pISSN 1598-298X
J Vet Clin 30(4) : 241-246 (2013)

Journal of Veterinary Clinics
www.ksvc.or.kr

원숭이에서 피부 창상 치유에 대한 키토산의 효과

변홍섭 · 이수진 · 이재일 · 김무강 · 신남식* · 김명철[1]
충남대학교 수의과대학, *서울대학교 수의과대학

(게재승인: 2013년 8월 8일)

Effects of Chitosan on Wound Healing in Monkeys

Hong-Seob Byun, Soo-Jin Lee, Jae-Il Lee, Moo-Kang Kim, Nam-Shik Shin* and Myung-Cheol Kim[1]

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
**College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*

Abstract : The objective of this study was to investigate the effects of implanted chitosan applied to surgically created wound in Japanese Macaque monkeys. 4 healthy Japanese Macaque monkeys were used. A 4 cm straight skin incision was made and undermined skin (4 × 4 cm) over on the 2 monkeys both sides of the dorsal midline, and a 4 cm circular skin incision was made on 2 monkeys both sides of the dorsal midline. One wound (left side) was implanted 1 mg (straight incision) and daily 0.2 mg (circular incision) of cotton type chitosan and the other wounds were treated with normal saline (3 ml) in monkeys. Each straight wound was closed with two interrupted sutures of 2-0 sutures. The monkey's circular skin incision is opened. At 14 days after initial wounding, each wound was taken for histological observations in monkeys. The inflammatory cells in the chitosan group are observed less than the control group, the collagen and the fibrin in the chitosan are observed more than the control group in monkeys. So the wound healing is moderately enhanced for chitosan treatment. The fibroblasts and the capillaries increased for chitosan treatment. The treatment of chitosan in wound is to promote healing.

Key words **:** skin, wound healing, monkey, chitosan, histological observation.

서 론

키토산(chitosan, 1-4, 2-amino-2-deoxy-β-D-Glucan)은 곤충 또는 새우, 가재, 게, 바다가재 등 갑각류의 껍데기에 들어있는 키틴(chtin, N-acetyl glucosamine, β-1,4 gulcoside bonding)을 고온의 강알칼리로 탈아세틸화시켜 정제한 탄수화물 고분자 물질로 무색의 비결정성 분말이다(1-3,20). 1811년 프랑스의 자연사학자 Henry Braconnot가 버섯에 포함되어 있는 키틴을 처음 발견하였으며, 1859년 화학자 Charles Rouget가 키틴을 탈아세틸화하여 새로운 물질을 얻어냈으며, 1894년에 독일의 생화학자 Hoppe Sayler가 이를 키토산이라 명명하였다. 키토산은 생체 조직을 구성하고 있는 글루코사민의 복합체로 생물적합성이 우수하고 부작용이 적은 물질이다(16,27).

키틴은 자연계에 존재하는 동물성 식이섬유이며, 지방과 중금속 등을 흡착하는 특성을 가지고 있어 그 이용 가치 및 적용이 기대되고 있는 물질이다(28). 예로부터 동양에서는 찰과상의 치료에, 서양에서는 칼에 베인 상처에 사용되어 왔으나, 분자 결합이 강하고 단단하며 불용성의 성질을 갖기 때문에 일반적으로 키토산으로 만들어 이용하고 있다. 동물체에서의 특성은 세포를 활성화하고, 면역력 증강과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(10,34,39). 또한 콜레스테롤 저하 작용, 항암 작용, 혈압 상승 억제 작용, 혈당 조절, 간 기능, 중금속 배출, 창상 치유, 뼈의 재생, 항생제 효과 등 여러 분야에서 연구가 이루어지고 있다(18,23,25,33,35,37,40,43,48). 그러나 그 정확한 작용기전은 아직 완전히 규명되지 않았다.

글루코사민($C_6H_{13}NO_6$)은 무색의 바늘 모양 결정으로 된 아미노당으로, 동식물과 미생물의 다당류, 특히 뮤코다당, 당단백질 및 당지질의 구성성분으로 물에 녹는 강염기성 물질이다. 글루코사민을 얻는 주원료는 새우, 게, 바닷가재 등 갑각류와 굴 껍데기의 키틴에서 얻는다. 글루코사민은 동물체 내에서도 합성되는데, 포도당과 글루타민으로 합성되는 아미노당이다. 세균의 세포벽, 동물의 연골이나 피부를 구성하는 뮤코다당 등 다당류의 성분으로 널리 분포한다. 그러나 일반 당질처럼 에너지원으로 사용되기보다 뼈, 인대, 피부, 건, 눈, 손톱 등의 신체 조직을 만드는데 주로 쓰인다(17). 독일에서는 1960년대부터 글루코사민을 퇴행성관절염 환자에게 처방

[1]Corresponding author.
E-mail : mckim@cnu.ac.kr

하기 시작했다.

