

# 당뇨유발 모델에서 맥동성초음파와 키토산의 창상치유효과

동신대학교 한의과대학 물리치료학과

김계엽 · 민순규 · 정미선

## The Effect of Wound Healing of Pulsed Ultrasound and Chitosan in Diabetic Induced Model

Kim, Gye-Yeop · Min, Soon-Gyu · Cheong, Mee-Sun

Department of Physical Therapy, College of Oriental Medicine, School of Dong-Shin University

### <Abstract>

The studies have been designed to evaluate the effect of wound healing of pulsed ultrasound and chitosan application in diabetic incisive wound of rats. Mild diabetes mellitus was induced in rat used 30 mg/kg streptozotocin. Full thickness skin incision was made on the backs of Sprague-Dawley rats. We used 72 Sprague-Dawley rats which were divided into 4 groups; the subjects were divided into group of 6 rats each 3, 6, and 15 days.

The results were summarized as follows;

The rate of wound length of pulsed ultrasound with chitosan application groups more decreased than only pulsed ultrasound treatment group. The density of inflammatory cells in the experimental groups was more significantly decreased than diabetic control group( $p<0.05$ ).

Historically, in the ultrasound with chitosan application groups, reepithelized epithelium was thicker and the collagen fiber were organized in a liner manner and connective tissue was matured faster those of the diabetic control group( $p<0.05$ ).

From the conclusions above, in this study application of pulsed ultrasound and chitosan can be an effective way of promotion of wound healing in diabetic model.

---

본 연구는 한국과학재단지정 동신대학교 산업융가속기이용생물연구센터 지원에 의한 것입니다.

## I. 서론

최근 식생활의 변화, 편리함의 추구 그리고 각종 스트레스 증가로 인해 당뇨병과 같은 식생활 습관의 변화에 따른 각종 선진국형 성인병들의 문제해결에 있어서도 관심이 증가하고 있는 추세이다. 당뇨는 정상적인 생리상태에서 만성적으로 혈당이 상승하는 상태를 말하며, 이는 당뇨의 고전적 증상이나 유전적 관계를 보이지 않는 상태에서도 혈당의 이상적 상승 징후가 계속되는 상태를 의미한다(WHO Study Group, 1985 ; 平田幸正, 1994).

당뇨병은 동반된 질환의 유무에 따라 일차성 당뇨와 이차성 당뇨로 구분되어진다. 일차성 당뇨(primary diabetes)는 췌장의 염증질환과 수술, 종양, 약물의 제공, 이온과다(hemochromatosis) 및 기타 유전 질환 등에 의한 췌장의 파괴를 동반하는 이차성(secondary diabetes) 당뇨는 만성췌장염(chronic pancreatitis)과 췌장수술 후(postpancreatectomy), 호르몬계 종양(hormonal tumors), 약물(corticosteroids) 및 유전성 질환(genetic disorder) 등과 같은 원인질환에 의하여 발병하게 된다(Robins 등 1994). 이와 같은 비정상적인 혈압상승으로 당뇨병은 다양한 심혈관질환, 말초신경손상, 면역력 감소 그리고 창상치유 지연 등의 합병증을 초래한다는 점에서 더욱 문제시 되고 있다. 당뇨병은 대사성 질환으로 특히 문제가 되는 것은 다양한 합병증을 동반하게 된다는 것이다. 이중 당뇨환자들에게 있어서 말초혈관장애 및 정상면역반응장애로 인한 창상의 지연 유합은 외과적 수술적 처치의 어려움과, 창상유발 부위의 비정상적 육아조직의 형성이라는 점에서 중요한 합병증 중의 하나이다. 당뇨 환자들은 정상적인 조직 재생과정이 상실됨으로서 급성창상과 수술성 창상의 원활한 치유과정을 방해 받게 된다(Hunt, 1980). Greenhalgh 등(1990)에 의하면 당뇨 환자들에게 보이는 정상적인 조직재생의 상실은 당뇨병성 동물모델들에서도 동일하게 나타나며, 당뇨유발 마우스들에게서 창상치유의 결손과 지연유합을 확인하였다고 보고하였다. Andressen과 Oxlund(1987)은 스트렙토조토신으로 유발된 당뇨병 쥐모델에서 창상치유의 정상적 진행양상을 확인하였다. 당뇨병에 있어서 창상치유는 창상부의 장력(tensile strength)의 감소와 조직재생 인자들의 결손 또는 이상침착 등이 특징적이다(Darby 등, 1997).

창상이란 손상 받은 조직의 기능과 형태적 특성을 정상화시키기 위한 개체의 필수적인 반응이다(Woodley, 1985). 창상의 치유과정은 매우 복잡한 과정을 겪게 된다. 피부조직은 즉각적으로 파괴되고 혈관의 손상이 유발되며, 세포의 파괴를 동반하게 된다(Byl 등, 1992). 창상조직에서 분리(resolution)와 세포들의 높은 과립조직의 형성은 반흔 조직을 형성하게 된다.

본 연구에서 창상치유를 위해 사용되는 키토산(chitosan)은 키틴의 탈아세틸화물의 총칭으로 자연계에서 발견되는 키틴은 주로 70% 정도가 탈아세틸화된 키토산이 주종을 이루고 있으며, 키틴의 탈아세틸화 정도에 따라 이러한 기능성의 차이가 있는 것으로 알려져 있다 (조용남 등, 1999).

갑각류의 껍질로부터 제조되는 키틴(chitin)은 지구상에서 셀룰로오스 다음으로 많이 존재하는 천연고분자 재료로서 무척추동물인 게와 새우 등의 갑각류를 비롯하여 곤충류와 연체동물에도 대량 포함되어 있다. Hoffmeister 등 (1964)은 분쇄된 키틴분말이 상처의 회복속도를 증진시킨다고 하였으며, Yano 등 (1985)은 절개창에 키틴을 도포하여 창상의 피열력 증가를 확인하였다. 키틴은 통증의 완화와, 상처부위에 쉽게 접촉되어 피부재생 능력을 촉진하며, 상처부위에서 분비되는 삼출액을 제거해 주는 능력이 우수한 것으로 보고 되고 있다 (Ohshima 등, 1987). 창상치유의 초기는 크게 두 단계로 나뉘어 있는데, 첫 번째 단계는 염증단계이며 두 번째 단계는 신생조직형성 단계이다(Scott 등, 1995). 염증단계 시, 염증부위로 호중구(neutrophils)가 침윤되어 외부물질들을 제거하게 되는데, 이때 키토산은 염증세포들의 침윤을 가속화시켜(Okamoto 등, 1995), 창상치유를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 물리치료영역에서는 키토산과 같은 새로운 기능성 소재를 이용하여 창상치유에 관한 연구는 매우 미진한 실정이다.

