

## 치주조직 재생용 플루르비프로펜 함유 키토산 비드의 제조 및 용출특성

이수진 · 박윤정 · 이승진<sup>†</sup> · 정종평\*

이화여자대학교 약학대학, \*서울대학교 치과대학 치주과  
(1996년 11월 7일 접수)

### Fabrication and Characterization of Flurbiprofen loaded Chitosan Beads for Periodontal Regeneration.

Su Jin Rhee, Yoon Jeong Park, Seung Jin Lee<sup>†</sup> and Chong Pyoung Chung\*

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Daehyun-Dong, Seodaemun-Ku,  
Seoul 120-750, Korea

\*Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University,  
Yongon-Dong, Chongno-Ku, Seoul 110-749, Korea

(Received November 7, 1996)

With the aim of improving periodontal regeneration efficacy, as a biodegradable local drug delivery device, drug releasing chitosan beads were prepared. Chitosan beads were prepared through the formation of intermolecular or intramolecular ionic interaction between chitosan and sodium tripolyphosphate and were loaded with flurbiprofen. The mean diameter of the beads was 250  $\mu\text{m}$ . Drug loading efficiency was improved by regulating the pH of tripolyphosphate solution. The drug release kinetics mainly depended upon the hydrophobic properties of the flurbiprofen, that is, the release of flurbiprofen showed initial burst with rapid release for the first day followed by a levelling off of the release rate. However, the release rate could be controlled by the formulation factor including the pH, concentration of the tripolyphosphate solution, gelation time, drug contents. From these results, flurbiprofen loaded chitosan beads were anticipated as biodegradable local drug delivery devices for periodontal regeneration.

**Keywords**—Periodontal regeneration, Chitosan bead, Controlled release, Flurbiprofen, Biodegradable local drug delivery

염증성 질환으로 손실된 치조골, 치주인대 등 치주조직의 재생은 치주질환 치료의 궁극적인 목표로서 오래전부터 활발하게 연구되어져 왔다. 치주조직의 재생에 있어서의 문제점은 손상부에서 결체조직이 급속히 발달하여 조직 재생력이 있는 연조직의 성장이 방해되는 것이다.<sup>1)</sup> 또한 치주질환에 의한 치주조직 손상시 치주질환은 억제되더라도 치주인대의 재생이 일어나지 않게 된다. 부분적으로 새로운 치조골이 생성된 경우에도 안정하게 존재하지 못하고 불규칙적으로 분해, 흡수되므로 일정기간 후의 조직 재생율은 매우 낮게 나타나게 된다. 이러한 배경에서 손상부를 주위 결체조직과 효과적으로 격리시킬 수 있는 손상부위 충전물

질의 개발이 긴요한 실정이다. 이러한 충전물질들이 가져야 할 조건으로는 1) 우수한 생체적합성, 2) 새로운 조직 성장을 위한 지지체기능 및 조직 형성 촉진능, 3) 사용의 용이성, 4) 병원균의 성장억제력, 5) clot에 대한 친화성, 6) 적용 방법에 따른 조형능, 7) 세포의 고정에 필요한 다공성, 8) 비면역원성, 9) 약물의 방출에 용이한 매트릭스로서의 기능성 등이다.<sup>2-6)</sup> 종래 치주조직 재생목적으로 이용되었던 충전물질로는 피층부골조직(cortical bone chip) 및 망상골 조직(cancellous bone)이 있다.<sup>7-10)</sup> 피층부골조직을 사용하는 경우 이들은 세포 접착력 및 입자끼리의 접착력이 부족한 반면 항원성이 적고 골형성 단백질(bone morphogenetic protein, BMP)을 함유하고 있으므로 빈번히 사용되어져 왔다. 골조직은 자체에 BMP를 함유하고 있