키토산은 동물체 조직과 유사한 glucosamine 결합으로 되어 있어 생체 적합성이 우수하며, 생분해되어 독성이 없으며 금속 이온을 킬레이트화하고, 용액, 분말, 박편, 겔, 얇은 필름 등 다양한 형태로 상품화 되고 있으며, 특이한 화학구조와 생물학적 성질로 인하여 다양한 분야의 생체 재료로 사용되고 있다.

키틴과 키토산은 창상의 치유에서 편리하고 유익한 생물학적 특성을 갖는데, 생물 적합성, 생물 분해성, 지혈작용, 항염 작용(32,39), 골 형성과 밀도 증가(5,6), 창상치유 촉진(39,42,44,48) 등이 그것이다. Kojima 등(21)은 쥐에서 창상치유 초기에 키틴 또는 키토산으로 충진한 polyester non-woven fabric을 적용하여 안정적으로 콜라겐을 합성시킨다고 하였다. 소와 면양에서 천지굴근건에 대한 키틴의 섬유증식 및 창상 강도의 증대도 보고되었다(30,36).

키토산은 글루코사민 결합으로서 동물의 창상 회복에 대한 임상 적용 가능성이 우수하고, 생체와 유사한 특성 때문에 창상 치유에 콜라겐과 피브린 형성을 촉진하고, 섬유아세포 형성과 혈관 생성을 촉진하는 작용을 한다(4). 최근에는 응용하기 편리한 수용성 키틴에 관한 연구도 활발하게 이루어지고 있다(23).

일본원숭이는 긴꼬리원숭이아과에 속한다. 긴꼬리원숭이아과의 원숭이들은 인류 질병에 대하여 질병 모델 동물로써, 그리고 동물의 생태, 생리, 행동 등에 대한 자연 연구에 다양하게 이용되고 있다(24).

동물원에서 사육하는 원숭이들은 좁은 공간 내에서 서열 경쟁 등의 다툼으로 인하여, 외상을 입는 경우가 많은 실정이다(15). 또한 원숭이에서 피부 부속기(integumentary system)와 연관된 모든 계통에서의 의료 처치에 대한 가장 흔한 원인은 피부에 대한 외상 (열상 및 찰과상)이다. 열상은 통상 서열 다툼으로 발생하지만, 울타리 구조물(cage wire 또는 metal edges 등)에 의해서 발생할 수도 있다(15). 그러나 외상으로 인한 창상 치유를 촉진하는 처치에 관한 연구 보고는 드문 편이다. 이에 일본 원숭이에서 키토산의 창상 치유에 대한 효과를 알아보고자, 피부에 창상을 유발하고 키토산을 적용하였다.

재료 및 방법

실험 동물

임상적으로 건강한 성숙한 수컷 일본원숭이(Japanese Macaque, *Macaca fuscata*) 4 두를 실험에 사용하였다.

전처치와 마취

실험동물은 마취 전 24 시간 절식시켰고, 물은 공급하였다. 전마취제로서 atropin sulfate(황산아트로핀®, 대한약품, Korea) 0.04 mg/kg을 피하주사하고, tiletamine-zolazepam (Zoletil®, Virvac, France) 4.4 mg/kg을 근육주사로 투여하였다.

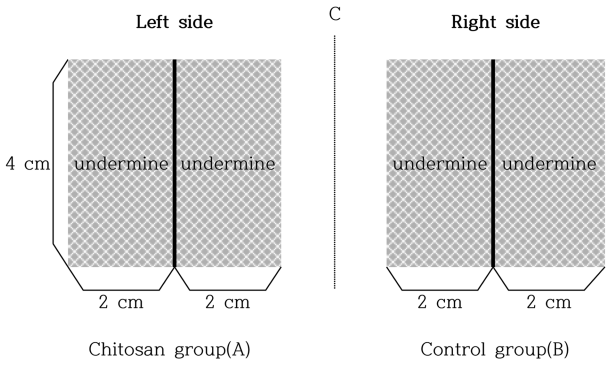

Fig 1. Schematic illustration of wounds (4 × 4 cm) on both sides of the dorsal midline (C) of each Japanese Macaque. In each Japanese Macaque, left side was treated with chitosan cotton (A, Chitosan group), right side was treated with saline (B, Control group).

