creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

치의학석사 학위논문

전자빔을 조사한 골형성 유도막의 표면 성상에 대한 연구

2013 년 2 월

서울대학교 치의학대학원

치의학과

송 나 래

전자빔을 조사한 골형성 유도막의 표면 성상에 대한 연구

지도교수 김 성 민

이 논문을 치의학 석사학위논문으로 제출함

2012 년 10 월

서울대학교 대학원

치의학과

송 나 래

송나래의 석사학위논문을 인준함

2013 년 1 월

위 원 장 이 종 호 (인)

부 위 원 장 김 성 민 (인)

위 원 명 훈 (인)

학위논문 원문제공 서비스에 대한 동의서

본인의 학위논문에 대하여 서울대학교가 아래와 같이 학위논문 저작물을 제공하는 것에 동의합니다.

1. 동의사항
   ① 본인의 논문을 보존이나 인터넷 등을 통한 온라인 서비스 목적으로 복제할 경우 저작물의 내용을 변경하지 않는 범위 내에서의 복제를 허용합니다.
   ② 본인의 논문을 디지털화하여 인터넷 등 정보통신망을 통한 논문의 일부 또는 전부의 복제.배포 및 전송 시 무료로 제공하는 것에 동의합니다.

2. 개인(저작자)의 의무
   본 논문의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락하는 등 동의 내용을 변경하고자 할 때는 소속대학(원)에 공개의 유보 또는 해지를 즉시 통보하겠습니다.

3. 서울대학교의 의무
   ① 서울대학교는 본 논문을 외부에 제공할 경우 저작권 보호장치(DRM)를 사용하여야 합니다.
   ② 서울대학교는 본 논문에 대한 공개의 유보나 해지 신청 시 즉시 처리해야 합니다.

논문제목 : 전자빔을 조사한 골형성 유도막의 표면 성상에 대한 연구

학위구분 : **석사 ■.박사 □**
학　　과 : 치의학과
학　　번 : 2009-22692
연 락 처 :
저 작 자 : 송 나 래 (인)

제 출 일 : 2013 년 2 월　일

서울대학교총장 귀하

국문초록

미더덕 (Styela clava)은 일반적으로 non-native tunicate 또는 sea squirt 등으로 불리며 국내에서 전연안에서 서식하고 있다. 저자 등은 지난 수년간 고비용의 생체 멤브레인을 대체할 수 있는 저렴한 유도막을 개발하기 위해 미더덕의 피부 각질에서 순도가 높은 셀룰로오스막의 제조 공정을 개발한 바 있다. 기존에 개발된 셀룰로오스 유도막에 높은 투과에너지를 지니는 전자빔 조사를 통하여 보다 나은 체내 친화성을 지니는 유도막을 개발하기 위해 본 연구를 진행하였다.

기존 개발된 미더덕 유래 셀룰로오스막에 한국 원자력 연구소에서 전자빔 (power 100 kW, pressure 115 kPa, temperature −30~120 ℃, sensor sensitivity 0.1~1.2 mV/kPa, generating power sensitivity 44.75 mV/kPa, supply voltage 5±0.25 V)을 조사하였다. 전자빔 세기는 1 MeV, 2 MeV의 두 조건으로 하였고, 전류량을 0.12 mA, 0.24 mA의 두 조건으로 나누었으며 조사량의 에너지는 1, 10, 30 및 120 kGy로 하여 서로 다른 Scan Speed(mm/Rev)를 부여하였다. 전자빔 조사 전후의 변화를 관찰하기 위하여 셀룰로오스 유도막의 원소 분석, 전계방출 주사전자현미경 검사, 아미노산 분석, 감쇠전반사 적외선분광기를 이용한 투과도 검사, 표면화학 검사, 주사전자현미경 분석 및 평균두께, 인상강도 및 신장률 등과 같은 일반 물성 검사를 시행하였다.

전자빔 조사 후 전자현미경 소견에서 셀룰로오스 섬유소들이 희미해지면서 그 기본적인 형태가 일부 유지되지 않은 소견이 관찰되었는데, 이러한 현상은 전자빔의 조사량에 따른 중합 분포 정도가 다른 탈중합 반응에 의한 것으로 생각된다. 또한 신장률에서 넓은 측정 범위를 보였는데,

전자빔 조사 후 다당류의 교차결합이 탈중합되면서 셀룰로오스 자체의 팽압력 (turgor pressure)이 감소하여 신장률이 다양해지고, 동시에 증가된 양상으로 측정된 것으로 사료된다.

셀룰로오스 섬유들은 이를 단단히 잡아주는 셀룰로오스 교차결합 단백질 (CCP, cellulose crosslinking protein)이 존재하는데, 전자빔 조사에 의해 셀룰로오스 섬유들을 단단히 잡아주는 역할이 소실되면서 단단한 셀룰로오스 유도막의 성상이 보다 부드러워져서 신장력이 증가된 것으로 보인다. 또한, 친수성인 셀룰로오스 결합공간이 많아짐으로서 유도막이 주변의 친수성 세포들과 결합하여 주변 조직과의 생체적합성도 보다 우수해질 수 있으며, 이는 체내 적용 후, 셀룰로오스 유도막을 이차적으로 제거할 필요성을 줄임으로서 보다 생체친화적인 유도막으로의 개발이 가능하리라 사료된다.

셀룰로오스 유도막은 셀룰라제와 같은 분해효소 이외에는 알려져 있는 분해효소가 없으며 특정적인 베타 1-4 linkages의 구조를 지닌다. 이를 다양한 전자빔 에너지와 조사량으로 셀룰로오스 섬유소들을 균일하고 미세하게 배열시킴으로써 얇은 μm 단위의 의료용 유도막으로 개발하는 것이 가능하리라 사료된다.

주요어 : 미더덕, 교차결합단백질, 생체유도막, 전자빔, 골유도재생술

학 번 : 2009-22692

목 차

I.	서론	1
II.	재료 및 방법	4
III.	결과	8
IV.	고찰	12
V.	결론	15
	References	16
	Figure legends	20
	Figures	23
	Tables	30
	Abstract	31
	감사의 글	34

I. 서 론

골유도재생술 (guided bone regeneration, 이하 GBR)은 골표면에 밀착된 차단막으로 골결손부를 피복하여 결손부를 골세포 이외에서 유래되는 세포인 상피세포나 섬유아세포 (fibroblast)로부터 격리한다. 이는 골면과 차단막 사이에 골을 재생하기 위한 공간을 확보함으로써 골재생을 도모하는 술식으로 이때 사용하는 차단막을 차폐막 (barrier membrane), 멤브레인 및 유도막 (이하 유도막)이라 부른다. 이러한 골유도재생술은 자연치아의 치주조직인 백악질 (cementum), 치주인대 (periodontal ligament), 치조골 (alveolar bone) 및 치은 조직을 재생시키기 위한 조직유도재생술 (guided tissue regeneration, 이하 GTR)의 원리를 이용하여 개발된 것으로 유도막을 적용하여 주변조직의 침투를 차단하여 배제시키고 혈병을 안정화하여 골재생을 유도하는 방법을 총칭한다.[1-3]

저자 등은 지난 수년간 고비용의 생체 멤브레인을 대체할 수 있는 저렴한 유도막을 개발하기 위해 미더덕의 피부 각질에서 순도가 높은 셀룰로오스막의 제조공정을 개발한 바 있고, 기본적인 성분 검사 및 구조적인 분석을 통해 미더덕 유래 셀롤로오스막이 창상치유 효과를 가지면서 골막의 재생 및 여러 체내 골재생에 필요한 유도막의 기능을 지니고 있음을 보고한 바 있다.[4,5] 셀룰로오스는 식물 세포벽의 주된 구성성분으로 셀룰로오스 분자의 약 80개의 선형사슬이 모여 생물체 내의 기능적 단위체인 셀룰로오스 미세섬유 (cellulose microfibril)를 형성한다. 이러한 셀룰로오스 미세섬유는 세포벽의 견고함과 구조적인 성향을 부여하는 경직된 구조로 섬유내 인접한 글루칸의 비공유결합으로

안정적이면서 체내 분해가 되지 않는 특징을 지닌다. 셀룰로오스를 분해할 수 있는 생물체는 많지 않은데, 대표적으로 달팽이나 특정 균류 혹은 원핵생물의 일부만이 셀룰로오스를 분해할 수 있는 셀룰라아제 (cellulase)를 생성할 수 있고, 사람은 셀룰로오스를 분해할 수 있는 능력이 없기 때문에 본 연구진이 개발해온 미더덕 유래 셀롤로오스 유도막의 경우 체내에서 흡수되지 않는 비흡수성 유도막으로서 대부분 2차 수술에 의해 제거해야 하는 단점이 있다.

