 제조된 아민기가 처리된 PLLA/키토산 차단막은 보다 인체 유익한 GBR용으로 치과영역에서 사용이 가능 할 것으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

- 1) C. Dahlin, A. Linde, J. Gottlow, S. Nyman, Healing of bone defects by guided tissue regeneration, *Plast Reconstr Surg.* 81, 672-676, 1988.
- 2) R. K. Schenk, D. Buser, W. R. Hardwick, C. Dahlin. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects:a histologic study in the canine mandible. *Int. J. Oral Maxillofacial Implants*, 9, 13-29, 1994.
- 3) A. J. Schulz, A. H. Grager, Guided tissue regeneration using on absorbable membrane (poly glactin 910) and osseous grafting, *Int. J. Periodontol*, 10, 8, 1990.
- 4) T. J. Balshi, O. D. Hernadez, R. H. Culter, C. F. Hertzog, Treatment of osseous defects using vicryl mesh (poly glactin 910) and the Braenemark implant, A case report, *Int. J. Oral Max-Facial Implants*, 6, 87, 1991.
- 5) H. S. Rai, M. S. Bhattacharyya, J. Singh, T. K. Bansal, P. Vats, U. C. Banerjee, Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: a review of emerging techniques with reference to biological treatment, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 35, 219 - 238, 2005.
- 6) A. Piattelli, A. Scarano, P. Russo, S. Matarasso, Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-bioresorbable membranes. *Biomaterials*, 17, 791 - 796, 1996.
- 7) T. Arx, D. L. Cochran, R. K. Schenk, D. Buser, Evaluation of prototype trilayer membrane (PTLM) for lateral ridge augmentation: an experimental study in the canine mandible. *Int. J. Oral Maxillofac.* 31, 190 - 199, 2002.
- 8) G. O. Aspinall : The polysaccharides. Chitin and chitosan, New York : *Elsevier Science Publishing Co. Inc.* 53-70, 1992.
- 9) K. Amno, E. Ito, The action of lysozyme on partially deacetylated

- chitin. *Eur. J. Biochem.* 85, 97-104, 1978.
- 10) S. H. Pangburn, P. V. Trescony, J. Hekker, Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels, *Biomaterials*, 3, 105-108, 1982.
  - 11) Y. Shigemasa, K. Saito, H. Sashiwa, H. Saimoto. Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *Int. J. Biol. Macromol.* 16. 43-49, 1994.
  - 12) W. G. Malette, H. J. Quigley, E. D. Adickes, Chitin in nature and technology. In: R.A. Muzzarelli, C. Jeuniaux, G. W. Gooday, eds, Chitosan Effect in Nature and Technology. *New York: Pleum press*, 435-442, 1986.
  - 13) S. W. Shalaby, Biomedical Polymers, *Hanser Publishers, New York*, 1994.
  - 14) N. Angelova, D. Hunkeler, Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends Biotechnol.* 17, 409-421.1999.
  - 15) O. Pillai, R. Panchagnula, Polymers in drug delivery, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 447, 2001.
  - 16) Z. Wang, C. Roberge, Y. Wan, L. H. Dao, R. Guidoin, Z. Zhang, *J. Biomed. Mater. Res.* 66A, 738. 2003.
  - 17) G. Shi, M. Rouabhia, Z. Wang, L. H. Dao, Z. Zhang, A novel electrically conductive and biodegradable composite made of polypyrrole nanoparticles and polylactide, *Biomaterials*, 25, 2477-2488, 2004.
  - 18) Y. Wan, D. Wen, Preparation and characterization of porous conducting poly(DL-lactide) composite membranes, *J. Membr. Sci.* 246, 193-201, 2005.
  - 19) E. T. Kang, K. L. Tan, K. Kato, Y. Uyama, and Y. Ikada, Surface Modification and Functionalization of Polytetrafluoroethylene Films, *Macromolecules*, 29, 6872-6879, 1996.
  - 20) A. Nihlstrand, T. Hjertberg, and K. Johansson, Plasma Treatment of



- Polyolefins - Influence of Material Composition .1. Bulk and Surface Characterization, *Polymer*, 38, 3581-3589, 1997.
- 21) J. R. Chen, T. Wakida, Studies on the Surface Free Energy and Surface Structure of PTFE Film Treated with Low Temperature Plasma, *J. Appl. Polym. Sci.* 63, 1733-1739, 1997.
  - 22) R. J. Good, Contact angle, wetting, and adhesion: a critical review, *J. Adhesion Sci. Technol.* 6, 1269-1302, 1992.
  - 23) A. Linde, C. Thoren, C. Dahlin, E. Sanberg, Creation of new bone by an osteopromotive membrane technique: An experimental study in rats. *J. Oral and Maxillofacial Surg.* 51, 892-897, 1993.
  - 24) L. A. Hurley , F. E. Stinchfield, A. L. Bassett, W. H. Lyon, The role of soft tissues n osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions, *J. Bone Joint Surg.* 41A, 1243-1254, 1959.
  - 25) R. P. Lanza, R. Langer, W. L. Chick, Principle of Tissue Engineering *Academic Press, San Diego*, 1997.
  - 26) C. W. Patrick Jr., A. G. Mikos, and L. V. McIntire, Prospectus of Tissue Engineering, *Frontiers in Tissue Engineering, Elsevier Science Press, Oxford*, 1998.
  - 27) G. A. F. Roberts, Chitin Chemistry, *The Macmillan Press, Ltd. London*, 1992.
  - 28) O. Felt, P. Furrer, J. M. Mayer, B. Plazonnet, P. Buri, R. Gurny, Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention, *Int. J. Pharm.* 180, 185-193, 1999.
  - 29) S. Patashnik, L. Rabinovich, G. Golomb, Preparation and evaluation of chitosan microspheres containing bisphosphonates. *J. Drug Target.* 4, 371-380, 1997.
  - 30) J. S. Song, C. H. Such, Y. B. Park, S. H. Lee, N. C. Yoo, J. D. Lee, K. H .Kim, S. K Lee, A phase I/IIa study on intra-articular injection of holmium-166-chitosan complex for the treatment of knee synovitis of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Nucl. Med.* 28, 489-497, 2001.