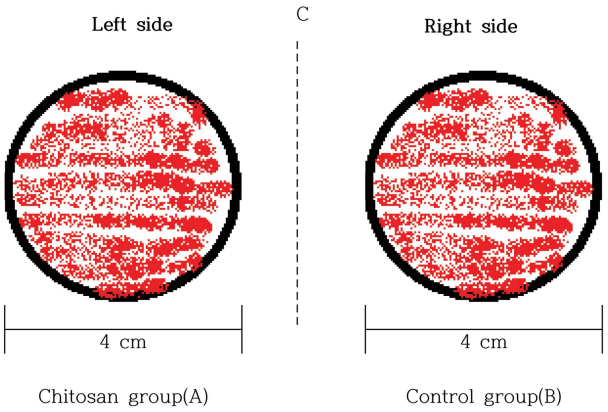

Fig 2. Schematic illustration of round open wounds (diameter: 4 cm) on both sides of the dorsal midline (C) of each Japanese Macaque. In each Japanese Macaque, left side was treated with chitosan cotton (A, Chitosan group), right side was treated with saline (B, Control group).

창상의 형성과 키토산 처리

2 두의 일본원숭이의 등 쪽 정중선의 양쪽 측면 피부에 세로로 4 cm의 직선 피부 전층 절개를 실시하고, 피하직을 4 × 4 cm 크기로 박리하였다(Fig 1). 정중선 좌측은 실험군으로 하여 1 mg의 면구상 키토산(Chitopack® C, Eisai, Japan)을 삽입하였고, 정중선 우측은 대조군으로 하여 3 ml의 생리식염수를 적용하였다. 각 창상은 2-0 봉합사로 단순결절봉합하여 폐쇄하였다.

다른 2 두의 일본원숭이는 지름 4 cm의 원형 개방창상을 만들고, 매일 0.2 mg의 면구상 키토산(Chitopack® C, Eisai, Japan)을 적용하고, 대조군은 매일 3 ml의 생리식염수를 적용하였다. 절개부는 봉합하지 않고 개방창을 유지하였다(Fig 2).

창상은 두 그룹 모두 실험 14일에 전처치와 마취 방법에 따라 마취하고, 조직학적 검사를 위하여 창상들을 절제한 후, povidone iodine으로 소독하였다.

조직학적 검사

창상 후 14 일에 절제한 조직들은 formalin에 24 시간 고정하고, 고정된 조직의 정중면을 절단하여 4 시간 동안 washing한 후 Zenker's solution에 36 시간 고정하였다. 다시 12 시간 동안 washing하여 탈수하고, 파라핀으로 포매하여 5 μm 두께로 절단하였으며, 창상 수복 과정인 결합섬유 형성 부위를 관찰하기 위하여, Heidenhain's Azan-Carmine Blue 법으로 염색하였다.

술 후 처치

창상 유발 후 14 일에 조직 검사를 위하여 창상 조직을 절제한 후, 창상 부위를 2-0 봉합사로 결절 봉합하여 폐쇄하고, 감염 예방을 위하여 황산겐타마이신 5 mg/kg을 투여하였다.

결 과

실험 결과 직선으로 절개하여 창상을 유발한 그룹에서는 외관상 봉합된 선을 따라 접합이 잘 이루어졌다. 조직학적으로는 대조군에서 콜라겐과 피브린이 창상을 따라 집중되어 있고 창상부위는 함몰되어 있었다. 또한 표피에서는 상피가 얇았고, 각질화도 얇게 진행되었으며 진피에서는 피브린이 창상 부위를 따라서 분포하였다(Fig 3).

키토산 처리군에서는 진피에서 콜라겐과 피브린이 창상 주위로 고르게 분포되어 있었다. 표피 부위는 상피가 두꺼웠으며, 다수의 각질 과립이 존재하였고, 과립층과 가시층이 두꺼웠다(Fig 3). 키토산 처리군에서 창상의 수복이 더 광범위하고, 빠르게 진행되었다. 또한 실험 14 일까지 키토산 처리군이 대조군에 비하여 창상부위가 더 단단하고 결합력이 강한 것을 나타났다.