물리치료영역에서 초음파는 사용방법이 비교적 간편하고 인체의 원하는 부위에 비교적 안전하게 적용할 수 있기 때문에 가장 많이 이용되고 있는 치료 장비이다(김진호와 이청기 1990). 초음파의 생물리학적 효과들은 초음파가 생체를 투과하는 과정에서 미세진동에 의한 기계적 효과를 유발함에 의해 발생된다. 초음파 치료의 적용은 초음파의 적용형태, 강도, 치료시간 및 손상 후 치료개시 시기 등 다양한 변수들을 고려하여야 하며, 1:4의 맥동비로 1 MHz 또는 3 MHz의 주파수를 사용하여 저강도를 적용할 경우 창상치유를 촉진할 수 있다고 하였다(Byl 등, 1993). Dyson(1987)은 창상치유 과정 중 유도물질이 조직손상 후 초기에 유리되므로, 맥동성 초음파를 손상초기에 적용하여야 효과적이라고 하였으나, 현재에도 정확한 초음파의 강도와 주파수에 대한 의견이 다양하게 제시되고 있는 실정이다, 또한 이와 같은 물리치료영역에서 활용할 수 있는 초음파 등의 전기치료 방법과 최근 각 분야에서 면역 증강제로 등으로 이용되고 키토산과의 병행치료에 관한 연구들은 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 스트렙토조토신으로 유발된 당뇨모델 백서를 이용하여 당뇨병에서 흔히 나타나는 창상지연을 해결하기 위한 방법으로 창상치유제 및 면역증강제로 알려진 키토산과 물리치료 분야의 맥동성 초음파 치료의 창상치유 효과를 알아보는데 목적이 있다.

## II. 연구방법

### 1. 실험동물 및 실험설계

대한동물(주)에서 분양한 8주령 SD계 백서 72마리를 사용하였으며, 모든 개체에 당뇨를 유발시킨 후 치유방법에 따라 4군의 실험군으로 분류하였다(Table 1). 실험군 I은 창상유발 후 아무런 처치도 적용하지 않았으며, 실험군 II는 창상유발 후 키토산 분말을 도포하였으며, 실험군III는 0.5 W/cm<sup>2</sup> SATA<sub>i</sub> 맥동성 초음파 치료를 적용하는 군이며, 실험군 IV은 키토산 분말도포와 0.5 W/cm<sup>2</sup> SATA<sub>i</sub> 맥동성 초음파 치료를 적용하는 군으로 각각 분류하였다. 모든 실험군은 각 군당 18마리가 되도록 무작위 추출을 통하여 분류하였다. 실험실은 12시간 명암주기로 고형사료와 먹이는 자유롭게 공급하였다. 실험실 내 온도는 25±2 °C로 일정하게 유지시켰다.

Table 1. General characteristic of experimental design.

Group	Rat NO. of tested	Frequency/SATA <sub>i</sub> dose(W/cm <sup>2</sup> )	Chitosan
I	18	Not application	Not application
II	18	Not application	Chitosan application
III	18	3 MHz/0.5	Not application
IV	18	3 MHz/0.5	Chitosan application

### 2. 연구과정

#### 1) 당뇨유발

스트렙토조토신(Sigma-Aldrich, Co., S-0130, USA) 30 mg/kg을 복강 내 주입하여 췌장의 베타 세포를 선택적으로 파괴하는 방법으로 당뇨병 모델을 만들었다. 복강 내 주사 3일 후 각 개체의 머정맥 채혈을 실시하여 혈당측정기(Roche Diagnostics GmbH, Germany)로 혈당이 200 mm/dl 이상에 해당하는 백서들만 실험에 사용하였다. 당뇨병 모델이 완성된 백서들은 무작위 추출을 통하여 4그룹으로 분류하였다.

## 2) 창상유발

창상유발을 위해 실험동물들의 배부 척추선을 따라 삭모한 다음, 면도기로 피부표면을 정리하였다. 마취는 2단계로 진행하였으며, Rompun 주사액을 0.6 mg/kg 사용하여 동물들을 전 마취 시킨 후, Ketamin 0.5 mg/kg을 사용하여 본 마취시켰다. 마취된 실험동물들은 해부용 틀에 사지를 고정 시킨 다음, 알코올 소독 후 척추를 따라 종축으로 디지털 캘리퍼로 절개부를 표시하여 피부 전층(full-thickness)까지 종축방향으로 30 mm 선상 절개하여 창상을 유발하였다. 절개된 부위를 압박 지혈 후 실크세사를 이용하여 10 mm 간격으로 단순결찰 봉합하였다. 본 실험에 사용된 모든 창상 모델들은 위의 방법으로 동일하게 처치하였으며, 창상유발 후 24시간 동안 안정을 취하게 한 후 실험을 개시하였다.

## 3) 치료과정

당뇨병 창상유발 모델에서, 초음파 치료군은 3 MHz 초음파도자를 사용하여 각 개체당 1일 1회 1.0 W/cm<sup>2</sup> SATAi (Spatial Average & Temporal Average) 용량으로 치료하였으며, 초음파 강도는 0.5 W/cm<sup>2</sup>을 사용하였으며, 맥동비는 1:5로 일률적으로 제공하였다. 키토산 도포군은 키토산 분말을 창상부위에 1일 2회 각각 도포하였으며, 자연적인 소실을 방지하기 위하여 거즈를 분말 도포 후 상부에 부착시켰다. 초음파 치료와 키토산 분말의 도포를 병행한 실험군은 먼저 초음파 치료를 실시한 후 키토산 분말 도포군과 동일한 방법으로 처치를 하였다. 대조군은 창상유발 후 실험 종료 시까지 아무런 치료적 처치도 제공하지 않았다.