방사선 조사는 의료용 소재개발에 있어서 매우 유용함에도 불구하고 일반 대중에게는 위험한 물질로 인식되고 있다. 저자 등이 수년 전부터 연구해 온 전자빔 조사는 비록 방사선 조사에 국한될 수 있으나 시설장비의 안전한 구축을 통해 현재 국내에서도 3-5 곳의 국가지정 또는 사설 운용되는 곳이 소개될 정도로 최근에 많은 관심을 가지고 있는 방사선 관련 기술사업으로 부각되고 있다. 톰슨의 음극선 실험에서부터 알려진 전자빔 (electron beam)은 진공관 속에서 양극과 음극을 양쪽에 동시에 걸어주면 음극의 금속판에서 전자가 튀어 나오는 것으로 알려져 있다. 일반적인 예로 텔레비전 브라운관의 원리를 생각할 수 있는데 진공 속에서 강한 전기장이 걸리면 금속판에서 쉽게 전자를 방출하여 튀어나온 전자는 그대로 양극을 향해 달려가게 되어 이를 전자빔이라 부르게 된다. 의학용보다는 이공계 및 물리학적으로 보다 알려진 전자빔은 공학용 전자빔 가속기인 경우 대개 10 MeV에서 100 MeV의 높은 에너지를 이용함으로써 적외선, 자외선 등의 전자파 에너지에 비해 물체에 투과되는 높은 성질을 지닌다.[6,7] 높은 에너지로 가속된 전자빔은 흔히 알려져 있는 가시광선 또는 자외선과는 달리 중합 및 경화 반응에 필요한 광개시제 (photo initiator) 또는 광증감제

(photo sensitizer)가 필요하지 않고, 투과 깊이도 조사처리물의 평면 밀도에 해당하는 '밀도 × 두께'에 관계되어 조사 처리물의 투명도와는 무관한 것으로 알려져 있다.[8,9]

이에 본 연구에서는 기존에 개발된 셀룰로오스 유도막에 이러한 높은 투과에너지를 지니는 전자빔 조사를 통하여 체내에서 일부 흡수되거나 또는 제거가 필요하지 않은 정도의 보다 나은 체내 친화성을 지니는 유도막을 개발하기 위해 본 연구를 진행하였으며, 변화된 성상을 여러 분석 방법을 통해 분석하였다.

II. 재료 및 방법

본 연구진이 제작한 미더덕 유래 셀룰로오스막은 기존의 보고와 같이 11일을 전후하여 모두 16단계의 과정으로 제작하였다.[5] 대전에 소재한 한국원자력연구원에서 전자빔 조사를 모두 서로 다른 16 가지 조건으로 시행하였다 (Fig 1). 전자빔 세기는 1 MeV, 2 MeV의 두 조건으로 하였고, 전류량을 0.12 mA, 0.24 mA의 두 조건으로 나누었으며 조사량의 에너지는 1, 10, 30 및 120 kGy로 하여 서로 다른 Scan Speed (mm/Rev)를 부여하였다[9] (Table 1).

전자빔 조사 전후의 변화를 관찰하기 위하여 셀룰로오스 유도막의 원소 분석, 전계방출 주사전자현미경 검사, 아미노산 분석, 감쇠전반사 적외선분광기를 이용한 투과도 검사, 표면화학 검사, 주사전자현미경 분석 및 평균두께, 인상강도 및 신장률 등과 같은 일반 물성 검사를 시행하였다.

원소 분석 (Elementary analysis)

원소 분석기와 전계방출 주사전자현미경 (FE-SEM, Field Emission Scanning Electron Microscope)을 이용하였으며 원소 분석기 (EA 1110®, CE instruments Co.)를 이용한 원소 분석은 고체화 또는 액체화된 유기물과 무기물로 합성된 화합물이 포함하고 있는 C, H, N, O, S의 양을 조사하는 것으로 시료를 1,000 ℃ 정도의 고온에서 연소하여 각종 원료를 함유한 가스로 분해하고 이들 가스의 열전도를 측정하여 C, H, N, O 및 S 원소의 정성 및 정량 분석을 시행하였다.

분석 조건은 0.01-100 %의 measuring range를 가지며 maximum working temperature 1,100 ℃, oven temperature 50-190 ℃이고, TCD detector를 사용하였다.

전계방출 주사전자현미경 (S-4200®, Hitachi Co.)은 고온에 의해 전자가 방출되는 기존의 SEM과는 달리 cold field emission이므로 고분자와 같이 열에 약한 시료의 표면 형태나 topology의 관찰, 나노 크기 입자의 관찰 및 파괴단면의 형태 관찰에 유용한 검사법[9]으로 시료 표면의 미세한 구조를 정성 및 정량적으로 분석하였다.

아미노산 분석 (Amino acid analysis)

서로 다른 에너지와 조사량으로 조사된 셀룰로오스 유도막의 순도를 파악하기 위해 아미노산 분석기 (L-8800 High speed amino acid analyzer®, Hitachi Co.)를 사용하여 각각의 유도막 1 g을 잘게 파편화하여 20 ml의 물에 넣고 10 기압, 120 ℃에서 30분간 끓여서 얻은 각각의 수용액을 원심분리하여 상층액을 이용하였다. 분석기에서는 단백질이나 펩타이드를 산 가수분해한 후 컬럼을 통과시켜 아미노산들을 분리하고, 고온의 reaction coil에서 유도체화합물과 반응시켜 유도체 아미노산을 만든 후, 검출기에서 흡광도를 측정하여 유지시간에 따른 흡광도의 차이를 분석하였다.

감쇠전반사 적외선분광기를 이용한 투과도 검사 (ATR-IR, Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy)

한국화학연구원의 Nicolet 5700FT-IR® 장비를 사용하였으며 45° Dia crystal에 의한 single bounce ATR로 측정 범위는 4000 ~ 400 cm^{-1} 였다. 참조할 각 관능기의 파장 범위 (group frequencies)로는 기존의 여러 보고 내용을 기준하여 Alkane C-H stretch (sp3) 2850 – 3000 cm^{-1}, Alkene C-H stretch (sp2) 3050 – 3150 cm^{-1} 및 Alkyne C-H stretch (sp) 3300 – 3320 cm^{-1} 였고, Alkanes -CH bending으로는 HCH scissoring 1440 – 1470 cm^{-1}, CH_3 rocking 1370 – 1380 cm^{-1} 및 CH_3 rocking 720 – 725 cm^{-1} 의 내용을 참조하였다.[9-11]

표면화학 분석 (ESCA, Electron Spectroscopy for Chemical Analysis)

유도막 표면의 원소 구성과 각 원소의 화학적 결합상태를 파악하기 위해 한국화학연구원 신뢰성평가센터의 monochromatic Al-Kα선을 광원으로 사용하는 XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy) 광전자분광기인 AXIS NOVA 장치를 이용하여 분석하였다.[9,12,13] ESCA 분석은 산소의 1s 전자의 결합에너지가 531 eV이고, 탄소의 1s 전자의 결합에너지는 284 eV의 결합에너지를 가지는 것을 이용하여 산소와 탄소의 내각 전자들의 결합에너지가 다르고 이들의 특징적인 결합 에너지를 측정함으로써 전자빔 조사에 의한 표면 성상이 변화하지 않았는지를 각 에너지와 조사량에 따라서 시행하였다.

주사전자현미경 분석 (SEM, Scanning Electron Microscopy)

각 유도막의 외면과 내면을 각각 구분하여 주사전자현미경 (Hitachi Co., Japan)으로 각 시편별로 × 5.0 k, × 20.0 k 및 × 50.0 k 의 배율로 관찰하여 사진 촬영하였다. 대부분 미세섬유소들이 잘 분포되어 있었으나 불순물들이 남아있거나 중첩되어 그리드가 만들어진 부분은 피하였으며, 최소 3회 이상 촬영하여 대표적인 사진만을 정리 비교하였다.

평균 두께, 인장강도 및 신장률 등의 물성 검사

전자빔 조사 전후의 물성 검사를 위해 모든 시편을 Instron 4482® 장비를 사용하여 속도 5 mm/min, 그립 간격은 20 mm, 그리고 full scale load range는 1 kgf와 같은 측정 조건으로 각각 3회씩 측정하여 이들의 평균치를 구하였다. 이때 기존에 제조한 셀룰로오스 유도막의 물성과 전자빔 조사후의 물성의 정확한 비교를 위해 소독된 전자빔 조사 시편을 기존에 보관하였던 시편과 같은 조건의 습도와 보존 조건으로 유지하였다.