원형으로 창상을 유발한 그룹에서는 직선으로 창상을 유발한 그룹에 비하여 외관상, 조직학적으로도 창상의 수복이 덜 이루어졌다. 그러나 원형창상을 유발한 대조군과 키토산 처리군을 비교하여 볼 때, 대조군에서는 고유층 내 결합조직이 풍부하며 표피 밖으로 돌출되어 있으며, 피하에 모낭과 같은 외피기관이 관찰되지 않고, 피하충혈이 있으며, 염증소견이 다수 발견되었다. 표피는 상피와 각질이 얇고, 고유층과 피하조직과의 경계가 불분명하였다. 진피를 이루는 콜라겐이 뭉쳐서 굵은 섬유를 이루고 분화되어 있었다. 피브린이 진피 가운데 간헐적으로 분포하였고, 피하에 혈액이 충혈되어 있었으며, 혈관 주위로 액체와 세포로 이루어진 물질이 관찰되었다(Fig 4).

키토산 처리군에서는 창상 주위의 외피 상피에 비해 창상을 수복하고 있는 상피가 두텁게 형성되어 있고, 각질층도 두텁게 형성되어 있었다. 고유층 유두와 표피가 피하로 깊이 함입되어 있었다. 진피층에서는 깊은 고유층 유두가 관찰되었으며, 모낭이 관찰되었다. 또한 콜라겐과 피브린이 고르게

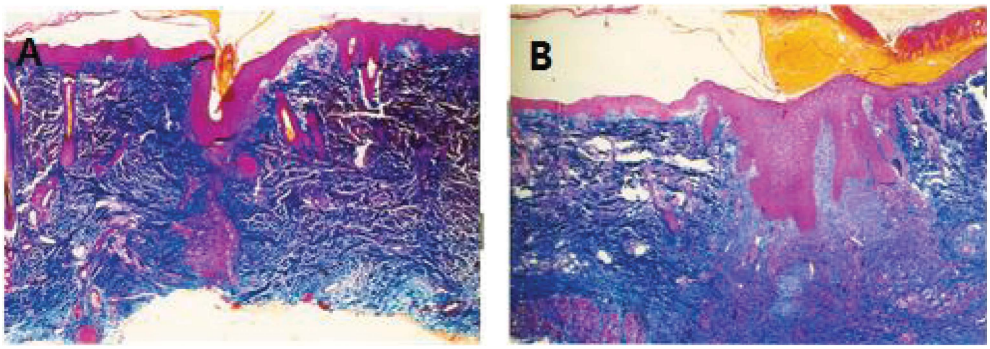

Fig 3. Photomicrograph of rectilinear wound group at post wounding day 14. Chitosan groups (B) have much collagen and fibrin, and strong to control group (A) (Heidenhain's Azan-Carmine blue stain, × 40).

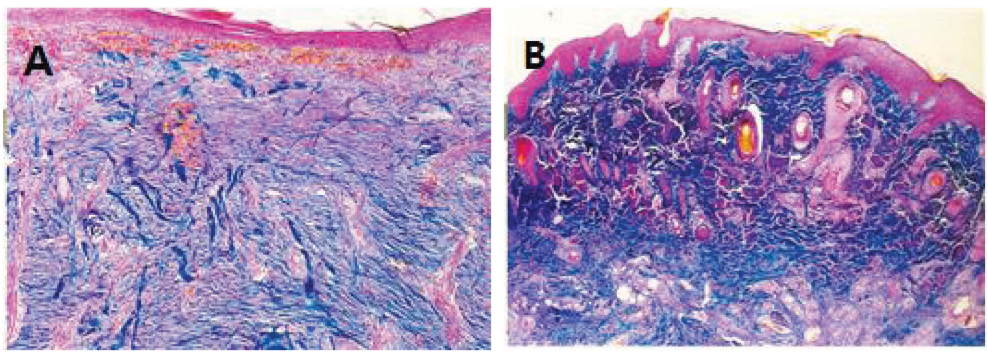

Fig 4. Photomicrograph of round wound group at post wounding day 14. Chitosan groups (B) have much collagen and fibrin to control group (A) (Heidenhain's Azan-Carmine blue stain, × 100).

분포되어 있고, 섬유모세포들도 활성화되어 있었다(Fig 4). 이는 키토산 처리군에서 창상의 수복이 대조군에 비하여 더 빠르게 진행되고 있음을 나타낸다.