<sup>†</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

어서 BMP의 조직 결손부 송달을 통한 골조직 등의 치주조직 재생에 이용되어져 왔다. 이외에 탈미네랄 화시킨 망상부 골조직은 항원성도 크고 함유 BMP량도 작지만 자체형상이 sponge와 같은 성질을 가지고 있으므로 피층부 골조직이 안고있는 불충분한 충전력을 개선시킬 수 있으며 결손부의 출혈혈을 흡수하여 지혈작용도 할 수 있어 상당수 응용이 되어져 왔다. 이외에 이상적인 치주조직 재생용 충전물질 개발을 위해 탄소화합물, 인회석 등이 정도의 효과를 인정받고 있는 상태이다.<sup>11,12)</sup> 그러나 이들은 이식 후 분해흡수가 일어나며 흡수가 되면 뼈로 치환되는 것이 아니라 결체조직으로 바뀌게 된다. 또 이러한 물질들은 조작이 까다롭고 수급 또한 어려우며 BMP함량도 일정하지 않아 재생능력이 없거나 미미한 정도이다. 이외에 시도된 물질로는 비흡수성 경조직 대체고분자 (hard tissue replacement polymer, HTR polymer)<sup>13)</sup>, 인회석류<sup>14)</sup>, 트리칼슘인산 세라믹<sup>15)</sup> 등이 있다. 일반적으로 이러한 합성 물질은 감염에 민감하고 이식 후 자기들끼리 집적되어 버리는 단점이 있다. 또한 이들은 BMP를 자체적으로 함유하지 않으므로 송달을 위해서는 이의 봉입기술이 요구되는데 현재까지 활성물질의 봉입기술은 확립되어 있지 않으며 시도된 예도 물리적 도포 및 혼합에 그치고 있다. 따라서 발표된 보고도 대부분이 충전물질 자체의 성질에 대한 것이다. 이러한 물질은 또한 자생적으로 발생한 것이 아니라 인위적으로 끼워 넣어진 뼈대 역할을 할 뿐이므로 실제 세포수준에서의 조직 재생 자극 효능은 미지로 남아있다.

이러한 배경에서 불 때 물질자체가 입자화되어 충전능을 가지고 있으면서 조직 재생을 유도시키는 한편 약물을 효과적으로 함유하고 이에 의해 조직 재생을 유도시킬 수 있는 기법이 요구된다. 이에 본 연구에서는 chitosan을 이용하여 충전능을 가질 수 있는 bead형태의 제제를 개발하고 여기에 약물을 함유시켜 이들이 치주조직 재생에서 활용될 수 있도록 하였다. Chitosan은 게, 새우 등의 갑각류의 각피에 포함되어 있는 chitin의 N-deacetyl화물로서 2-amino-2-deoxy-D-glucose( $\beta$ -D-glucosamine)가 직쇄상으로  $\beta$ (1,4)결합한 다당류이다.<sup>16)</sup> 생체 재료로서 chitosan은 화상부위를 보호하면서 새로운 조직의 재생을 촉진시키는 목적으로서 인공피부로서 사용되며 기계적 강도가 우수하고 물질의 투과조절이 용이하므로 생체흡수성 봉합사 및 인공신장용 막재료로 이용된다.<sup>17,18)</sup> 약제분야에서 chitosan은 난용

성 약물의 용해도 증진효과를 보이며 용출을 제어하는 조절방출능도 가지고 있으므로 경구제형이나 이식용 제제에 활용되어져 왔다.<sup>19-21)</sup> 치주조직재생에 있어서는 치주인대 세포의 이동, 부착, 증식 및 분화가 핵심적인 요건인데 치주인대 세포에 대한 화학주성, 세포증식력에 있어서 물질내 N-acetyl-D-glucosamine의 구조가 주로 효과적인 것으로 보고되고 있다.<sup>22)</sup> 치주인대 재생 및 치조골 재생에 있어서 chitosan의 작용은 chitosan내 N-acetyl glucosamine잔기에 기인하는데 구조적으로 glucosaminoglycan과 유사하며 세포내 fibroblast growth factor와 같은 성장인자와 결합하여 osteoblast등의 세포에 대해 증식력을 증가시켜 준다. 약물로서 이용되어진 flurbiprofen은 소염효과 외에도 치주조직내의 아라키돈산 대사과정에 관여 치온염과 치육염을 감소시키고 신생골의 제거흡수를 감소시킨다는 것이 보고되었다.<sup>23,24)</sup> 또한 동물실험에서 염증을 감소시키고 저농도(0.02 mg/kg)에서도 성견의 치조골 제거 흡수속도를 낮추는 것이 보고된 약물이다.<sup>25)</sup>