III. 결 과

원소 분석 결과

미더덕 유래 셀룰로오스 유도막은 대부분 탄소와 수소 성분으로 이루어진 탄수화물 복합체 (polymer)로서 거의 대부분 β-셀룰로오스 당류 성분으로 이루어진 물질임은 기존에 보고한 내용과 같았다.[5] 전자빔 조사 후에도 셀룰로오스 유도막의 내면과 외면 모두에서 다른 특이한 중금속 성분은 관찰되지 않았으며 기본 원소 분석에서도 다른 변화는 관찰되지 않았다. 전계방출 주사전자현미경을 이용한 원소 분석에서는 원소분석기의 결과와 같이 주로 탄소와 산소 성분이 관찰되었으며 드물게 황 성분이나 칼륨 성분도 극소량 관찰되었다(Fig 2). 다른 중금속 성분 등은 관찰되지 않았으며, 이는 기존의 미더덕 유래 셀룰로오스 유도막에서의 분석 결과와 유사하였다.

아미노산 분석 결과

시편이 컬럼을 통과하면서 아미노산이 분리되도록 유기용매를 사용하여 4회 이상 분리하여 흡광도를 측정하였는데, 유지시간 (retention time)에 따라 Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Lys, 및 NH_3 등의 유리 아미노산이 차례대로 검출되었다. 에너지와 조사량에 따라 유의성 있게 일관된 결과는 나오지 않았으며, 또한, 전자빔 조사 전의 셀룰로오스 유도막의 아미노산 분석에서와 같이 유의할 만한 유리 아미노산의 성분 변화는 관찰되지 않았다(Fig 3).

감쇠전반사 적외선분광기를 이용한 투과도 검사 결과

ATR-IR 분석에서는 셀룰로오스막을 구성하는 특징적인 탄소와 산소의 결합 양식을 그대로 보여주었는데, 유기물 및 무기 합성물에 대해 C-O-C, C=O, $-NO_2$ -OH와 $-CH_3$ 결합 등의 관능기 구성이 Fig 4 와 같이 특징적인 스펙트럼 유형으로 확인되었다. 전자빔 조사에 의해 조사 에너지별로 조사량이 증가할수록 투과도는 조사하지 않은 대조군에 비해 점차 증가함을 볼 수 있었는데, 반면에 조사 에너지 및 전류량에 따른 차이점은 관찰되지 않았다. 셀룰로오스의 특징적인 스펙트럼은 기존의 적외선분광 스펙트럼 결과[5]와 거의 유사하였으며 -OH vibration 인 3366.8 cm^{-1}와 $-CH_3$ vibration 인 1368.8 cm^{-1} 에서 각각 -OH와 $-CH_3$ 기의 특징적인 흡수밴드 (absorption bands)가 관찰되었다. 또한, C-O-C bridge의 anti-symmetric stretching에 의한 1157.4 cm^{-1}의 peak와 C-O stretching에 의한 1059.6 cm^{-1}와 1024.6 cm^{-1}의 peak를 보이는 일관적인 형태는 셀룰로오스 유도막의 기본적인 당 (saccharide) 구조의 스펙트럼과 유사하였다.[14,15]

표면화학 검사 결과

셀룰로오스 유도막 표면의 ESCA survey 분석 스펙트럼에서는 주성분인 탄소와 산소의 구성이 대부분이었으며, C1s와 O1s의 각각 특징적인 peak가 전자빔 조사가 이루어지기 전의 모델에서도 관찰할 수 있었다(Fig5). 즉, C1s 고분해능 분석에서 282.1 eV의 피크는 hydrocarbon 결합인 -C-C, -C-H 결합을 의미하고, 283.8 eV의 피크는 hydroxyl carbon 결합인 C-OH 결합을, 285.2 eV의 피크는 ether carbon인 -C-O-C 결합을, 286.8 eV의 피크는 carbonyl

carbon인 −C=O 결합 및 ester carbon인 O−C=O 결합을 보여주었다. 또한, O1s 고분해능 분석에서는 hydroxyl oxygen (C−OH), ether oxygens (C−O−C) 및 ester oxygen (−COO−) 결합에 대한 피크가 각각 구분되어 관찰되었다.[14−16]

이는 전자빔을 조사한 셀룰로오스 유도막이 보다 큰 친수성을 보이고 동시에 전자빔에 의한 셀룰로오스 섬유소들이 잘려지는 절단화 (scissioning) 현상이 C−C 결합보다는 C−O 결합에서 많았던 것으로 사료되었다. 한편, 여러 전자빔 조사 조건에 따른 셀룰로오스 유도막의 외면과 내면에 대한 ESCA 분석 결과는 차이가 없었으며, ESCA 분석이 광전효과에 의한 분석 원리임을 고려하면 μm 두께를 갖는 셀룰로오스 유도막의 극표면 간 화학적 구성에는 큰 차이가 없는 것으로 사료되었다.

주사전자현미경 분석 결과

기존 보고와 같이 미더덕 유래 셀룰로오스 유도막은 거칠고 단단하게 뭉쳐진 셀룰로오스 섬유소들의 돌출과 함입 구조가 관찰되는 외면과 상대적으로 미세하고 얇은 섬유성 구조를 이루는 내면으로 이루어져 있었다.[5] 전자빔 조사 후 전자현미경 소견에서는 같은 에너지의 전자빔에서 조사량이 증가할수록 셀룰로오스 유도막의 내면과 외면의 형태가 비슷해지는 특징적인 양상을 보였으며, 동시에 셀룰로오스 섬유소들이 희미해지면서 그 기본적인 형태가 일부 유지되지 않은 소견이 관찰되었다. 이는 1 MeV 또는 2 MeV의 에너지 모두에서 유사하였으며 조사량에 비례하여 희미해지는 구조가 전반적으로 관찰되었다 (Fig 6−8).

이러한 현상은 전자빔의 조사량에 따른 중합 분포 정도가 다른

탈중합 반응에 의한 것으로 생각되며, 조사량이 증가할수록 중합 정도가 감소하는 것을 설명하는 미세형태적 관찰 결과로 사료된다. 이는 기존 목재에서 기원한 셀룰로오스가 서로 다른 정도로 흡수하는 에너지만큼 분해되는 정도가 다르고, 이중 전자빔의 에너지를 4.5 MeV 및 10 MeV로 높게 주고 조사량을 균일하게 하였을 때 목재 기원 셀룰로오스의 중합화 분포는 조사 에너지가 낮을수록 셀룰로오스에 주는 영향인 위해 (damage) 현상이 증가된 것을 여러 보고에서도 비슷하게 설명하였다.[17,18]

평균 두께, 인장강도 및 신장률 결과

기존의 셀룰로오스 유도막 시료의 두께는 0.0231 ± 0.0012 mm, 평균 인장강도는 1.13 ± 0.069 kgf/mm^2 및 신장률 (%)은 12.43 ± 0.605 % 였으며, 전자빔 조사 후에는 각각 0.0046 – 0.044 mm의 두께, 0.52 – 2.84 kgf/mm^{2}의 인장강도 및 4.05 – 19.27 %의 신장률을 보였다. 특히, 신장률에서 넓은 측정 범위를 보였는데, 이는 비록 통계적 유의성은 없었으나 전자빔 조사 후 다당류의 교차결합이 탈중합되면서 셀룰로오스 자체의 팽압력 (turgor pressure)이 감소하여 신장률이 다양해지고, 동시에 증가된 양상으로 측정된 것으로 사료된다(Table2).