고 찰

일본원숭이에서 창상 치유에 대한 키토산의 효과를 알아보기 위하여 수행된 본 연구에서, 피부에 직선 창상과 원형 창상을 유발한 후에 키토산의 적용 효과를 알아보았다. 직선 창상에서 키토산 처리군은 대조군에 비하여 상피가 더 두터웠으며, 각질과립이 많고 과립층과 가시층이 두꺼웠다. 또한 진피에서는 대조군에서 피브린이 창상을 따라서 뭉쳐 있는데 비하여, 키토산 처리군에서는 피브린이 넓게 분포하여 창상이 더 건강하고 수복이 빠름을 나타내었다.

원형 창상에서도 키토산 처리군이 대조군에 비하여 상피와 각질층이 더 두껍게 형성되었다. 또한 고유층 유두와 표피가 피하로 함입되어 있었다. 진피에서는 키토산 처리군이 콜라겐과 피브린이 고르게 분포되어 있고 섬유모세포들이 활성화되어 있었으나, 대조군에서는 콜라겐이 뭉쳐서 굵은 섬유를 이루고 분화되어 있으며 피브린은 가끔 관찰되었고 피하에 충혈 소견이 있고 염증이 관찰되었다. 이는 Okamoto 등(35)이 개에서 개방창상에서 염증을 관찰한 결과와 유사하며, 키토산 처리가 창상에서 자극을 덜 일으키고 피부 재생을 촉진한다는 것을 나타낸다.

대조군과 비교하여 키토산을 처리한 군에서는 창상의 형태와 관계없이 콜라겐 및 피브린의 침착이 증가하였고, 외관상 창상의 수복도 더 빨라서 양호한 결과를 나타내었다. 원형 창상은 직선의 창상에 비하여 수복이 느리지만, 같은 원형창상에서는 대조군에 비하여 키토산 처리군이 창상의 수복이 더 빠르게 진행되었고, 염증 소견도 거의 발견되지 않았다. 이는 창상의 종류와 관계없이 저분자 키토산이 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 macrophages에서 arginase pathways를 적절하게 활성화시키는 것과 관련이 깊다(39). 즉, 키토산의 healing activity는 창상과 관련된 염증부위에서 arginase 활성을 강화시키기 때문이다.

원형 창상은 피부가 결손되고 창연을 수복하기 어려운 점 때문에, 창상의 치유에 있어서 가장 예후가 좋지 않다. 결손된 피부 부위에는 결손부의 피부가 부족하여, 창상부위가 외부로 노출되고 출혈이 지속되는 경향이 있다. 본 연구에서도 원형 창상의 유발 후, 출혈에 대하여 따로 측정하지는 않았으나 직선형 창상에 비하여 출혈이 많이 발생하였다. 출혈에 키토산 드레싱은 출혈을 감소시킨다(9,13,22,31,38,46,47). 창상의 처치에서 처음으로 실시하는 처치가 지혈이므로, 창상 치료제로서의 키토산의 이용은 피부뿐만 아니라 간, 신장, 근육 같은 모세혈관이 많은 장기에 드레싱으로서도 가치가 있다. 이는 향후 염증의 수복을 위한 처치에도 이익이 되는 일련의 과정으로서 유용하다. 키토산은 비교적 대형의 혈관 손상에도 드레싱으로 이용되고 있다(7,8,11,12,19,26,45). 본 실험에서도 원형 창상의 유발 후, 키토산의 지혈 작용이 창상의 초기 치유에 어느 정도 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

창상 유발 14 일에 키토산 처리군이 대조군에 비하여 섬유아세포가 더 많이 생성되었고 혈관의 신생이 더 많았으나, 그 이후에는 더 낮은 결과를 보였다. 이는 chitin을 개에서 피하에 삽입하여 4 일에 관찰한 결과 혈관 신생의 화학적 매개체인 prostaglandin E_2가 초기에는 증가하나(29), 키토산이 lipopolysaccharide 처리된 RAW 264.7 macrophages에서는 최종적으로 prostaglandin E_2(PGE2)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 과형성을 억제하고 항염증성 cytokines, IL-10의 증가와 관련인 있다는 것을 나타낸다(10).