본 연구의 목적은 chitosan을 적절한 크기로 입자화하고 여기에 약물을 봉입하여 치주조직 손상부에 이식함으로써 생분해성 충전재료로서의 역할을 수행함과 동시에 약물을 조절방출시킴으로써 효율을 증대 시킴에 있다. 이를 위해 본 연구에서는 flurbiprofen 함유 chitosan bead를 제조하고 제조조건을 달리하여 이들이 약물용출에 미치는 영향을 고찰하고자 하였다.

## 실험방법

### 재료, 시약 및 기구

사용된 고분자로 chitosan은 Junsei Co.(Japan)의 제품을 구입하여 사용하였고 flurbiprofen은 태극약품(Seoul, Korea)로부터 제공 받았다. Sodium triphosphate 및 glutaraldehyde는 모두 Showa Chemicals(Japan)에서 구입한 제품을 사용하였다. 그의 시약들은 모두 reagent grade을 사용하였다.

실험에 사용한 주요 기기로는 Mechanical stirrer (Fisher scientific, USA), droplet extrusion nozzle, air flow meter(Dwyer, USA), UV-spectrophotometer(Beckman Instruments, USA), shaking water bath(Dong Yang Science, Korea), scanning electron microscope(JEOL JSMCF-35, Japan) 등을 사용하였다.

**약물을 함유하는 chitosan bead의 제조**

Flurbiprofen을 일정량씩 5% chitosan용액(1% acetic acid에 녹인 것)에 가하여 교반하고 약물의 분산액으로 제조하였다. 이를 압축공기가 통과하는 droplet extrusion nozzle를 이용하여 sodium tripolyphosphate과 glutaraldehyde의 혼합액에 점적한 후 교반하여 gel화 및 경화시킨 후 진공 건조하에서 24시간 건조시켰다. 또한 다음의 조건에 따라 flurbiprofen함유 chitosan bead를 각각 제조하고 이의 용출에 미치는 영향을 고찰하였다.

**Sodium tripolyphosphate(TPP)의 조건 설정**—Flurbiprofen이 혼합된 chitosan액을 pH 5, 6, 7, 9의 TPP액에 적가하고 3시간 교반하는 동안 시간별로 TPP액을 일정량 취하고 이를 UV-흡광도법으로 측정하여 약물의 손실율을 계산하였다.

약물의 손실율(%)

$$= \frac{\text{TPP액으로의 약물량}}{\text{chitosan내의 약물량}} \times 100$$

**Gel 화시간에 따른 bead의 형성 및 약물용출에 미치는 영향**—Chitosan과 TPP의 반응시간에 따른 영향을 관찰하기 위해 gel화 시간을 30분, 1시간, 2시간, 3시간으로 하여 bead를 제조하고 용출실험을 실시하였다.

**TPP의 농도의 영향**—Gel화시키는 동안의 TPP의 농도에 따른 chitosan과의 반응 및 gel bead로부터의 약물 용출양상을 관찰하기 위해 TPP의 농도를 2, 5, 10% (w/v)으로 하여 전항의 방법대로 bead를 제조하였다.

**약물의 함량 별 영향**—약물의 함량이 용출에 미치는 영향을 관찰하기 위해 약물의 양을 chitosan의 중량에 대해 5, 10, 15, 30 % (w/w)로 하여 전항의 방법대로 bead를 제조하였다.

**Scanning electron microscope관찰**

Scanning electron microscope(JEOL, Japan)을 이용해서 건조된 bead의 모양과 표면상태 등을 관찰하였다.

**약물 방출실험**

제조된 bead를 200 mesh의 내부로 둘러싸인 basket에 채우고 이를 0.1 M 인산완충액(pH 7.4)에 넣은 후 shaking water bath에서 37°C, 15 rpm을 유지시켰다. 일정시간 간격으로 whole media exchange법으로 sample을 취해서 UV-흡광도법으로 247 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선에 의해 용출된 약물량을 계산하였다.