IV. 고 찰

여러 전자파의 종류를 에너지 (eV) 크기에 따라 분류하면 0.01 – 0.1 eV의 적외선 (IR, Infrared), 1.5 – 3.0 eV의 가시광선, 3.0 – 12.5 eV의 자외선 (UV, Ultraviolet), – 10^4 eV의 X-선, – 10^6 eV의 γ선 및 10^5 – 10^7 eV의 전자빔으로 나눌 수 있다. 전자빔 가속기가 상용화되기 전에는 γ선에 의한 연구가 광범위하게 진행되어 왔다. γ선은 불안정한 원자핵에서 나오는 전자파의 일종으로 파장이 매우 짧고 높은 에너지를 가지는 전자파의 일종이며, 그 자체는 전리작용을 일으키지 않으나 높은 투과력을 지녀서 간접적인 전리 작용으로 식품의 살균 등에 활용되어 왔다.[19] 또한, γ선은 높은 에너지를 가지므로 투과력이 크고 납과 같이 높은 밀도의 물질로 차폐시킬 수 있으며, 이러한 γ선은 고에너지 전자빔과 거의 동일한 반응 메카니즘에 의해 여러 물질을 변환시킬 수 있어서 그 응용분야가 거의 같으나, 상대적으로 흡수선량 속도 (dose rate)에 있어서 고에너지 전자빔에 비해 1/1,000 단위이기 때문에 장시간의 조사가 요구되는 단점이 있다.[20]

이미 기존 식물성 셀룰로오스에서 모식화되어 설명되고 있는 셀룰로오스 섬유들은 이를 단단히 잡아주는 셀룰로오스 교차결합 단백질이 존재하며, 이러한 단백질은 각각의 친수성 및 소수성의 셀룰로오스 결합공간 (cellulose binding domain)을 지니게 된다(Fig 9). 소수성의 결합공간은 각각의 셀룰로오스 미세섬유들에 붙게 되고 반대편인 친수성의 결합공간은 이들을 연결하는 셀룰로오스 교차결합 단백질에 의해 서로 연결되어 셀룰로오스 유도막 전체의 구조와 성상을

유지하게 된다.[21,22] 전자빔 조사에 의해서 기존의 교차결합된 고분자는 서로의 셀룰로오스 결합공간을 놓치고 잃음으로서 셀룰로오스 섬유들을 단단히 잡아주는 역할을 소실하게 되며, 이러한 단백질에 작용하여 서로간의 긴밀한 미세섬유들을 흩뜨림으로서 단단한 셀룰로오스 유도막의 성상이 보다 부드러워져서 신장력도 증가된 것으로 사료된다. 또한, 친수성인 셀룰로오스 결합공간이 많아짐으로서 유도막이 보다 주변의 친수성 세포들과 결합하여 주변 조직과의 생체적합성도 보다 우수해질 수 있으며, 이는 체내 적용 후, 셀룰로오스 유도막을 이차적으로 제거할 필요성을 줄임으로서 보다 생체친화적인 유도막으로의 개발이 가능하리라 사료된다.

셀룰로오스 섬유들은 다른 다당류 및 구조단백질과 서로 얽혀 있는 구조를 지녀서 Fig 10과 같은 리그닌 (lignin) 그물구조가 복잡하게 결합시키는 복잡한 구조를 형성하는데 이렇게 결합시키는 구조가 세포외기질 내에 저장되어 좀더 견고한 성질과 방수성을 부여하는 것으로 알려져 있다.

셀룰로오스는 혈장막에 묻혀있는 셀룰로오스 합성복합체 (cellulose synthase complex)에 의해 합성되는데, 이러한 방식은 세포의 외부표면에서 합성되는 여러 세포외기질의 거대분자가 합성되는 방식과는 다르게 합성된다.[21,23] 셀룰로오스 합성복합체는 Fig 11과 같이 세포내에서 만들어져서 세포외로 배출 (exocytosis)되지 않고 막을 가로질러 단당류를 운반하여 성장하는 중합체에 첨가되어 생기는 한 묶음의 중합체 사슬로 셀룰로오스 미세원섬유를 형성하게 된다. 이처럼 셀룰로오스 합성복합체는 혈장막으로 이동하여 새로운 중합체를 합성하고 기존에 합성 배열된 셀룰로오스 미세원섬유를 이어나가게

됨으로써 계속적으로 새로 형성된 세포외 셀룰로오스 미세원섬유들이 세포내 미세소관의 배열에 의해 결정되게 된다. 즉, 셀룰로오스 미세섬유들은 서로 다른 다당류 및 구조단백질과 복잡하게 얽혀 있는 구조[20]를 지니며 세포외기질 내에 저장되어 견고한 성상과 방수성을 지니게 된다. 혈장막 외부에 인장강도를 유지하는 셀룰로오스 원섬유들이 촘촘히 분포하고, 흰색의 리그닌과 같은 다당류 단백질과 진한색의 교차결합 단백질은 이들 원섬유들을 붙잡아주면서 이들 사이의 공간을 채워주며 압축에 대한 저항성을 지니게 한다(Fig 10).

이러한 셀룰로오스 유도막에 서로 다른 조건의 전자빔 조사는 미세소관을 구성하는 셀룰로오스 미세원섬유들의 탈중합 과정을 일으키게 되고, 셀룰로오스 합성복합체의 이동을 가져온 것으로 사료된다. 즉, 전자빔 조사로 미세소관의 배열도 일부 변화하여 셀룰로오스 미세섬유들과 합성 복합체가 혈장막 내에서 서로 움직임으로써 전자빔 조사에 의한 투석 및 여과용으로 셀룰로오스막을 사용하는 것도 가능하리라 사료되며, 이는 전자빔 조사에 의해 친수성인 셀룰로오스 유도막의 내면의 성상이 그대로 유지되는 것으로 생각할 수 있다.

셀룰로오스 유도막은 셀룰라제와 같은 분해효소 이외에는 알려져 있는 분해효소가 없으며 특정적인 베타 1-4 linkages의 구조를 지닌다. 이를 다양한 전자빔 에너지와 조사량으로 셀룰로오스 섬유소들을 균일하고 미세하게 배열시킴으로써 얇은 μm 단위의 의료용 유도막으로 개발하는 것이 가능하리라 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 기존에 개발한 미더덕 유래 셀룰로오스 유도막에 1-2 MeV 에너지의 전자빔을 서로 다른 조사량으로 조사함으로써 셀룰로오스 미세원섬유들을 유지하는 교차단백질과 혈장막 위의 셀룰로오스 합성복합체의 성상에 영향을 주어 보다 미세하고 신장력이 우수한 전자빔 조사의 효과를 확인하기 위한 기본적인 성분 검사 및 구조적인 분석을 시행하였다.

치과 및 의과용 의료소재로써 다양한 골결손 질환이나 치조골 재생 및 재건을 위한 골재생 유도막의 수요가 많은데, 현재까지의 유도막 공급은 대부분 외국 제품에 의존하고 있으며, 국내 제품의 연구 개발은 매우 미진한 상태였다. 이에 본 연구 결과를 바탕으로 동물에서의 체내 이식과 전임상적인 연구를 통해 기존의 수입제품보다 우수한 생활성을 지니는 제품, 그리고 2차 수술이 필요 없는 생체 친화성을 지닌 유도막의 가능성을 확인하였기에 향후 다양한 의료소재로 활용하기 위한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

1. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. Plast Reconstr Surg 1988; 81(5): 672-6.
2. Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. Int J Oral Maxillofac Implants 1989; 4(1): 19-25.
3. Kim SM, Seo BM, Hwang SJ, Lee JH, Choung PH, Lee SK. Clinical application and development of guided bone regenerative membrane research. Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2008; 5(4): 959-73.
4. Kim SM, Lee JH, Jo JA, Lee SC, Lee SK. Development of a bioactive cellulose membrane from sea squirt skin for bone regeneration-a preliminary research. J Kor Oral Maxillofac Surg 2005; 31(5): 440-53.
5. Kim SM, Eo MY, Park JM, Myoung H, Lee JH, Park YI et al. Basic structure and composition analysis of sea squirt originated cellulose membrane. Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2010; 7(2): 191-201.
6. Takahashi S, Sugimoto M, Kotoura Y, Sasai K, Oka M, Yamamuro T. Long-term changes in the haversian systems following high-dose irradiation: an ultrastructural and quantitative

histomorphological study. J Bone Joint Surg Am 1994; 76(5): 22-38.

7. Fray ME, Bartkowiak A, Prowans P, Slonecki J. Physical and mechanical behavior of electron beam irradiated and ethylene oxide sterilized multiblock polyester. J Mater Sci Mater Med 2000; 11(11): 757-62.
8. Ponader S, Vairaktaris E, Heinl P, Wilmowsky CV, Rottmair A, Korner C et al. Effects of topographical surface modifications of electron beam melted Ti-6Al-4V titanium on human fetal osteoblasts. J Biomed Mater Res A 2008; 84(4): 1111-9.
9. Kim SM, Eo MY, Kang JY, Myoung H, Choi EK, Lee SK et al. Bony regeneration effect of electron-beam irradiated hydroxyapatite and tricalcium phosphate mixtures with 7 to 3 ratio in the calvarial defect model of a rat. Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2012; 9(0): 24-32.
10. Rinne KT, Boettger T, Loader NJ, Robertson I, Switsur VR, Waterhouse JS. On the purification of α-cellulose from resinous wood for stable isotope (H, C and O) analysis. Chem Geol 2005; 222(1-2): 75-82.
11. Yuan J, Zhang J, Zang X, Shen J, Lin S. Improvement of blood compatibility on cellulose membrane surface by grafting betaines. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2003; 30(1-2): 147-55.