피부는 표피와 진피로 구성되어 있다. 표피는 각질화된 중층편평상피(keratinized stratified squamous epithelium)이며, 혈관이 분포하지 않는다. 표피를 구성하는 세포들은 주로 각질화 세포들로 구성되어 있으며, 진피 쪽으로부터 바닥층(stratum basale), 가시층(stratum sponosum), 과립층(stratum granulosum), 투명층(stratum lucidium), 각질층(stratum corneum)으로 구분한다. 창상은 이러한 각각의 조직들에서 상피의 증가, 섬유소, 콜라겐, 섬유아세포, 혈관의 형성 등이 이루어지며 치유가 된다. 이러한 창상의 수복은 치유의 수용자 요인, 창상의 특징, 외적 요인들에 영향을 받는다(16,41). 창상 부위에서 콜라겐의 합성에 대한 키틴과 키토산의 연구에 의하면, 창상 발생 4 일까지는 prolyl hydrocylase activity가 낮았으나, 키틴을 처치하면 창상 발생 7 일에 prolyl hydrocylase activity가 급격히 증가하여 창상 발생 14 일까지 유지하였고, 키토산을 처치하면 창상 발생 7 일에서 14 일까지 지속적으로 prolyl hydrocylase activity가 증가하여 콜라겐 합성에 영향을 미쳤다(21).

봉합창에서는 육아조직이 채워야 할 빈 공간이 없으므로 양호한 창연 병치가 이루어져 24-48 시간에 대부분 직접적으로 상피화가 이루어진다. 그러나 개방창에서 통상적으로 4-5 일간의 육아조직이 형성된 후에 상피화가 이루어진다. 따라서 원형 창상 같은 개방창은 직선형의 봉합 창상에 비하여 회복이 느리다.

원숭이는 원숭이들의 군집이 새로 형성되거나 새로운 원숭이가 군집에 들어올 경우, 서열 다툼으로 인한 창상이 흔하게 발생된다(14). 원숭이들은 치아가 발달되어 있어서, 서열 다툼 시에 심한 외상을 입는 경우가 종종 발생한다. 이로 인하여 깊은 창상이 발생할 경우에는 화농으로 발달되어 중증 질환 또는 폐사에 이르는 경우도 있다. 본 연구에서 키토산 스펀지는 창상 치유를 촉진시키는 작용을 나타내므로 원숭이에 발생하는 심한 외상에 적용하면 양호한 치유를 유도할 수 있을 것으로 생각된다.

외상에 의하여 물리적 손상을 받게 되거나, 외과 수술을 진행함에 있어 인위적인 창상의 유발은 필연적이다. 이러한 외상의 수복에서 피부와 건, 근육의 창상 치유는 전체 질병의 치료에 있어 중요한 요소이다. 따라서 창상을 얼마나 빨리 수복하는가에 따라 질병의 경과가 달라질 수 있다. 키토산은 이러한 창상의 수복에 콜라겐과 피브린 침착, 섬유아세포의 증가, 모세 혈관의 생성, 염증의 완화에 일정한 역할을

수행하는 것으로 생각된다.

결 론

일본원숭이에서 직선형의 창상을 유발하고 키토산을 적용하여 봉합하고, 원형 창상을 유발하여 개방창을 유지한 채 키토산을 적용하였다. 창상의 종류와 관계없이 키토산을 투여한 창상 조직에서는 염증세포가 전반적으로 적게 관찰되었으며, 콜라겐과 피브린 침착이 많이 이루어져 창상의 회복이 촉진되었다. 섬유아세포의 침착과 맥관의 형성도 키토산 처리로 촉진되었다. 이와 같은 점을 고려할 때, 원숭이의 창상 형태와 관계없이 창상의 수복에서 키토산은 긍정적인 역할을 한다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2012R1A1A2001573).