**결과 및 고찰**

**Bead의 형태**

양이온성 polysaccharide인 chitosan은 이온상호작용에 의해 다가 반대이온과 분자내 혹은 분자간 결합을 형성한다. 본 연구에서는 양이온으로 하전된 chitosan과 tripolyphosphate(TPP)의 음이온과의 이온성 상호작용을 이용하여 chitosan bead를 제조하였다. 제조시에 acetic acid로 녹여서 양이온으로 하전된 chitosan용액은 TPP용액에 적하되는 즉시 gel상의 bead를 형성하였다. 본 연구에서는 기술한대로 chitosan을 polyelectrolyte complexation에 의해 gel화시켜 bead를 제조하였다. 제조된 bead의 SEM관찰결과는 Figure 1에 나타내었다. Bead의 크기는 평균적으로 250 μm이었다. 표면은 치밀한 구조를 이루었는데 표면에서는 약물의 결정 및 깊은 주름이 관찰되었다. 이는 chitosan bead내의 용매인 증류수가 표면에서 증발하는 과정에서 chitosan chain끼리의 distortion으로 형성된 것으로 사료되며 약물은 chitosan 용액내에서 용해되어 있는 것이 아니고 분산되어 있는 것이므로 역시 용매가 증발하면서 같이 표면으로 일부 노출된 것이다. 또한 gelation media인 TPP용액에 대한 용해도에 의해 chitosan bead표면으로 이끌려 나온 것으로 사료된다.

**TPP의 pH에 따른 gel형성능 및 약물 봉입효율**

Flurbiprofen등의 음이온성 약물(pKa 4.8)의 용해도는 pH에 의존적인데 산성에서는 용해도가 120 μg/ml이던 것이 TPP의 pH인 9.4에서는 4000 μg/ml로 현저히 증가한다. 따라서 flurbiprofen함유 chitosan

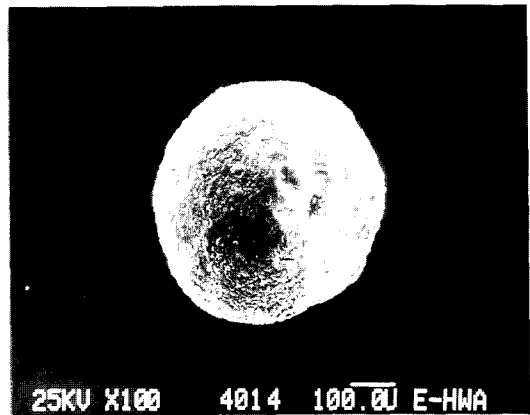


Figure 1—Scanning electron micrograph of flurbiprofen loaded chitosan bead.

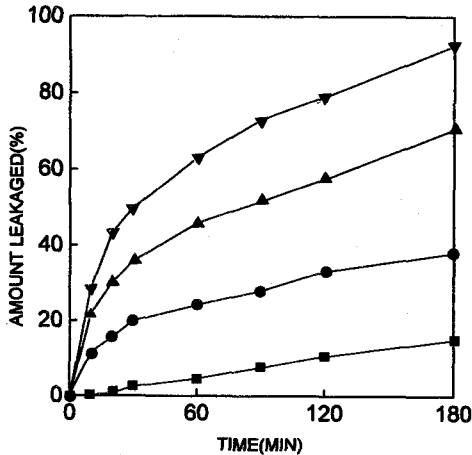


Figure 2—Amount leakage of flurbiprofen from chitosan to tripolyphosphate (TPP) solution for gelation period. Effect of pH of tripolyphosphate solution on drug leakage. (■) pH 5, (●) pH 6, (▲) pH 7, (▼) pH 9.