## 4) 조직 적출 및 조직학적 변화관찰

경추탈골법으로 희생시킨 후 해부용 고정 틀에 고정시켰다. 알코올 슝으로 적출부위를 소독한 후 수술용 메스로 창상부위를 기준으로 1 cm<sup>2</sup> 넓이로 조직을 적출하였다. 모든 군은 3일, 6일 및 15일 간격으로 각각 6마리씩 동일한 방법으로 창상조직 적출하였다. 적출된 조직은 신속하게 10% 중성 포르말린 용액에 고정하여 사후 자가용해 과정(autolysis)이 최소화 되도록 하였다. 고정된 조직을 24시간 후 흐르는 물에 수세한 다음 일반적인 조직의 탈수, 투명 및 침투과정을 TISSUE-TEX<sup>®</sup>(Model No. 4640B, Sakura, Japan) 기기를 사용하여 14시간 동안 처리하였으며, 파라핀 블록의 제작과 냉각은 Embedding Console System(Tissue-Tex<sup>®</sup>, Sakura, Japan)을 사용하였다. 제작된 파라핀 블록을 회전식 미세박절기(Rotary Microtome, Sakura 2040, Japan)를 사용하여 4~5 μm 두께의 미세절편을 제작하여 통산적인 H&E 염색을 실시하였다. 광학현미경(Olympus BX50, Olympus Optical Co., Japan)을 사용하여 각 군의 창상조직의 회복정도를 관찰하였으며, 부착된 조직촬영기로 각 군의 조직들을 촬영하였다. 광학현미경 상에서 창상부 조직의 모세혈관 출혈 및 충혈반응과 염증세포의 침윤정도에 따라 -(0%), +(slight to mild),

++(moderate), +++(severe)로 각각의 등급을 부여하였다.

### 3. 통계방법

각 그룹간 창상조직의 육아지표의 차이를 검증하기 위하여 Mann-Whitney's U-test를 사용하였으며, 시간에 따른 창상의 길이변화를 비교하기 위하여 반복 측정된 일요인 분산분석(repeated one-way ANOVA)을 실시하였다. 사후검정은 Duncan test로 실시하였으며, 모든 통계학적 유의수준은  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## III. 결과

### 1. 시간에 따른 체중변화

실험 전, 실험개시 3일 후, 6일 후, 15일 후에 각각 체중을 측정하여 체중의 변화를 보고자 하였다(Table 2, Fig. 1, Fig. 2). 실험군 I은 3일 후 체중에서 급격한 증가를 보였으나 6일 후에는 다시 급격한 감소를 보이는 것이 다른 실험군들과 다른 특이성을 보였으나, 통계학적 유의성은 없었다. 실험군 II는 실험 후 6일째까지 체중이 감소하다가 15일 후에는 실험 전의 체중보다 증가되는 것을 볼 수 있었으나 유의성은 없었다. 실험군 III는 실험 후 6일째까지 체중이 감소하다가 15일 후에는 회복되는 양상을 보였으나, 실험 전의 체중으로 완전히 회복되지는 않았다. 실험군 IV도 실험군 III에서와 마찬가지로 6일 후까지 감소되었던 체중이 15일 후에 다소 회복되는 양상을 보였으나, 실험 전의 체중으로 회복되지는 않았다.

Table 2. Change of body weight (g)

Group \ Days	PRE	3	6	15
I	257.01±18.24	281.80±8.64	268.15±12.24	276.00±6.48
II	263.39±37.39	248.41±13.51	241.40±10.59	289.08±12.03
III	298.33±16.87	277.61±10.48	266.11±21.41	284.73±14.20
IV	284.96±22.05	268.78±25.38	251.90±15.30	270.44±11.78

F-value 0.85

All value are showed mean±SD

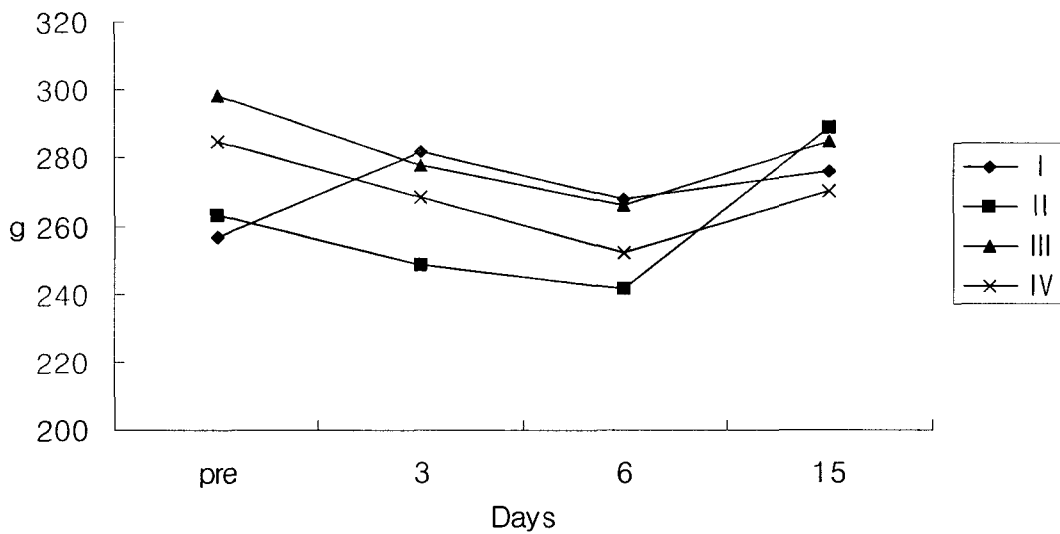


Fig. 1. Change of body weight at group I, II, III, and IV.  
All value are showed mean±SD