참 고 문 헌

1. 구영. 이온 빔 조사 처리된 키토산 스펀지의 세포적합도에 관한 연구. 대한치주과학회지 1998; 28: 281-291.
2. 김옥수, 정현주. 키토산이 배양 중인 치주인대세포에 미치는 영향. 대한치주과학회지 2001; 31: 163-180.
3. 김옥수, 정현주. 키토산이 치은섬유아세포에 미치는 영향. 대한치주과학회지 2002; 32: 235-247.
4. 변홍섭, 김명진, 이재연, 조성환, 박창식, 김명철. 돼지에서 창상 치유에 대한 키토산의 영향. J Vet Clin 2007; 24: 114-118.
5. 이창균, 황정효, 이용무, 구영, 류인철, 이승진, 한수부, 최상묵, 정종평. RGD 펩타이드로 표면 개질된 키토산 막의 생물학적 영향. 대한치주과학회지 2003; 33: 27-35.
6. 정의원, 서종진, 최성호, 조규성, 채중규, 김종관. 백서 두개골 결손부에서 키토산의 골조직 재생 유도 효과. 대한치주과학회지 2000; 30: 851-870.
7. Acheson EM, Kheirabadi BS, Deguzman R, Dick EJ Jr. Holcomb JB. Comparison of hemorrhage control agents applied to lethal extremity arterial hemorrhages in swine. J Trauma 2005; 59: 865-874.
8. Alam HB, Chen Z, Jaskille A, Querol RI, Koustova E, Inocencio R, Conran R, Seufert A, Ariaban N, Toruno K, Rhee P. Application of a zeolite hemostatic agent achieves 100% survival in a lethal model of complex groin injury in swine. J Trauma 2004; 56: 974-983.
9. Arnaud F, Teranishi K, Tomori T, Carr W, McCarron R. Comparison of 10 hemostatic dressings in a groin puncture model in swine. J Vasc Surg 2009; 50: 632-639.
10. Chou T, Fu E, Shen E. Chitosan inhibits prostaglandin E_2 formation and cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-treated RAW264.7 macrophages. Biochem Biophys Res Commun 2003; 308: 403-407.
11. De Castro GP, Dowling MB, Kilbourne M, Keledjian K, Driscoll IR, Raghavan SR, Hess JR, Scalea TM, Bochicchio GV. Determination of efficacy of novel modified chitosan sponge dressing in al lethal arterial injury model in swine. J Trauma Acute Care Surg 2012: 72: 899-907.
12. Fujita T. Ohue M, Fujii Y, Miyauchi A, Takagi Y. The effect of active absorbable algal calcium (AAA Ca) with collagen and other matrix components on back and joint pain and skin impedance. J Bone Miner Metab 2002; 20: 198-302.
13. Englehart MS, Cho SD, Tieu BH, Morris MS, Underwood SJ, Karahan A, Muller PJ, Differding JA, Farrel DH, Schreiber MA. A novel highly porous silica and chitosan-based homostatic dressing is superior to HemCon and gauze sponges. J Trauma 2008; 65: 884-890.
14. Fowler, ME. Zoo and wild animal medicine. Philadelphia: WB Saunders. 1978: 525-552.
15. Fowler, ME. Zoo and wild animal medicine: Current Therapy IV. Philadelphia: WB Saunders. 1999: 365-368.
16. Hedlund GS. Wound management. In: Small animal surgery, 2nd ed. St Louis: Mosby. 2002: 134-144.
17. Hosgood G. Wound repair and specific tissue response to injury. In: Textbook of small animal surgery, 3rd ed. Philadelphia: Saunders. 2003: 66-86.
18. Ishihara M, Ono K, Sato M, Nakanishi K, Saito Y, Yura H, Matsui T, Hattori H, Fujita M, Kikuchi M, Kurita A. Acceleration of wound contraction and healing with a photocross-linkable chitosan hydrogel. Wound Rep Reg 2001; 9: 513-521.
19. Kheirabadi BS, Acheson EM, Deguzman R, Sondeen JL, Delgado A, Dick EJ Jr, Holcomb JB. Hemostatic efficacy of two advanced dressings in an aortic hemorrhage model in swine. J Trauma 2005; 59:25-34.
20. Kim SK, Nghiep ND, Rajapakse N. Therapeutic prospectives of chitin, chitosan and their derivatives. J Chitin Chitosan 2006; 11: 1-10.
21. Kojima K, Okamoto Y, Kojima K, Miyatake K, Fujise H, Shigemasa Y, Minami S. Effects of chitin and chitosan on collagen synthesis in wound healing. J Vet Med Sci 2004; 66: 1595-1598.
22. Kunio NR, Riha GM, Watson KM, Differding JA, Schreiber MA, Watters JM. Chitosan based advanced hemostatic dressing is associated with decreased blood loss in a swine uncontrolled hemorrhage model. Am J Surg 2013; 205: 505-510.
23. Kweon DK, Song SB, Park YY. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. Biomaterials 2003; 24: 1595-1601.
24. MacDonald DW. The encyclopaedia of animals. Equinox Ltd. Oxford. 1984: 70-85.
25. Mariappan MR, Alas EA, Williams JG, Prager MD. Chitosan and chitosan sulfate have opposing effects on collagen-fibroblast interactions. Wound Rep Reg 1999; 7: 400-406.
26. Millner RW, Lockhart AS, Marr R, Jones K. Omni-Stat (Chitosan) arrests bleeding in heparinised subjects in vivo: an experimental study in a model of major peripheral vascular injury. Eur J Cardiothorac Surg 2011; 39: 952-954.
27. Minami S, Oh-oka M, Okamoto Y, Miyatake K, Matsuhashi A, Shigemasa Y, Fukumoto Y. Chitosan-inducing hemorrhagic pneumonia in dogs. Carbohydrate Polymers 1996; 29: 241-246.
28. Minami S, Okamoto Y, Matsuhashi A, Eguchi H, Eguhi H. Clinical application of chitin and its derivatives to small animals. JSAVA 1994; 34: 5-18.
29. Minami S, Okamoto Y, Matsuhashi A, Sashiwa H, Saimoto H,