bead의 제조시 문제는 제조 기간동안 TPP액으로의 flurbiprofen의 누출이다. Figure 2에는 chitosan gel bead에서 TPP용액으로의 flurbiprofen의 누출을 측정한 graph이다. 대부분의 약물이 pH 9.4인 TPP로 gelation시킬 때 3시간 동안 소실되었다. 그러므로 flurbiprofen의 chitosan gel bead에서 TPP로의 손실은 TPP phase의 pH를 낮추는 것이다. pH 6에서는 손실이 30%로, pH 5에서는 손실이 15%로 감소하였다. 이 결과에 의해 본 연구에서는 chitosan bead제조시 TPP의 pH를 5로 고정하였다. Otagiri등<sup>26)</sup>은 chitosan bead를 제조할 때 TPP의 pH가 6이하로 감소시 chitosan gel bead는 brittle해지고 gel형성이 되지 않는다고 보고하였으나 본 연구에서는 TPP내에서 gel화 및 경화를 동시에 실시하였으므로 pH에 의해 gel bead의 형성능 저하는 관찰되지 않았다. 그러나 5% (w/v)농도의 chitosan용액의 pH는 4.1이므로 pH가 5이하로 저하된다면 gel bead형성능이 저하될 것으로 예측된다.

#### Gel화 시간에 따른 bead의 형성능 및 약물 용출양상

Bodmeier등은 chitosan bead의 형성을 chitosan과 TPP의 ionic interaction 및 chitosan용액과 TPP의 중화에 의해서 형성된다고 하였다. 즉 즉각적으로 적하된 droplet의 표면에서는 interaction에 의해서 gel이 형성되나 이것이 내부에 까지 gelation되기 위해서는 chitosan내의 acetic acid가 TPP에 의해 중화되어 이동하고 내부가 중성이 되는 지점이 gel bead형성의 완

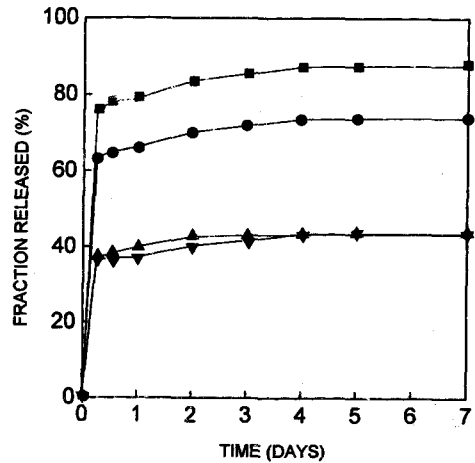


Figure 3—Effects of gelation time of chitosan beads on flurbiprofen release. (■) 0.5 hr, (●) 1 hr, (▲) 2 hr, (▼) 3 hr.

결점이다. 이러한 변화를 위해서 pH지시약이 chitosan내에 도입되어 실험되기도 하였다. 즉 내부에 도입된 pH 지시약의 색이 중성 영역을 지시하는 시간이 gelation의 완결점으로 보고하였다.<sup>27)</sup>

본 연구에서는 gel화 시간을 30분, 1시간, 2시간, 3시간으로 하여 chitosan bead를 제조하고 그 용출양상을 관찰하였다(Figure 3). 30분 gel화시킨 chitosan bead로부터는 1일만에 용출이 90% 완결되었으나 gel화 시간이 1시간, 2시간, 3시간으로 증가할수록 용출을 및 속도가 저하되었다. 즉 1시간 gel화시킨 bead에서는 2일에 용출이 72%로, 2시간 gel화시킨 bead에서는 56.25%로 용출율의 감소를 나타내었다. 그러나 3시간 gel화시킨 bead에서는 2시간 gel화시킨 것과는 그다지 큰 차이는 없었다. 이 결과로 볼 때 이러한 용출의 차이는 gel화 시간에 따른 내부 매트릭스의 치밀한 구조 형성 차이임을 알 수 있다. 즉 gel화 시간이 단축될수록 내부에서 치밀한 구조 형성이 이루어지지 못하고 엉성한 구조가 되면서 약물의 용출을 제어할 수 없게 되었다. 이 경우 2시간의 gel화 만으로도 약물용출의 제어를 얻을 수 있었으며 또한 내부구조도 치밀할 것으로 사료되었다.