## 2. 창상길이변화

실험 개시일로부터 3일 후, 6일 후, 15일 후에 개체의 창상길이변화 정도를 측정하였다(Table 4, Fig. 4). 실험군 I은 창상길이가 3일 후  $29.82 \pm 5.46$  (0.6%) mm, 6일 후  $28.04 \pm 7.01$  (6.54%) mm, 15일 후  $27.67 \pm 6.91$  (7.77%) mm로 각각 감소하였으나 시간에 따른 창상길이의 변화는 유의하지 않았다. 실험군 II는 3일 후 창상길이가  $28.75 \pm 4.79$  (4.17%) mm, 6일 후  $27.24 \pm 5.21$  (9.2%), 15일 후에  $25.57 \pm 4.5$  (14.77%) mm로 각각 감소하였으며, 실험군 I보다는 창상길이의 감소가 있었으나 시간에 따른 창상길이의 변화정도는 유의하지 않았다. 실험군 III는 창상 길이 변화는 3일 후  $27.71 \pm 3.21$  (7.64%) mm, 6일 후  $25.85 \pm 4.72$  (13.84%) mm, 15일 후  $22.6 \pm 3.04$  (24.67%) mm로 감소되었으며, 시간에 따른 창상길이의 변화는 실험 15일 후에서만 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). 실험군 IV은 3일 후  $27.37 \pm 6.24$  (8.77%) mm, 6일 후  $25.57 \pm 3.12$  (14.77%) mm, 15일 후  $20.6 \pm 3.21$  (31.34%) mm로 변화하였으며, 실험 15일 후 측정값에서 시간에 따른 창상길이의 변화가 통계학적으로 유의한 감소가 있었지만( $p < 0.05$ ), 실험군 III와의 비교에서는 유의성이 없었다.

Table 4. Change of length in each diabetic wound.

(mm)

Group	3 days	6 days	15 days	Duncan Grouping
I	29.82±5.46	28.04±7.01	27.67±6.91	A A
II	28.75±4.79	27.24±5.21	25.57±4.5	A B A B
III	27.71±3.21	25.85±4.72	22.6±3.04	A B C A B C
IV	27.37±6.24	25.57±3.12	20.6±3.21*	A B C A B C

F-value 3.47\*

All value are showed mean±SD

\*: p<0.05

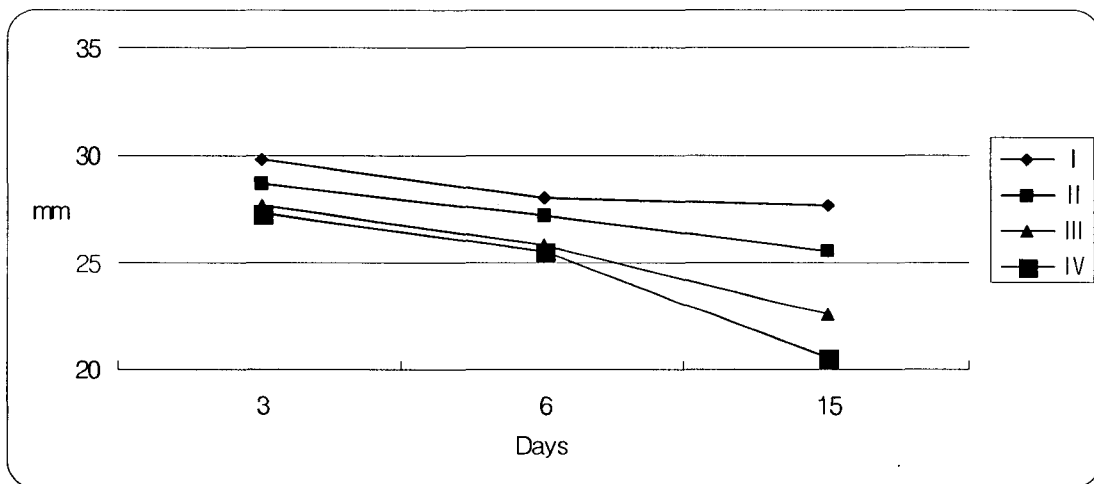


Fig. 2 Change of length in each diabetic wound

All value are showed mean±SD

### 3. 조직학적 변화

창상을 유발한 후, 창상유발 직후와 3일 후, 6일 후, 15일 후에 각 실험군에서 6마리씩 희생시켜 조직학적 소견을 얻었다(Table 3).

염증세포의 침윤정도는 모세혈관의 출혈정도와 호중구, 단핵구 및 림프구들과 같은 실험군 I 은 3일 후 moderate가 16.6%, severe가 83.3%였으며, 6일 후 moderate 33%, severe 66.6%, 15일 후에는 mild 16.6%, moderate 50%, severe 33.3%로 각각 나타났다(Fig. 3). 실험군 II의 경우 3일 후에는 mild 16.6%, moderate 50%, severe 33.3%였으며, 6일 후 mild 50%, moderate 33.3%, severe 16.6%, 15일 후에는 - 16.6%, mild 83.3%, moderate 16.6%로 조직학적 상태가 실험군 I 에 비하여 다소 개선효과가 있었다(Fig. 4). 실험군 III은 3일 째 mild 16.6%, moderate 66.6%.

severe 16.6%였으며, 6일째 mild 66.6%, moderate 33.3%였고, 15일째 - 16.6%, mild 83.3%, moderate 16.6%로 창상부 조직의 변화가 있었다(Fig. 5).

실험군 IV은 3일 후 mild 33.3%, moderate 50%, severe 16.6%였으며, 6일 후 - 16.6%, mild 66.6%, moderate 16.6%, 15일 후 - 16.6%, mild 83.3%로 창상부의 조직학적 변화가 개선되었다(Fig. 6). 실험군 III과 실험군 IV는 실험군 I 과 실험군 II보다는 측정기간 모두에서 창상치유 개선효과가 있는 것으로 관찰되었다.

Table 3. Histopathological in each groups.