12. Clark DT. Synthesis, characterization, modification and degradation of polymer surfaces as revealed by ESCA (electron spectroscopy for chemical analysis). Pure & Appl Chem 1985; 57: 941.
13. Johansson LS, Campbell JM, Koljonen K, Stenius P. Evaluation of surface lignin on cellulose fibers with XPS. Applied Surface Science 1999; 144-5: 92-5.
14. Delmer DP. Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 1999; 50: 245-76.
15. Kimura S, Kondo T. Recent progress in cellulose biosynthesis. J Plant Res 2002; 115: 297-302.
16. Bora U, Sharma P, Kannan K, Nahar P. Photoreactive cellulose membrane-a novel matrix for covalent immobilization of biomolecules. J Biotechnol 2006; 126(2): 220-9.
17. Jiang B, Wu Z, Zhao H, Tang F, Lu J, Wei Q et al. Electron beam irradiation modification of collagen membrane. Biomaterials 2006; 27(1): 15-23.
18. Bouchard J, Methot M, Jordan B. The effects of ionizing radiation on the cellulose of woodfree paper. Cellulose 2006; 13: 601-10.
19. Henniges U, Okubayashi S, Rosenau T, Potthast A. Irradiation of cellulosic pulps: understanding its impact on cellulose oxidation. Macromolecules 2012; 13(12): 4171-8.

20. Mintier AM, Foley DM. Electron beam and gamma irradiation effectively reduce Listeria monocytogenes populations on chopped romaine lettuce. J Food Prot 2006; 69(3): 570-4.
21. Levy I, Shoseyov O. Cellulose-binding domains:biotechnological applications. Biotechnol Adv 2002; 20(3-4): 191-213.
22. Linder M, Teeri TT. The roles and function of cellulose-binding domains. J Biotechnol 1997; 57(1-3): 15-28.
23. Laguardia L, Vassallo E, Cappitelli F, Mesto E, Cremona A, Sorlini C et al. Investigation of the effects of plasma treatments on biodeteriorated ancient paper. Applied Surface Science 2005; 252(4): 1159-66.

Figure legends

Figure 1. Basic units of electron beam accelerator (A), target specimen holder including six units (B), and prepared cellulose membrane appearance after compressive packing with ethylene oxide gas sterilization.

Figure 2. FE-SEM findings of cellulose membrane under the 1MeV-0.12mA-120kGy (above) and 2MeV-0.12mA-120kGy (below) electron beam irradiation.

Figure 3. Amino acid analysis of cellulose membrane under the 1MeV-0.12mA-1kGy (A) and 1MeV-0.12mA-10kGy (B) electron beam irradiation, showing the detection intensity of Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Lys, and NH_3 according to the retention time.

Figure 4. ATR-IR spectra of cellulose membrane (upper, red), and electron beam irradiated cellulose membrane, from middle to bottom (green, blue and violet).

Figure 5. Survey spectrum of cellulose membrane, showing the characteristic binding energy of carbon (C1s) and oxygen (O1s) without differences between each electron beam irradiated group.

Figure 6. Inner surface of 1MeV–0.12mA–1kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (A), × 20.0 k (B), and × 50.0 k (C), and outer surface of 1MeV–0.12mA–1kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (D), × 20.0 k (E), and × 50.0 k (F). Inner surface of 1MeV–0.12mA–30kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (G), × 20.0 k (H), and × 50.0 k (I), and outer surface of 1MeV–0.12mA–30kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (J), × 20.0 k (K), and × 50.0 k (L). Inner surface of 1MeV–0.12mA–120kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (M), × 20.0 k (N), and × 50.0 k (O), and outer surface of 1MeV–0.12mA–120kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (P), × 20.0 k (Q), and × 50.0 k (R).

Figure 7. Inner surface of 1MeV–0.24mA–1kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (A), × 20.0 k (B), and × 50.0 k (C), and outer surface of 1MeV–0.24mA–1kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (D), × 20.0 k (E), and × 50.0 k (F). Inner surface of 1MeV–0.24mA–30kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (G), × 20.0 k (H), and × 50.0 k (I), and outer surface of 1MeV–0.24mA–30kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (J), × 20.0 k (K), and × 50.0 k (L). Inner surface of 1MeV–0.24mA–120kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (M), × 20.0 k (N), and × 50.0 k (O), and outer surface of 1MeV–0.24mA–120kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (P), × 20.0 k (Q), and × 50.0 k (R).

Figure 8. Inner surface of 2MeV–0.24mA–1kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (A), × 20.0 k (B), and × 50.0 k (C), and outer surface of 2MeV–0.24mA–1kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (D), × 20.0 k (E), and × 50.0 k (F). Inner surface of 2MeV–0.24mA–30kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (G), × 20.0 k (H), and × 50.0 k (I), and outer surface of 2MeV–0.24mA–30kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (J), × 20.0 k (K), and × 50.0 k (L). Inner surface of 2MeV–0.24mA–120kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (M), × 20.0 k (N), and × 50.0 k (O), and outer surface of 2MeV–0.24mA–120kGy irradiated cellulose membrane, × 5.0 k (P), × 20.0 k (Q), and × 50.0 k (R).

Figure 9. Schematic drawings of cellulose microfibrils showing cellulose cross-linking protein (CCP) and cellulose binding domain (CBD).

Figure 10. Schematic drawings of cellulose microfibril with lignin and cross-linking protein (CCP).

Figure 11. Schematic drawings of extracellular cellulose microfibril attached to the intracellular microtubule

Figures

Figure 1.

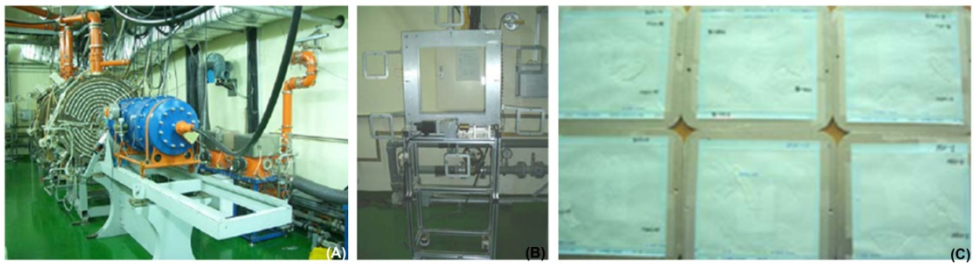
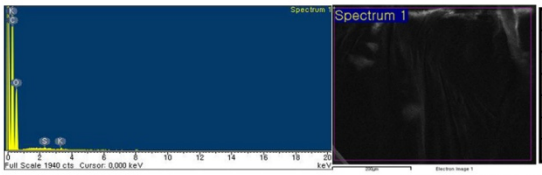
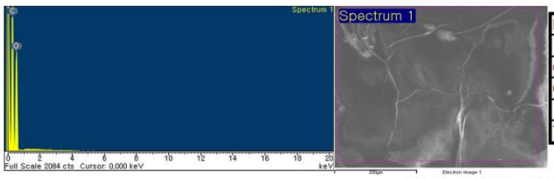


Figure 2.



Element	App Conc.	Intensity Corrn.	Weight%	Weight% Sigma	Atomic%
C K	212.32	1.2232	50.21	0.65	57.37
O K	107.21	0.6253	49.61	0.65	42.55
S K	0.61	0.9559	0.19	0.06	0.08
Totals			100.00		

1 MeV - 0.12 mA - 120KGy



Element	App Conc.	Intensity Corrn.	Weight%	Weight% Sigma	Atomic%
C K	236.19	1.214	47.07	0.56	54.23
O K	146.32	0.6688	52.93	0.56	45.77
Totals			100.00		

2 MeV - 0.12 mA - 120KGy

Figure 3.

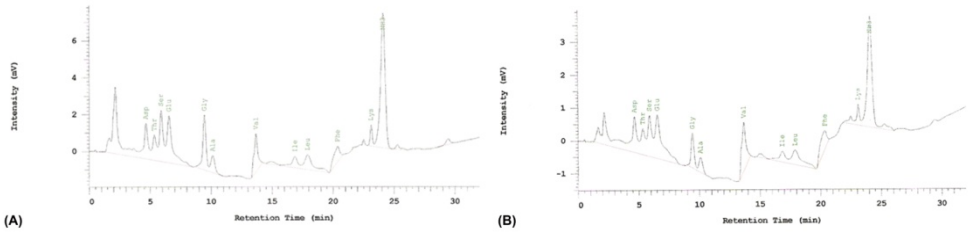


Figure 4.