#### TPP농도의 영향

대부분의 이온성 상호작용은 상호작용하는 잔기의 수에 비례하지만 잔기가 상대이온의 잔기와 모두 이온 반응을 하는 경우 더이상의 농도증가로는 상호작용은 증가하지 않는다. Figure 4는 gelling agent로 이용되어진 TPP의 농도가 flurbiprofen의 용출에 미치는 영

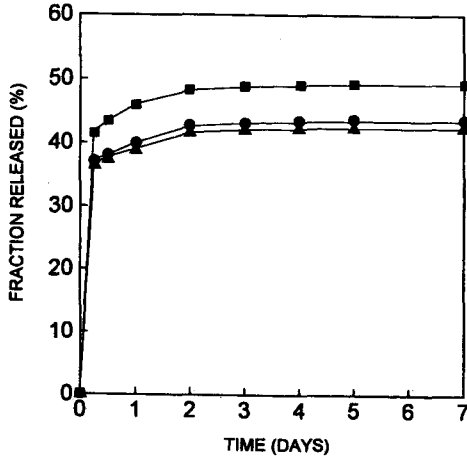


Figure 4—Effects of concentration of sodium tripolyphosphate(TPP) solution on flurbiprofen release from chitosan beads. (■) 0.5% TPP, (●) 5% TPP, (▲) 10% TPP.

향을 관찰한 것이다. 이 경우 TPP는 ion성 가교제의 작용을 한 것으로도 생각할 수 있다. 일반적으로 hydrogel등의 가교제가 관여하는 제형에서 약물의 용출 및 팽윤도는 가교도에 의해 영향을 받는다. 본 연구에서는 TPP의 농도가 증가할수록 chitosan과의 intra-혹은 intermolecular linkage 가 증가되고 이로 인해서 chitosan bead로부터의 용출이 감소됨을 관찰하였다. 0.5%의 TPP로 gel화시킨 경우의 약물의 용출은 5% TPP로 gel화시킨 경우보다 증가함을 관찰하였다. 이는 TPP의 농도가 0.5에서 5%로 증가하면서 chitosan과의 이온성 상호작용이 증가한 것으로 사료되었으며 5%에서 10%로 TPP의 농도가 증가하면서는 더이상의 약물 용출의 감소가 관찰되지 않은 것으로서 치밀한 내부구조 및 표면의 형성에는 5%의 TPP가 적합함을 알 수 있었다.

**약물의 함량이 용출에 미치는 영향**

Figure 5는 약물의 함량을 달리하여 bead를 제조한 후 용출실험을 행한 결과이다. 일반적으로 고분자 매트릭스로부터의 약물의 방출은 약물의 용해도, 고분자 내부구조 및 고분자와 약물의 상호작용에 의해 제어를 받는다. Flurbiprofen의 경우는 약물의 함량이 증가할수록 용출율은 증가하였으나 용출 거동은 초기 속방출 이후 용출율이 level-off되는 현상을 보였다. 초기 속방출은 분산된 flurbiprofen입자가 chitosan matrix표면으로 노출되어 이것이 용출된 것임을 알 수 있었다. 약물의 함량이 증가할수록 chitosan 표면에 노출된 양은 증가하고 초기 높은 용출율을 보인다. 이후의 낮은

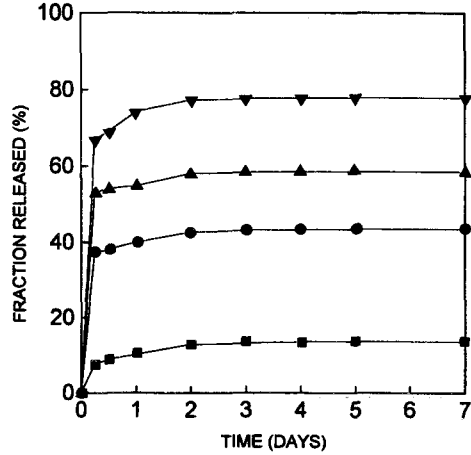


Figure 5—Effects of initial content on flurbiprofen release from chitosan beads. (■) 5%, (●) 10%, (▲) 15%, (▼) 30%.