Group	Time(day)	Micro lesion <sup>1</sup> (%)			
		_2	+ <sup>3</sup>	++ <sup>4</sup>	+++ <sup>5</sup>
I	0	0	0	0	6/6(100)
	3	0	0	1/6(16.6)	5/6(83.3)
	6	0	0	2/6(33.3)	4/6(66.6)
	15	0	1/6(16.6)	3/6(50)	2/6(33.3)
II	0	0	0	0	6/6(100)
	3	0	1/6(16.6)	3/6(50)	2/6(33.3)
	6	0	3/6(50)	2/6(33.3)	1/6(16.6)
	15	1/6(16.6)	4/6(66.6)	1/6(16.6)	0
III	0	0	0	0	6/6(100)
	3	0	1/6(16.6)	4/6(66.6)	1/6(16.6)
	6	0	4/6(66.6)	2/6(33.3)	0
	15	1/6(16.6)	5/6(83.3)	1/6(16.6)	0
IV	0	0	0	0	6/6(100)
	3	0	2/6(33.3)	3/6(50)	1/6(16.6)
	6	1/6(16.6)	4/6(66.6)	1/6(16.6)	0
	15	1/6(16.6)	5/6(83.3)	0	0

<sup>1</sup>: Hemorrhage and hyperemia in capillary and infiltration of inflammation cells; <sup>2</sup>: 0%; <sup>3</sup>: Slight to mild; <sup>4</sup>: Moderate; <sup>5</sup>: Severe



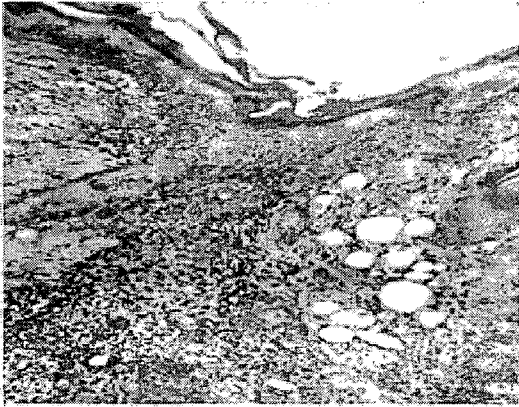


Fig. 3. On day 3 post wounding of diabetic control group I showed severe hemorrhage and hyperemia in capillary and diffuse infiltration of inflammatory cells.



Fig. 4. On day 3 post wounding of diabetic control group II showed severe hemorrhage and hyperemia in incisive wound region.

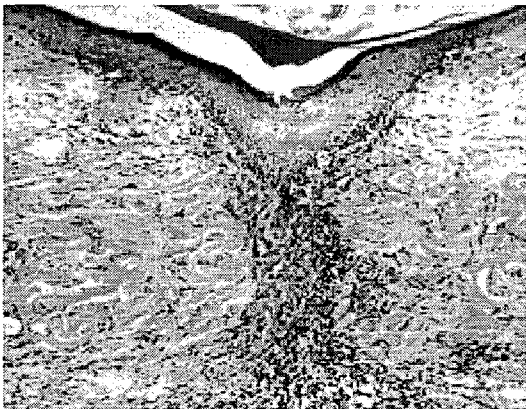


Fig. 5. On day 15 post wounding of chitosan powder application group III showed a V-shaped wound bed with a thin layer of collagenous tissue at the bottom. The depth of collagenous tissue became thin.

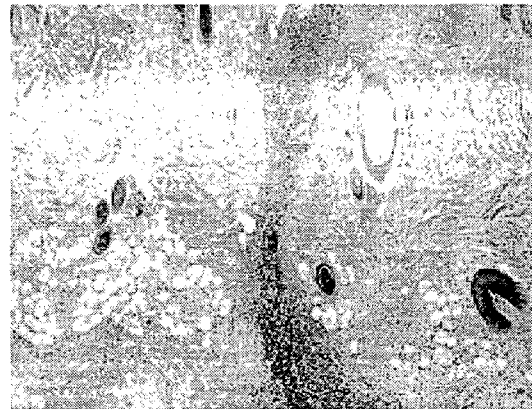


Fig. 6. On day 3 post wounding of chitosan application and 0.5 W/cm<sup>2</sup> SATA; treatment group IV, the inflammatory cells was decreased and width of incisive portion became more narrow than other group.

## IV. 고찰

당뇨병 발생에 가장 큰 원인이 되는 인슐린은 피부의 대사과정에 중대한 영향을 미치게 되는데, 이에 의해 급성 대사성 장애가 나타나기도 하고, 만성 퇴행성 변화가 환자의 피부에 변화를 유발하기도 한다. 당뇨병 환자들에게 있어서, 인슐린 결핍 상태나 인슐린 저항성으로 이미 이화작용이 증가되어 대사 장애를 더욱 악화시키며, 면역기능의 저하로 인해 균 감염의 위험이 높아지고 상처 치유의 지연으로 수술 후 회복에 어려움이 생긴다. 대사 장애에 따른 이화작용의 증가는 단백질 분해를 가중시키게 되어 수술 후 상처치유 및 회복에 해로운 영향을 미치게 된다(대한당뇨병학회, 1998).

스트렙토조토신으로 유발된 당뇨모델 백서에서 베타세포의 선택적인 파괴에 따른 인슐린 분비의 감소, 그리고 말초조직에서의 인슐린 저항성으로 고혈당과 체중감소 및 근 위축증이 유발되며, 인슐린수용체 후 과정의 포도당 수송체의 감소에 대해서는 많은 선행연구들에서 제시되고 있다(Garvey 등, 1989). 본 연구에서도 스트렙토조토신 30 mg/kg를 백서의 복강에 1회 주사한 후 3일 경과 후에 혈당 수치가 200 mg/dl 이상으로 나타나는 개체들을 대상으로 창상을 유발하였다.

창상치유과정은 손상된 부위의 기능과 형태를 손상 이전의 상태로 회복시키고자 하는 일련의 생체반응이다. 이러한 생체반응은 실질세포의 재생에 의해서 유도되는데, 상피성장인자(epidermal growth factor), 혈소판유래 성장인자(platelet derived growth factor), 섬유모세포 성장인자(fibroblast growth factor) 및 대식세포에서 분비되는 성장인자 등이 관여하는 것으로 알려져 있다(Holley, 1975). 창상치유에 관여하는 여러 기전들이 원활하게 이루어지기 위해서는 개체의 연령과 영양상태, 혈액학적 질환의 유무, 전신질환의 유무 등과 같은 신체 전반의 요인과, 손상부의 혈류순환 정도, 감염여부, 이물질의 침범여부 및 손상부의 조직학적 특성 등과 같은 국소적 요인이 관여하게 된다(Haydock와 Hill, 1987). 창상의 지연유합 및 부정유합은 하지의 당뇨병성 신경병증과 혈행장애에 의한 욕창에서 뿐만 아니라, 중증 화상환자와 숙주에 의한 피부감염 및 자가면역질환 등에 의해서도 유발된다(Pierce, 2001). 일반적인 창상치유의 과정은 손상에 의한 급성 염증반응의 유발, 실질세포의 증식, 실질세포와 결합조직 세포의 이동 및 증식, 세포외 기질의 합성, 조직기능을 회복하기 위한 실질성분의 재형성, 그리고 창상 강도에 도달하기 위한 결합조직의 재형성의 순서로 진행하게 된다. 창상조직의 치유를 지연시키는 인자들은 다양하지만, 당뇨병의 경우 창상부의 감염과 혈액공급의 장애 및 영양상태의 불균형에 따른 단백질 합성의 억제반응 등이 대표적이다(대한병리학회, 2000).