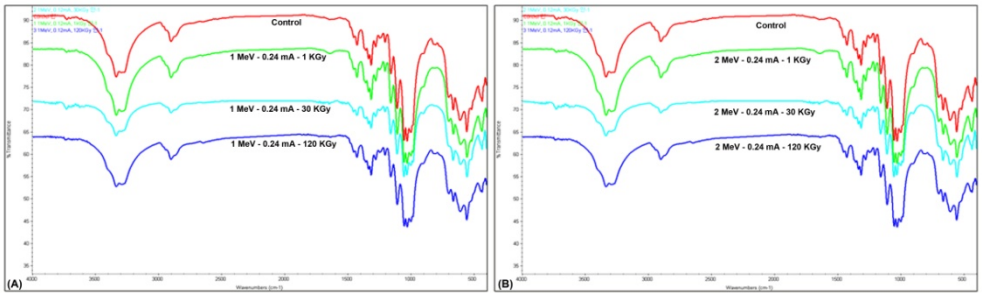


Figure 5.

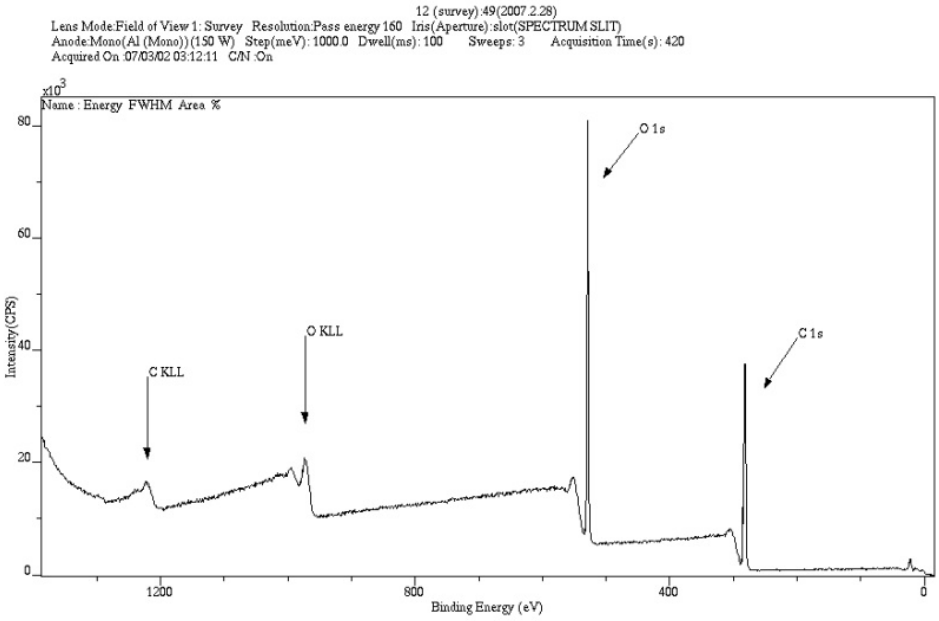


Figure 6.

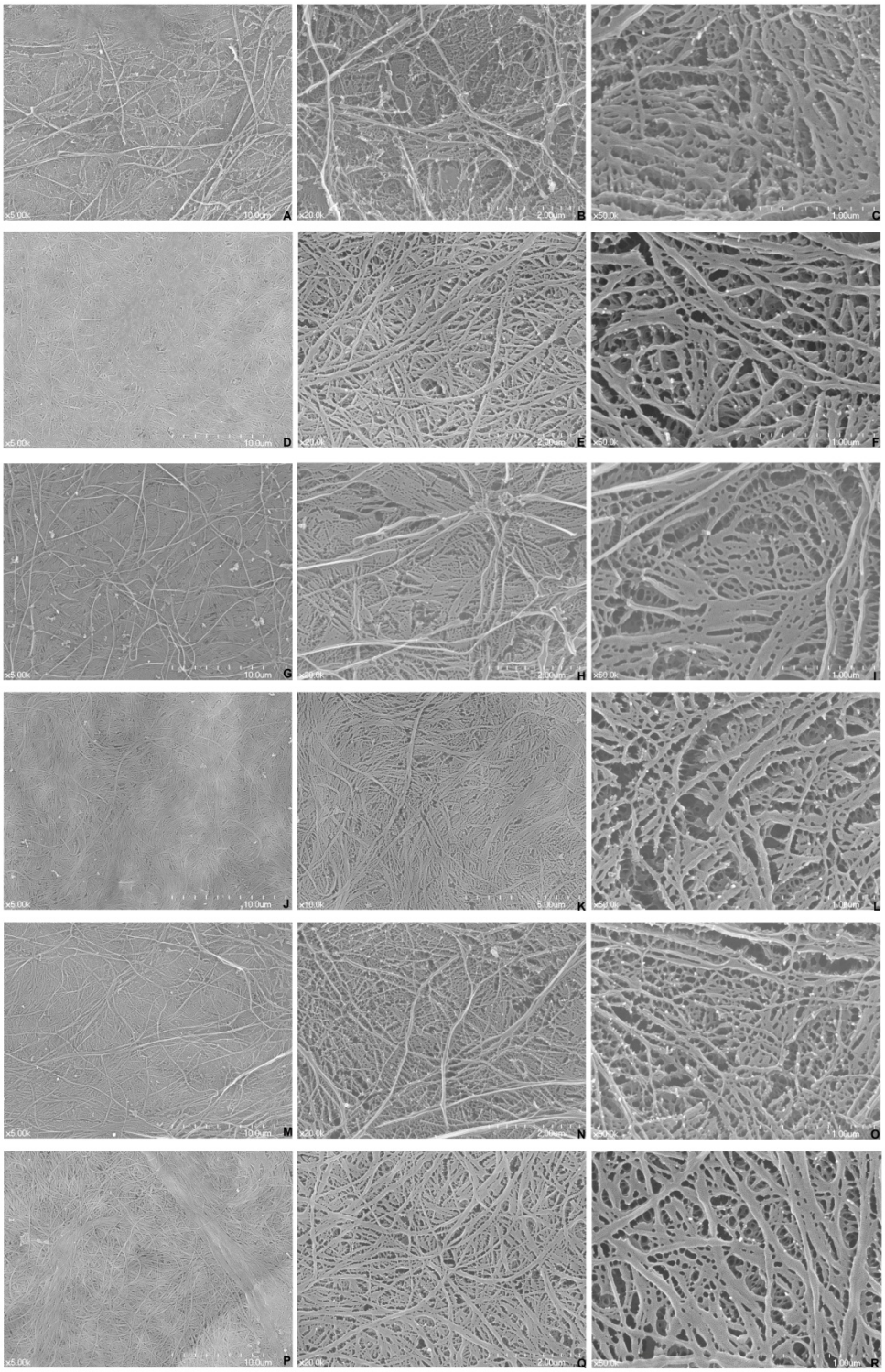


Figure 7.