용출율은 난용성 약물인 flurbiprofen이 매트릭스내에 포착되었기 때문이다. 이 경우 flurbiprofen의 용출은 chitosan matrix내 분산된 약물입자들에 의해 생성된 aqueous channel에 의한 확산에 의해 이루어진다. 그러나 flurbiprofen의 pore거리의 연결이 부족하기 때문에 낮은 용출을 보이는 것이다. 이러한 용출은 지속 방출에 있어서는 불리할 수도 있겠으나 국소적으로 적용시 초기에 빠른 용출을 보여 약효를 발현하고 이후에 일정한 조직내 농도를 유지한다는 측면에서는 골재생에 있어 유리하다고 하겠다. 최근까지 100 mg/ml의 농도로 경구투여하였을 때 골흡수가 억제되어 골재생에 효과적임이 보고되었으나<sup>28)</sup> 국소에서의 적용에 대한 보고는 아직 미흡하다고 하겠다. 그러나 본 연구자들이 다른 제형으로 하여 flurbiprofen을 적용하였을 때 국소에서 초기 30 µg/ml의 방출후 2주간 120 µg/ml의 약물을 방출시킨 제형이 현저한 골재생을 보인 것으로서<sup>29)</sup> 미루어 볼 때 chitosan bead에 의해서도 상기의 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

**결 론**

치주조직 재생을 위한 결손부 충전성을 가진 골대체 재료로서 생분해성 chitosan bead가 제조되었으며 이에 대한 약물로서 flurbiprofen이 도입되었다. Chitosan과 sodium tripolyphosphate, glutaraldehyde와의 이온성 가교에 의해 입자도 250µm의 미립구가 제조되었다. 제조된 bead로부터 flurbiprofen의 용출

은 초기 속방출이후 용출속도가 감소함을 보였다. 이러한 용출패턴은 chitosan bead의 제조 조건을 달리 하여 제조 후 용출 실험한 결과 조건에 따라 변화하였으며 이로서 약물의 조절방출이 가능할 것으로 예측되었다. 이러한 연구결과 chitosan bead의 치주조직 재생에 있어서 유용한 국소약물 송달체제로서의 활용성이 제시되었다.