창상의 치유기전은 크게 3단계인 염증기, 육아조직 형성기, 기질형성 및 재구성기로 나눌 수 있다. 염증기는 창상 후 10일 정도까지 지속되는데 이 시기에는 중성백혈구가 주로 나타나는 초기와 단핵구가 많이 나타나는 후기로 다시 나눈다. 육아조직 형성기는 전기 염증기가 끝나는 창상 후 3일 전후에 시작하여 창상 후 15일 정도까지 지속되고 마지막 단계인 기질형성기 및 재구성기는 육아조직 형성기가 시작하자마자 곧 교원섬유 합성을 시작하면서 나타나게 되어 창상 후 100일 이후까지도 지속된다고 알려져 있다(Richard 등, 1985, Martinez 1987). 따라서 본 실험에서 시기를 결정함에 있어서는 Richard 등(1985)의 보고를 토대로 염증기가 진행되는 창상 후 3일, 염증기가 거의 끝나가고 육아조직 형성을 시작하는 창상 후 6일, 육아조직 형성이 끝나고 기질형성과 재구성기가 진행되는 창상 후 15일을 실험 시기로 결정하였다. 병리조직학적인 실험결과 상기의 일련에 따른 창상의 치유단계를 확인할 수 있었으며, 특히 초음파 치료와 키토산 처치를 병행한 4번 실험에서는 치유과정이 더욱 단축되는 것을 확인하였다.

초음파는 치료 시 사용되는 주파수, 강도 및 치료시간의 조절에 의해 다양한 결과를 산출한다. 그 이유는 초음파가 다양한 흡수계수를 가진 조직들을 통과하면서 주로 조직 내의 단백질과 세포막에 흡수되기 때문이다(이충휘 등, 1998). 비온열 효과를 강조하여 손상된 조직의 치유를 증진시키기 위한 치료 프로토콜이 아직까지 명백히 제시되어 있지는 않으나, Dinno 등(1989)의 연구 결과 조직 치유를 위한 실험적 연구에는 단속적 파장을 사용하는 것이 더 적절하다고 하였다. 또한 치료용 초음파는 저강도 ( $0.125 - 3 \text{ w/cm}^2$ )와 고강도 ( $\geq 5 \text{ w/cm}^2$ )의 두 가지로 분류되는데 저강도 초음파치료는 정상 생리학적 반응을 자극하고 손상시키며 피부로의 약물 투과와 같은 몇 가지 과정을 촉진시키고 고강도 초음파치료는 대조된 유형으로, 조직을 선택적으로 파괴한다(Harr 1999). Byl 등(1992)은 절개창에  $0.5 \text{ w/cm}^2$ 의 강도로 3일간,  $1.5 \text{ w/cm}^2$ 로 2일간, 1 MHz의 주파수로 맥동비 1:4 인 맥동성 초음파를 10분간 치료하여 대조군에 비해 교원섬유, 비만세포의 탈과립 증가 등을 보여 창상에 초음파 치료가 효과적임을 보고하였으나, 피하조직에 가해지는 용량을 고려하지 않은 처치방법으로 생각되며 표재성 치료를 위한 3 MHz 초음파를 사용하지 않았다는 문제점이 있다. 따라서 본 연구에서는 비온열 효과로 피부에 생리학적 반응을 촉진시키기 위해 3 MHz의 맥동성 초음파를  $0.5 \text{ W/cm}^2$  SATA<sub>i</sub> 용량으로 창상유발 후 24 시간 이후에 1일 1회씩 15일간 지속적으로 초음파를 적용하였다.

초음파는 현재 임상의학에 있어서 외과적, 치료학적, 진단학적 방법으로 개방창의 치유를 촉진하기 위해서 사용되어지며, 손상된 건과 신경과 뼈에 대해 치유를 향상시키기 위해 임상 및 실험학적으로 연구되었다(Nassbaum 등, 1994). Byl 등(1992)의 연구에 의하면 유카탄종 돼지(Yuctan mini pig)에 창상을 유발시키고 초음파로 3일 동안은  $0.5 \text{ w/cm}^2$ , 2일 동안은  $1.5 \text{ w/cm}^2$ 로 맥동비 1 : 4 로 치료한 결과 부분층 창상(partial-thickness incision lesion)에서는 대조군과 차이가 없었으나 전층 창상(full-thickness incision lesion)에서는 대식세포가 대조군보다 더 많이 나타나며 창상치유의 질적인 면에서도 유의하였다고 하였다. 본 실험에서도 실험군이 대조군에 비해 창상길이 변화율이 3일과 6일째에는 차이가 적었으나 12일 후에는 약 15% 정도의 유의한 차이를 보였다. 또한 염증세포의 감소도 대조군보다 더욱 촉진되었다. 이러한 선행논문들의 결과들은 본 연구의 결과와 동일하였다. Taskan 등(1997)의 연구에서 맥동성 초음파로 매일 7일간 5분씩  $0.1 \text{ w/cm}^2$  강도로 창상치유에 적용하였을 때 증식기를 일찍 가져와 가치료한 대조군보다 창상치유에 더 효과적이었다고 보고하였다. Young과 Dyson(1990)은 쥐에 창상을 유발하여  $0.1 \text{ w/cm}^2$ 의 강도로 맥동비 1 : 4, 3 MHz의 맥동성 초음파로 치료하여 가치료한 대조군에 비해 실험군에서 과립구, 다형핵 백혈구, 대식세포와 섬유모세포가 많이 관찰되었다.