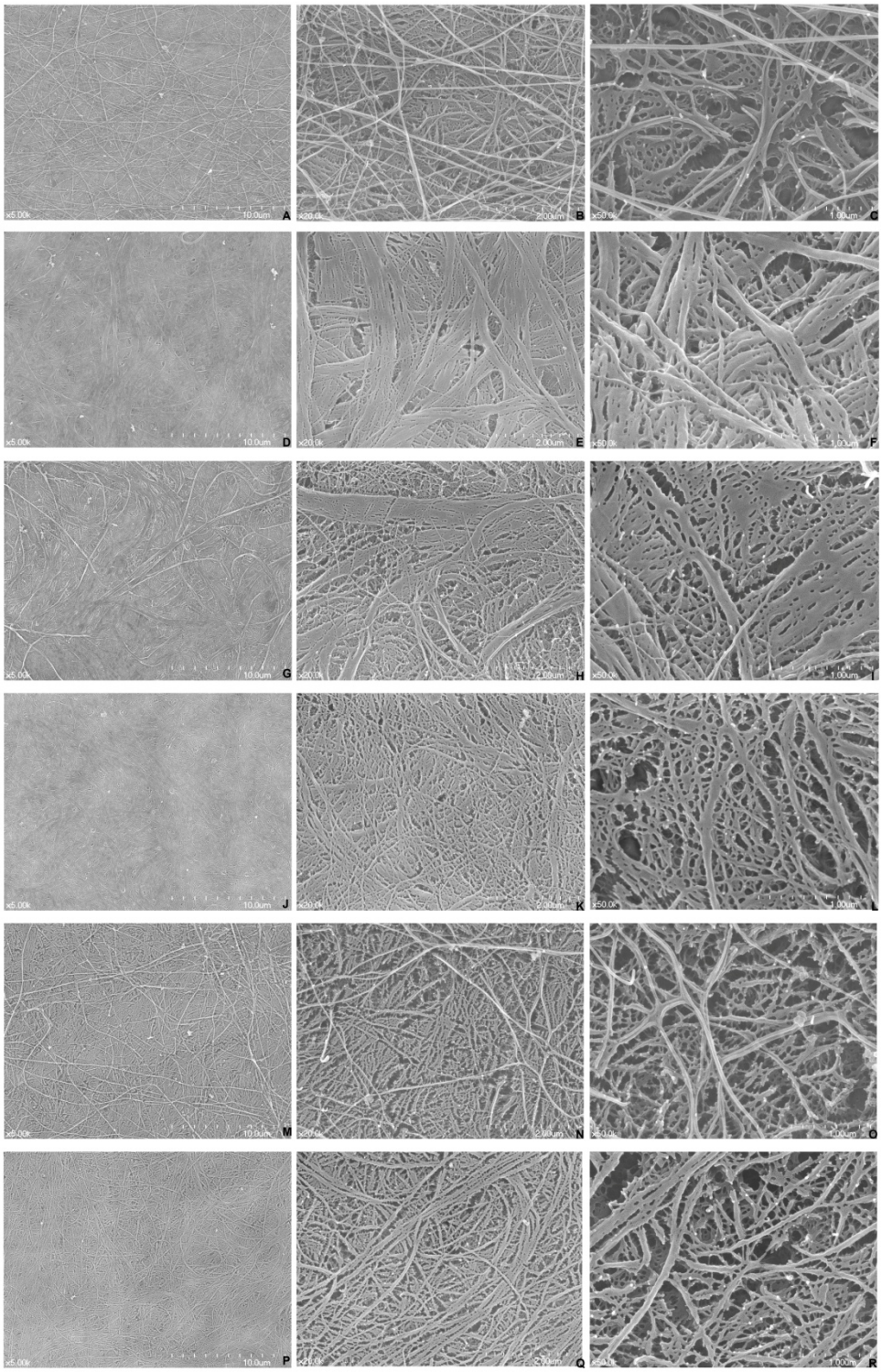


Figure 8.

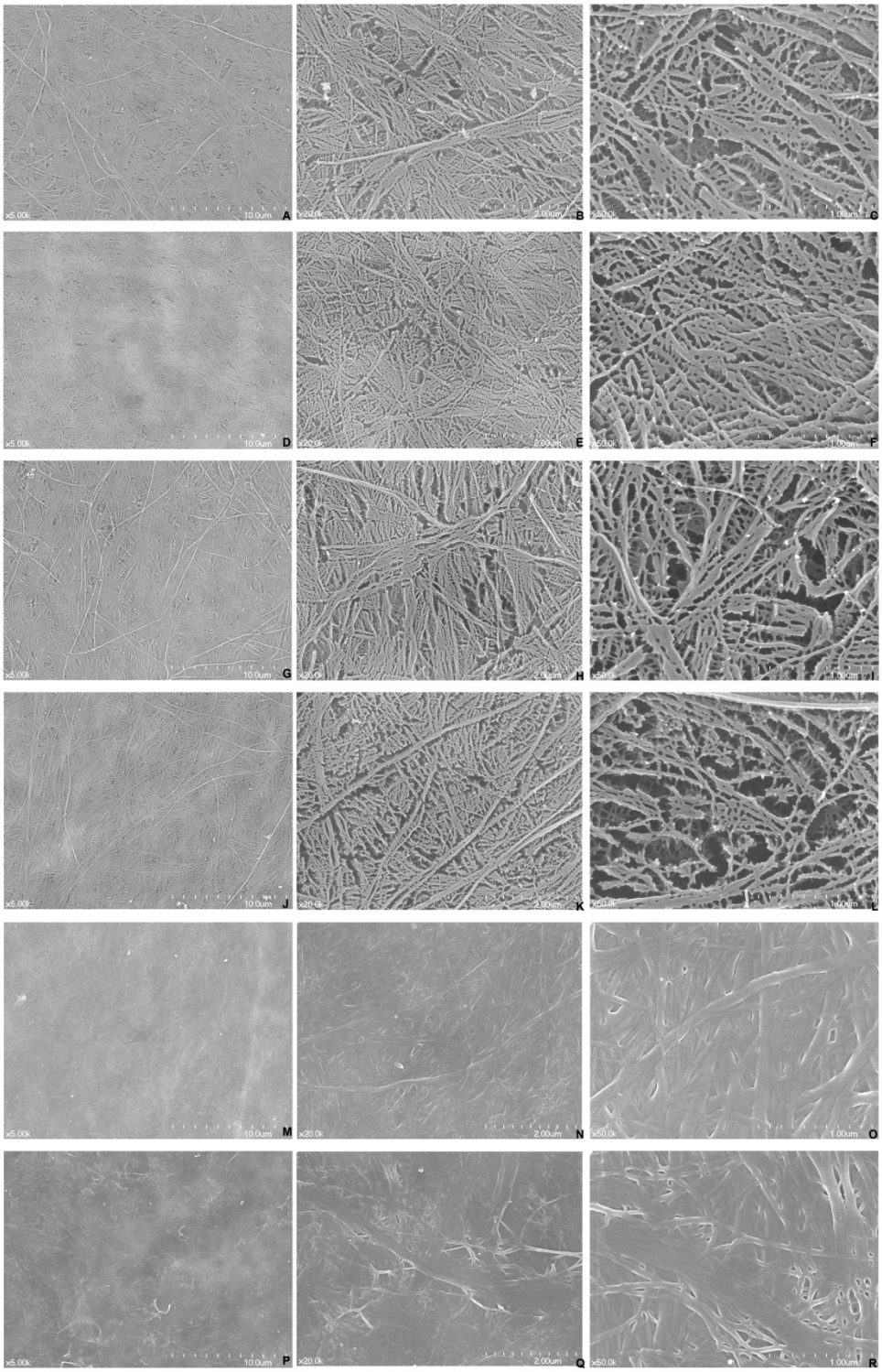

x5.00k 10.0um A
x20.0k 2.00um B
x50.0k 1.00um C
x5.00k 10.0um D
x20.0k 2.00um E
x50.0k 1.00um F
x5.00k 10.0um G
x20.0k 2.00um H
x50.0k 1.00um I
x5.00k 10.0um J
x20.0k 2.00um K
x50.0k 1.00um L
x5.00k 10.0um M
x20.0k 2.00um N
x50.0k 1.00um O
x5.00k 10.0um P
x20.0k 2.00um Q
x50.0k 1.00um R

Figure 9.

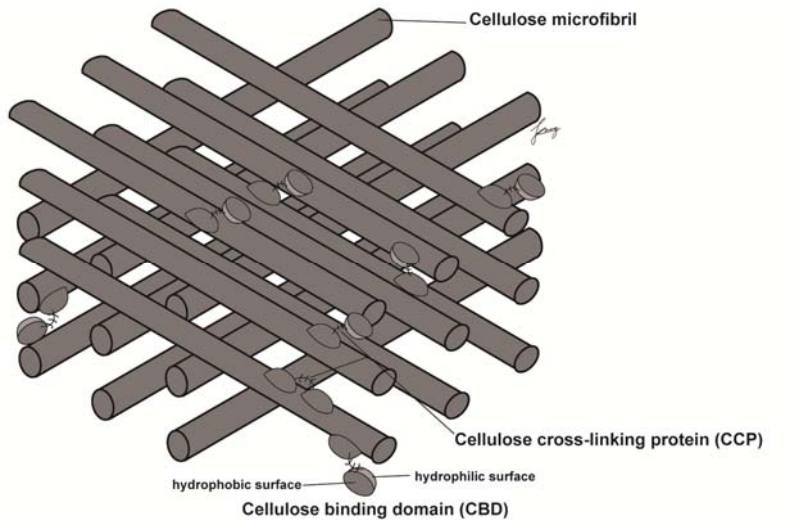


Figure 10.