### 감사의 글

본 연구는 과학기술처 생명공학 기술개발사업의 연구비 지원에 의한 결과이며(MOST 95-B-0206-A-04) 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) B. Rosling, S. Nyman, J. Lindhe and B. Jern, The healing potential of the periodontal tissues following different techniques of periodontal surgery in plaque-free dentitions. A 2-year clinical study, *J. Clin. Periodontol.*, **3**, 233-250 (1976).
- 2) V.K.Murray et al., Polymer implantation in periodontic endodontic lesions, *New York Journal of Dentistry*, p. 154 (1991).
- 3) M.H.Amlaer et al, Hard tissue replacement (HTR) polymer as an implant material, *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**, 1079-1089 (1990).
- 4) P.D. Miller, The concept of the "Super clot" in osseous grafting, *Compend. Contin. Educ. Dent.*, **13**(3), 236-147 (1992).
- 5) H.Cranin, A polymeric bone replacement material in human oral and maxillofacial surgery, *Compend. Contin. Educ. Dent.*, **10**, S321-S327 (1988).
- 6) L.B.Kaban, Induced osteogenesis in the repair of experimental defects in rats, *Proc. Am. Inst. Biol.*, **73**, 291-306 (1980).
- 7) G.Drury et al., Effent of topical tetracycline on bone regeneraton following freeze -dried bone allografts, *J. Dent. Res.*, **59**, 364-170 (1988).
- 8) R.Yukna et al., Clinical evaluation of localized periodontitis defects treated with freeze-dried bone allograft combined with local and systemic tetracycline, *Int. J.Periodontics Restoratiotive Dent.*, **2**(5), 9-15 (1982).
- 9) T. Mabry et al., Freeze-dried bone allografts combined with tetracycline in the treatment of juvenile periodontitis, *J. Periodontol.*, **56**, 74-81 (1985).
- 10) G. Evans et al., Effect of various graft materials with tetracycline in localized juvenile periodontitis, *J. Periodontol.*, **60**, 491-497 (1989).
- 11) P.J.Boyne et al, Long term study of HA implants in canine alveolar bone, *J. Oral. Maxillofac. Surg.*, **42**, 589-594 (1984).
- 12) K.A.Selvig , Chemical analysis and microradiography of cementum and dentin from periodontally diseased human teeth, *J. Periodontol.*, **33**, 303-310 (1962).
- 13) B.L.Eppley , Evaluation of HTR polymer as a craniomaxillofacial graft material, *Plast. Reconstr. Surg.*, **86**(6), 1085 -1092 (1990).
- 14) R.M. Meffert, J.R. Thomas and R.F. Caudill, Hydroxyapatite implantation : Clinical and histologic analysis of a treated lesion and speculations regarding healing phenomena, *Int. J. Periodont. Restorative. Dent.*, **6**(6), 61-66 (1986).
- 15) M.P. Lerm, L. Getter and S.N. Bhaskar et al., Biodegradable ceramic in periodontal defects, *Oral. Surg. Med. Path.*, **38**(3), 344-351 (1974).
- 16) Riccardo A.A.Muzzarelli, Biochemical significance of exogeneous chitins and chitosans in animals and patients, *Carbohydrate Polymers*, **20**, 7-16 (1993).
- 17) S. Mima, S. Yoshikawa and M. Mima, Japan. Patent, 130870(1975).
- 18) R.A.A. Muzzarelli, Chitin, Pergamon Press, Oxford, pp.255-265 (1977) .
- 19) Y. Sawayanagi, N. Nambu and T. Nagai, Dissolution properties and bioavailability of phenytoin from ground mixtures with chitin or chitosan, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**(6), 2064-2068 (1983).
- 20) S. Miyazaki, H. Yamaguchi, C. Yokouchi, M. Takada and W.M. Hou, Sustained release of indomethacin from granules in beagle dogs, *J. Pharm. Pharmacol.*, **40**, 642-643 (1988).
- 21) R. Bodmier, H. Chen and O. Paeratakul, A novel approach to the oral delivery of micro or nanoparticles, *Pharm. Res.*, **6**(5), 200-209 (1989).
- 22) R.A.A. Muzzarelli, M. Mattioli C. Tietz, R. Biagini G. Ferioli, M.A. Brunelli, M. Fini, R. Giardino, P. Ilari and G. Biagini, Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan, *Biomaterials*, **15**(13), 1075-1081 (1994).
- 23) R.C. Williams, W. Offenbacher, M.K. Jeffcoat, T.H. Howell, H.G. Johnson, C.M. Hall, W.J. Wechter and P. Goldhaber, Indomethacin or fourbiprofen treatment of periodontitis in beagles : Effect on crevicular fluid arachidonic acid metabolites comared with effect on alveolar

- bone loss, *J. Periodont. Res.*, **23**, 134-138 (1988).
- 24) R.C. williamson, M.K. Jeffcoat, W.J. Wechter, H.G. Johnson, M.L. Kaplan and P. Goldhaber, Non-steroidal anti-inflammatory drug treatment of periodontitis in beagles, *J. Periodont. Res.*, **19**, 633-637 (1984).
- 25) M.K.Jeffcoat, R.C. Williams, W.J.Wechter, H. G.Jonson, M.L.Kaplan, J.S.Gandrup, P.Goldhaber, Flurbiprofen treatment of periodontal disease in beagles, *J. Periodont. Res.*, **21**, 624-633 (1986).
- 26) S. Shiraishi, T. Imai and M. Otagiri, Controlled release of indomethcin by chitosan-polyelectrolyte complex: optimization and in vivo/in vitro evaluation, *J. Control. Release*, **25**, 217-225 (1993).
- 27) R. Bodmeier, K.H. Oh and Y. Prammar, Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **15**, 1475-1494 (1989).
- 28) R.C.Williams, M.K.Jeffcoat, M.L.Kaplan et al., Flurbiprofen: a potent inhibitor of alveolar bone resorption in beagles, *Science*, **227**, 640-648 (1985).
- 29) C.P.Chung, D.K.Kim, Y.J.Park, K.H.Nam and S.J.Lee, Biological effects of drug loaded biodegradable membranes for guided bone regeneration, *J. Periodont. Res.*, **32**, 172-175 (1997).