창상치유를 위한 초음파 치료의 적용에 있어서, 대부분의 연구들에서 저빈도 초음파인 1 MHz를 사용하고 있는 실정이며, 그 결과 창상부의 효과적인 치료가 창상치유의 초기에 적용되지 못하고 있는 것이 현실이다. Lowe 등(2001)은 마우스를 대상으로 낮은 주파수(1 MHz)와 높은 주파수(3 MHz)를 사용하여 저강도 맥동성 초음파 치료를 5분간 동일하게 실시한 결과, 군간 상처회복의 정도가 별다른 차이가 없었다고 하였으나, 이는 피하용량을 고려하지 않고 시간을 제한적으로 사용하였기 때문으로 여겨진다. 본 연구에서는 고빈도 주파수를 사용하여  $0.5 \text{ W/cm}^2$  SATA<sub>i</sub>의 용량으로 당뇨 모델 백서의 창상치유에 적용한 실험군 모두에서 현저한 개선 효과를 확인하였으며,  $0.5 \text{ W/cm}^2$  SATA<sub>i</sub>의 용량으로 치료를 실시한 실험군 III과 실험군 IV에서 창상 길이의 감소 및 염증유발성 물질의 감소를 확인하였으며, 실험군 IV에서 보다 유의한 감소효과를 확인할 수 있었는데, 이는 키토산 분말 도포에 따른 병행효과로 여겨진다. 이러한 결과는 표재성 창상치유에 있어서 고빈도 초음파가 저빈도 초음파보다 효과적이라는 Karmer(1984)의 보고와 일치한다. Young과

Dyson(1990) 및 Taskan 등(1997)은 높은 주파수를 사용한 저강도 치료가 창상초기 염증반응의 억제에 효과적이라고 하였으며, Byl 등(1993)의 연구에서도 저강도 초음파 치료가 창상치유를 가속화시킨다고 보고하였다. 본 연구에서도 정상백서의 창상치유 과정과 당뇨모델 백서의 창상치유 실험에서 0.5 W/cm<sup>2</sup> SATA<sub>i</sub>의 저용량으로 치료를 실시한 결과, 염증세포의 침윤과 교원섬유의 재분포 정도가 초음파를 적용하지 않은 대조군에 비하여 효과적이었음을 알 수 있었다. 또한 창상의 수축, 조직학적 변화 등의 결과 창상국소부위에 키토산을 병행 처리한 실험군에서 초음파 단독 처리군에 비해 유의성(P>0.05)있는 창상치유효과를 확인하였는데, 이와 같은 결과는 물리적인 치료법으로 초음파 치료와 국소부위면역증강 작용이 있는 키토산 병행치료가 더욱 효과적임을 입증하였다.

키토산과 초음파의 병행치료에 의한 효과에 대한 기전은 명확하게 밝혀져 있지 않으며, 이와 관련한 연구 또한 드문 실정이다. 하지만 키토산과 초음파가 창상치유에 미치는 효과에 대한 개별적 연구들은 과거에서부터 현재에 이르기까지 활발하게 진행되고 있다. 창상치유 초기에 창상부의 외부 침입물들은 다형핵백혈구(polymorphonuclear leukocyte; PMN)들의 침윤에 의해 제거되며 (Scott et al, 1995), 이때 키토산은 다형핵백혈구들의 침윤을 가속화시키는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Okamoto 등, 1995, Ueno 등, 1999). 당뇨병에 있어서 창상부의 지연유합은 중요한 합병증 중의 하나이다. 키틴은 N-acetylglucosamine의 기본구조가 반복되어 이루어진 물질로 acetyl-amide 기와 amine 기의 두가지 기능성 기를 가지고 있다(Robert 1992). Okamoto 등(1992)은 키틴이 혈관 신생화를 동반한 육아조직의 형성과 삼출물의 생성을 유도한다고 하였다. 본 실험의 조직학적 관찰에서는 대조군에 비하여 키토산을 분말도포한 군에서 신속한 상피화가 진행되는 것을 알 수 있었으며, 창상의 교원질 섬유가 규칙적이고, 섬세하며, 순서 있게 배열되어 주위의 교원질 섬유의 비슷한 양상을 보였다. Muzzarelli(1992)는 키틴의 n-acetyl-glucosamine이 대식세포의 리소자임에 의해 oligomer와 monomer로 분해되어 교원질 섬유의 규칙적인 배열을 유도한다고 하였으며, Okamoto 등(1995)은 키틴과 키토산을 처리한 개방창에서 보다 미세한 교원질 섬유가 합성된다고 하였으며, 본 실험에서도 이와 일치하는 결과를 확인하였다. 이러한 결과로 볼 때, 키토산이 창상치유를 가속화시킨다는 것을 알 수 있었으나, 창상치유에 관련되는 peptide 등의 분자생물학적인 연구 등 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구진의 실험결과 실제 임상에서 당뇨병환자의 창상치유를 위해서도 초음파치료법이 적극 검토되어야 할 것이며, 초음파와 같은 물리치료 기법 이외에도 최근 세계적으로 각 분야에서 널리 사용되는 키토산과 같은 기능성 소재 또한 우리 물리치료학에서도 적극 활용할 수 있다는 측면에서 시사하는 바가 크다 할 수 있다.

## V. 결론

본 연구는 스트렙토조토신으로 유도된 당뇨백서 모델에서 맥동성 초음파와 키토산 분말도포가 급성 창상치유과정에 미치는 효과에 대하여 알아보고자 실시하였으며, 실험 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

초음파 강도에 따른 조직학적 변화는 0.5 W/cm<sup>2</sup> SATA<sub>i</sub> 치료군에서 효과적이었으며, 키토산 분말 도포와 병행하였을 때 일반 초음파 치료군보다 염증세포의 침윤정도가 유의한 차이가 있었다 (p<0.05). 또한 0.5 W/cm<sup>2</sup> SATA<sub>i</sub> 치료군에서 교원섬유의 배열과 창상부 조직의 신생혈관 재형성과정에 기능적으로 작용하였으며, 키토산 분말도포와 병행적용 시 보다 효과적이었다.