- 31) P. He, S. S. Davis, L. Illum, In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres, *Int. J. Pharm.* 166, 75-88, 1998.
- 32) P. Calvo, J. L. Vila-Jato, M. J. Alonso, Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carrier, *Int. J. Pharm.* 153, 41, 1997.
- 33) P. R. Klokkevold, L. Vandermark, E. B. Kenney, G. W. Bernard. Osteogenesis enhanced by chitosan (Poly-N-Acetyl Glucosamino-glycan) in vitro, *J. Periodontol*, 67, 1170-1175, 1996.
- 34) J. W. Paik, H. J. Lee, Y. J. Yoo, K. S. Cho, C. K. Kim, S. H. Choi, The effects of chitosan on the human periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J. Korean Acad. Periodontol*, 31, 823-832, 2001.
- 35) R. A. Muzzarelli, G. Biagini, A. Pugnali, O. Filippini, V. Baldassarre, Reconstruction of periodontal tissue with chitosan. *Biomaterials*, 10, 598-603, 1989.
- 36) C. A. Kienzle-Sterzer, D. Rodriguez-Sanchez, C. Rha, Mechanical properties of chitosan films: Effect of solvent acids. *Makromol. Chem.* 183, 1353-1359, 1982.
- 37) C. Cancer, P. J. Vergano, J. L. Wiles, Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer and storage. *J. Food Sci.* 63, 1049-1053, 1998.
- 38) A. Lazaridou, C. G. Biliaderis, Thermophysical properties of chitosan, chitosan-starch and chitosan-pullulan films near the glass transition. *Carbohydr. Polym.* 48, 179-190, 2002.
- 39) J. S. Mao, H. F. Liu, Y. J. Yin, K. D. Yao, The properties of chitosan - gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods, *Biomaterials*, 24, 1621-1629, 2003.
- 40) J. K. F. Suh, H. W. T. Matthew, Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, 21, 2589-2598, 2000.
- 41) Y. J. Yin, K. D. Yao, G. X. Chang, J. B. Ma, Properties of

- polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin. *Int. Polym.* 48, 429 - 432, 1999.
- 42) H. C. Liu, I. C. Lee, J. H. Wang, S. H. Yang, T. H. Young, Preparation of PLLA membranes with different morphologies for culture of MG-63 Cells, *Biomaterials*, 25, 4047-4056, 2004.
- 43) S. H. Teng, E. J. Lee, P. Wang, D. S. Shin, H. E kim, Three-Layered Membranes of Collagen/Hydroxyapatite and Chitosan for Guided Bone Regeneration, *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 132-138, 2008.
- 44) Y. Wan, H. Wu, A.X. Yu, D.J. Wen. Biodegradable polylactide/chitosan blend membranes. *Biomacromolecules*, 7, 1362 - 1372, 2006.
- 45) R J. Samuels. Solid state characterization of the structure of chitosan films. *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* 19, 1081 - 1105, 1981.
- 46) L. Zhang, Y. Li, A. Yang, X. Peng, X. Wang, X. Zhang. Preparation and in vitro investigation of chitosan/nano-hydroxyapatite composite used as bone substitute materials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 16, 213 - 219, 2005.
- 47) Y. Wan, K. A. M. Creber, B. Peppley, V. T. Bu, Structure and ionic conductivity of a series of di-o-buterylchitosan membranes. *J. Appl. Polym. Sci.* 94, 2309 - 2323. 2004.
- 48) Y. Wan, H. Wu, A. Yu, D. Wen, Biodegradable Polylactide/chitosan blend membranes. *Biomacromolecules*, 7, 1362-1372, 2006.
- 49) T. R. Kumar, N. Shanmugasundaram, M. Babu. Biocompatible collagen scaffolds from a human amniotic membrane: Physicochemical and in vitro culture characteristics. *J. Biomater. Sci. Polymer. Edn.* 14, 689 - 706, 2003.
- 50) L. Ma, C. Gao, Z. Mao, J. Zhou, J. Shen, X. Hu, C Han, Collagen /chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 4833 - 4841, 2003.

## 저작물 이용 허락서

학 과	치의생명공학과	학 번	20097369	과 정	석사
성 명	한글: 변 주 희    한문: 邊 珠 熙    영문: Byeon, Ju-Hee				
주 소	광주광역시 북구 풍향동 19-50				
연락처	010-4299-0437		E-mail	juhee9292@hanmail.net	
논문제목	한글 : 골유도 재생술을 위한 PLLA/키토산 차단막의 제조 및 특성 분석				
	영어 : Preparation and Characterization of PLLA/Chitosan membrane for Guided Bone Regeneration				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의( ○ )    반대(    )

2011 년 2 월 25 일

저작자: 변 주 희    (서명 또는 인)

**조선대학교 총장 귀하**