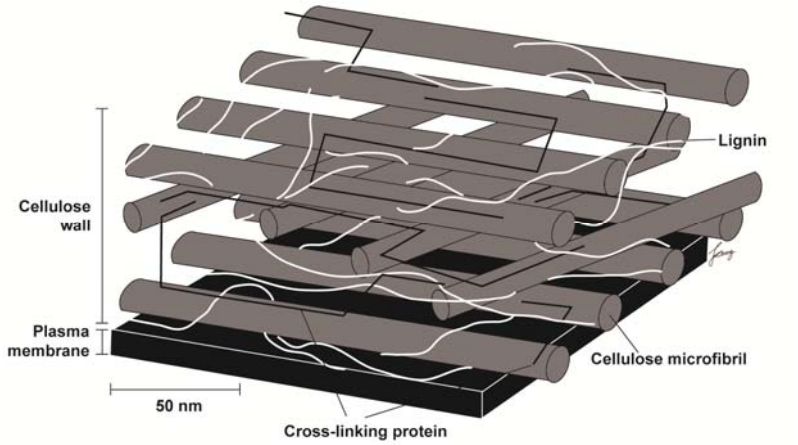
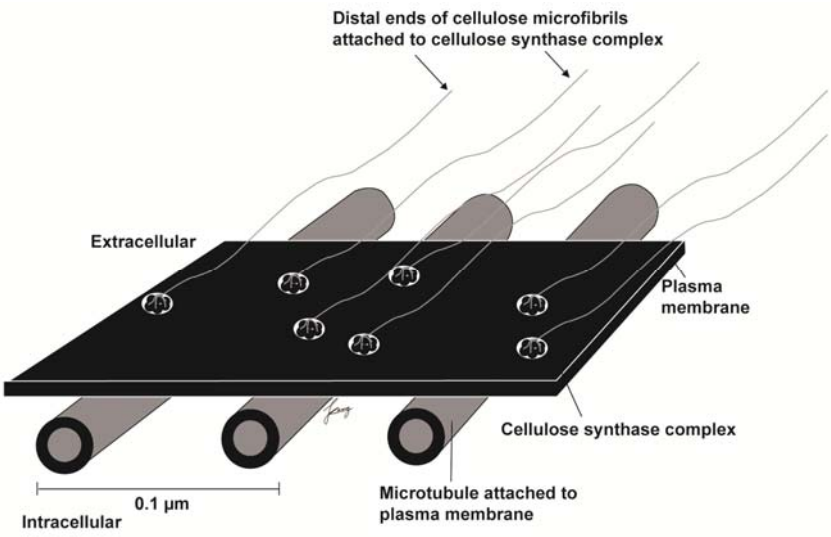


Figure 11.


Distal ends of cellulose microfibrils
attached to cellulose synthase complex
Extracellular
Plasma
membrane
Cellulose synthase complex
0.1 µm
Intracellular
Microtubule attached to
plasma membrane

Tables

Table 1. 한국원자력연구원에서의 전자빔 실측 조사선량

조사에너지		1 kGy	10 kGy	30 kGy	120 kGy
1 MeV	0.12 mA	8.8	15.2	27.3	OR*
	0.24 mA	8.8	14.9	27.5	64.4
	평균	8.8	15.1	27.4	OR
2 MeV	0.12 mA	3.2	12.4	23.7	55.2
	0.24 mA	3.1	12.7	23.3	54.4
	평균	3.2	12.6	23.5	54.8

* 알루미늄 플레이트 샘플 밑 바닥에 B3필름 부착하여 실측 선량을 측정하였으며 측정 가능 선량은 1.31 – 101.1 kGy이나 65 kGy이상은 측정 불가수치인 OR (over range)로 나옴.

Table 2. 셀룰로오스 유도막의 평균 두께, 인장강도 및 신장률

조사에너지		두께 (mm)	인장강도* (N/mm^2)	신장율* (%)
1 MeV (0.12 mA)	1 kGy	0.044	5.78	2.99
	10 kGy	0.025	3.62	5.08
	30 kGy	0.050	6.66	7.05
	120 kGy	0.023	0.52	4.05
2 MeV (0.12 mA)	1 kGy	0.034	5.98	19.27
	10 kGy	0.035	6.96	12.71
	30 kGy	0.021	7.55	18.40
	120 kGy	0.028	2.84	14.00

* ASTM D638-03, 시험속도 5 mm/min 임

Abstract

Basic characteristics of cellulose membrane after electron beam irradiation

Narae Song

Department of Dentistry

School of Dentistry

Seoul National University

Styela clava, called non-native tunicate or sea squirt, is habitat which include bays and harbors in Korea and several sites in the sea faced world. To make an advantageous bone regeneration membrane, we have developed cellulose membrane (CM) from this native sea squirt skin from several years ago. The aim of this study is to evaluate the effect and potential of electron beam (E-beam) irradiation treatment to this CM.

We used 1.0 MeV linear accelerator and 2.0 MeV superconductive linear accelerator (power 100 kW, pressure 115

kPa, temperature −30~120 ℃, sensor sensitivity 0.1~1.2 mV/kPa, generating power sensitivity 44.75 mV/kPa, supply voltage 5±0.25 V) with different irradiation dose such as 1, 10, 30, 120 kGy. Structural changes in this polysaccharide CM were studied *in vitro*, by elementary and amino acid analysis, elementary analysis using field emission scanning electron microscope (FE−SEM), electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA), attenuated total reflection infrared (ATR−IR) analysis and scanning electron microscopy (SEM).

Very small amounts of peptide fragment derived from this CM, such as CCP (cellulose crosslinking protein), which is a kind of anchoring protein composed of glycocalyx, could be lost its own structure. Scissioning of long carbohydrate polymers can be observed in SEM findings, and uniform turgor pressure to keep CM' s own directions can be changed to be elongated after E−beam irradiation. Arrangements of microtubules can also be changed indirectly, so cellulose and enzyme complexes were able to be migrated in the plasma membrane. Tensile strength of CM can be changed because any polysaccharides cross−link was able to lose their own resistance to compression.

E−beam treatment involves accelerating a beam of electrons to near the speed of light and by utilizing an oscillating magnetic field, sweeping the electrons back and forth across the CM. It can be thought to modify physical, chemical, molecular and biological

properties. CCP was lost after E-beam irradiation, and so strong cross-linking binding of each fibrils was detached each other. So the possibilities of clinical application of E-beam irradiated CM as the biodegradable or resorbable membrane in the bone regeneration field can be able to be suggested.

Keywords : Cellulose crosslinking protein (CCP), Cellulose membrane (CM), Electron beam irradiation (EBI), Guided bone regeneration (GBR), Surface characteristics

Student Number : 2009-22692

감사의 글

저의 20대를 돌아보면 끊임없이 삶의 방향과 진로에 대해 고민하고 방황했던 시간이었습니다. 오랜 고민 끝에 늦은 나이에 치의학이라는 새로운 분야에 도전했을 때는 불안한 마음도 많았지만, 졸업을 앞둔 지금 치의학대학원 4년의 시간이 제 인생에 그 어느 때보다도 값지고 행복한 시간이었음을 깨닫게 됩니다. 이 논문으로 그 동안의 소중한 시간들을 잘 마무리할 수 있게 되어 매우 기쁘게 생각하며, 도움을 주신 많은 분들에게 감사드립니다.

먼저 많이 부족한 저를 잘 이끌어주셔서 이 한편의 논문을 완성하게 해주신 지도교수 김성민 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 부드러운 카리스마로 늘 저를 긴장하게 하셨지만, 교수님의 엄한 가르침 덕분에 이 논문을 완성할 수 있었습니다. 또한 이 논문에 깊은 관심을 가지고 심사해 주신 이종호 교수님, 명훈 교수님께도 감사드립니다. 논문 양식 하나하나 봐주시고 조언해 주신 김현수 선생님, 크고 작은 일마다 도움을 주신 어미영 선생님, 논문의 오자와 표기를 꼼꼼하게 확인해주신 오진실 선생님, 논문의 표와 그림을 정리해 주신 강지영 선생님에게도 깊은 감사를 드립니다.

그 밖에 서로 격려하며 치대생활을 함께한 동기들과 특히 4년 동안 저의 단짝이자 기댈 곳이 되어준 지연언니에게도 고마운 마음을 전합니다. 많은 힘이 되어준 우리 가족들, 늘 기도로 지켜주시는 어머니, 물심양면으로 도와준 큰오빠, 작은오빠 내외에게도 감사드립니다. 그리고 하늘나

라에 계신 아버지, 막내딸이라고 늘 칭찬만 해주시고 넘치는 사랑을 주신 덕분에 긍정적이고 자신감 있게 살 수 있었어요. 많이 그립고 사랑합니다.

마지막으로 일일이 언급을 하지 못했지만 저를 아껴주시고 도움을 주신 모든 분들께 다시 한 번 감사 드리고, 항상 노력하고 발전하는 사람이 되겠습니다. 감사합니다.

2013 년 1 월

송나래 드림