이상의 결론을 볼 때, 3 MHz 맥동성 초음파를 사용하여 0.5 W/cm<sup>2</sup> 용량으로 당뇨모델의 급성 창상을 치유하는 것이 초음파 치료를 실시하는 것보다 효과적인 것으로 여겨지며, 이러한 급성 창상 시 키토산 분말도포를 병행하여 실시하는 것이 당뇨병의 합병증 중 하나인 창상치유의 지연 유향을 보다 효과적으로 개선하였다.

## 참고문헌

- 김진호, 이청기 : 견관절 극하와 부위에서 초음파에 의한 조직온도 상승효과. J Korean Acad Rehab Med, 14(1): 128-137, 1990.
- 대한당뇨병학회 : 당뇨병학, 제 2판, 고려의학: 617-626, 1998.
- 대한병리학회 : 병리학, 제 4판, 고문사: 55-68, 2000.
- 이충휘, 김종만, 황태선 : 저강도 초음파치료의 골절치유효과. 한국전문물리치료학회지, 5(3): 34-41, 1998.
- 조용남, 정상훈, 유결 등 : 탈아세틸화된 키틴이 백서 창상치유능력에 미치는 영향. 대한성형외과학회지, 26(5): 1014-1019, 1999.
- 平田幸正 : 당뇨병의 진단과 치료. 서광의학, 1-30, 1994.
- Andressen TT, Oxlund H : The influence of experimental diabetes and insulin treatment on the biomechanical properties of rat incisive wounds, Acta Chirurgica Scandinavica, 153: 405-409, 1987.
- Byl NN, McKenzie AL, West JM et al. : Low-dose ultrasound effects on wound healing: A controlled study with yucatan pigs. Arch Phys Med Rehabil, 73: 656-664, 1992.
- Byl NN, McKenzie A, Wong T et al. : Incisional wound healing: A controlled study of low and high dose ultrasound. JOSPT, 18(5): 619-628, 1993.
- Copray S, Liem R, Brouwer N et al : Contraction-induced muscle fiber damage is increased in soleus muscle of streptozotocin-diabetic rats and is associated with elevated expression of bruin-derived neutrophilic factor in RNA in muscle fibers and activated satellite cells. Exp Neurol, 161: 597-608, 2000.
- Darby IA, Bisucci T, Hewitson TD et al. : Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. Int J Biochem Cell Biol, 29(1): 191-200, 1997.
- Dinno MA, Dyson M, Yound SR et al. : The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound. Phys Med Biol, 34(11): 1543-1552, 1989.
- Dyson M : Mechanism involved in therapeutic ultrasound. Physiotherapy, 73(3): 116-120, 1987.
- Garvey WT, Huecksteadt TP, Birnbaum MJ : Pretranslational suppression of an

- insulin-responsive glucose transporter in rats with diabetes mellitus. *Science*, 245: 60-63; 1989
- Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray MJ et al. : PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am J Pathol*, 136: 123s-124s, 1990.
- Harr GT: Therapeutic ultrasound. *Eur J Ultrasound*, 3-9, 1999.
- Hoffmeister FS, Wenner C, Wilkens HJ et al. : Effect on N-acetyl-D-glucosamine on wound healing of surgical wounds and on mitochondrial phosphorylation uncoupled by dinitrophenol. *Surg*, 56: 1129, 1964.
- Holley RW : Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature*, 258: 487; 1975.
- Hunt TK : In Wound healing and wound infection: Theory and surgical practice. Appleton-Century-Crofts, New York, 192-193, 1980.
- Karmer JF : Ultrasound : Evaluation of its mechanical and thermal effects. *Arch Phys Med Rehabil*, 65: 223-227, 1984.
- Lowe AS, Walker MD, Cowan R et al. : Therapeutic ultrasound and wound closure: Lack of healing effect on X-ray irradiated wound in murine skin. *Arch Phys Med Rehabil*, 82: 1507-1511, 2001.
- Martinez IR : Wound healing ultrastructural aspects. *Clinics Dermatol*, 5: 37-55, 1987.
- Muzzarelli R : Role of lysozyme and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in the resorption of wound dressing. In Brine Cj, 1st ed, New York, Elsevier Applied Sci, 25, 1992.
- Nassbaum EL, Biemann I, Mustard B : comparison of ultrasound/ultraviolet-C and laser for treatment of pressure ulcers in patients with spinal cord injury. *Phys Ther*, 74(9): 812-823, 1994.
- Okamoto Y, Minami S, Matsushashi A et al. : Application of chitin and chitosan in small animal. In Brine Cj, 1st ed, New York, Elsevier Applied Sci, 70, 1992.
- Okamoto Y, Shibasaki K, Minami S et al. : Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs. *J Vet Med Sci*, 57: 851-4, 1995.
- Oshima Y, Nishin K, Yonekura Y et al. : Clinical application of chitin nonwoven fabric as wound dressing. *Eur J Plast Surg*, 10: 66; 1987.
- Pierce GF: Inflammation in nonhealing diabetic wounds : The space-time continuum does matter. *Am J Pathol*, 159(2): 399-403; 2001.
- Richard AF, Clark MD, Denver CD : Cutaneous tissue repair: Basic biologic consideration. *Am Acad Dermatol*, 13: 701; 1985.
- Robins SL, Cotran RS, Kumar V : Pathologic basis of disease. WB Saunders company, 5th ed: 907-922, 1994.
- Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Muller and Kirk's small animal dermatology. Philadelphia, USA, Saunders, 5th ed: 70-78, 1995.
- Taskan I, Ozyazgan I, Tercan M et al. : A comparative study of the effect of ultrasound and electrostimulation on wound healing in rats. *Plast Reconstr Surg*, 100: 966-972, 1997.
- Ueno H, Yamada H, Tanaka I et al. : Acceleration effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*. 20: 1407-1414, 1999.

WHO Study Group , 1985

Young SR, Dyson M : Effect of therapeutic ultrasound on the healing on full-thickness excised skin lesions. *Ultrasonics*, 28: 175-180, 1990.

Yano H, Iriyama K, Nishiwaki H et al . : Effects of N-acetyl-D-glucosamine on wound healing in rats. *Mie Med J*, 35: 53, 1985.