Shigemasa Y, Tanigawa T, Suzuki T, Tanioka S, Tanaka Y. Polymer N-acetyl-D-glucosamine (chitin) induces prostaglandin E_2 in dogs. J Vet Med Sci 1995; 57: 377-378.
30. Minami S, Okamoto Y, Miyatake K, Matsuhashi A, Kitamulra Y, Tanigawa T, Tanaka Y, Shigemasa Y. Chitin induces type IV collagen and elastic fiber in implanted non-woven fabric of polyester. Carbohydr Polym 1996; 29: 295-299.
31. Mueller GR, Pineda TJ, Xie HX, Teach JS, Barofsky AD, Schmid JR, Gregory KW. A novel sponge-based wound stasis dressing to treat lethal noncompressible hemorrhage. J Trauma Acute Care Surg. 2012: 73: S134-139.
32. Nam KS, Cho HJ, Shon YH, Effect of chitosan oligosaccharide on chemopreventive enzymes of colon cancer. J Chitin Chitosan 2006; 11: 171-174.
33. Okamoto Y, Minami S, Matsuhashi A, Sashiwa H, Saimoto H, Shigemasa Y, Tanigawa T, Tanaka Y, Tokura S. Application of polymeric N-acetyl-D-Glucosamine (chitin) to Veterinary Practice. J Vet Med Sci 1993; 55: 743-747.
34. Okamoto Y, Minami S. Matsuhashi A, Sashiwa H, Saimoto H, Shigemasa Y, Tanigawa T, Tanaka Y, Tokura S. Polymeric N-Acetyl-D-Glucosamine (chitin) induces histionic activation in dogs. J Vet Med Sci 1993; 55: 739-742.
35. Okamoto Y, Shibazaki K, Minami S, Matsuhashi A, Tanioka S, Shigemasa Y. Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs. J Vet Med Sci 1995; 57: 851-854.
36. Okamoto Y, Southwood L, Stashak TS, Norrdin RW, Nelson AW, Minami S, Matsuhashi A, Kato K, Shigemasa Y. Effect of chitin on nonwoven fabric implant in tendon healing. Carbohydr Polym 1997; 33: 33-38.
37. Okamoto Y, Tomita T, Minami S, Matsuhashi A, Kumazawa NH, Tanioka S, Shigemasa Y. Effects of chitosan on experimental abscess with Stapylococcus aureus in dogs. J Vet Med Sci 1995; 57: 765-767.
38. Ong SY, Wu J, Moochhala SM, Tan MH, Lu J. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. Biomaterials. 2008; 29: 4323-4332.
39. Porporatto C, Bianco ID, Riera CM, Correa SG. Chitosan induces different L-arginine metabolic pathways in resting and inflammatory macrophages. Biochem Biophys Res Commun 2003; 304: 266-272.
40. Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. Advanced Drug Delivery Review 2004; 56: 1467-1480.
41. Thomson RG. Granulation tissue and wound healing. In: General veterinary pathology, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders. 1984: 252-261.
42. Usami Y, Minami S, Okamoto Y, Matsuhashi A, Shigemasa Y. Influence of chain length of N-acetyl-D-glucosamine residues on direct and complement-mediated chemotactic activities for canine polymorphonuclear cells. Carbohydr Polym 1997; 32: 115-122.
43. Usami Y, Okamoto Y, Minami A, Kumazawa NH, Tanioka S, Shigemasa Y, Migration of canine neutrophils to chitin and chitosan. J Vet Med Sci 1994; 56: 1215-1216.
44. Usami Y, Okamoto Y, Minami S, Matsuhashi A, Kumazawa NH, Tanioka S, Shigemasa Y. Chitin and Chitosan induce migration of bovine polymorphonuclear cells. J Vet Med Sci 1994; 56: 761-762.
45. Ward KR, Tiba MH, Holbert WH, Blocher CR, Draucker GT, Proffitt EK, Bowlin GL, Ivatury RR, Diegelmann RF. Comparison of a new hemostatic agent to current combat hemostatic agents in a swine model of lethal extremity arterial hemorrhage. J Trauma 2007; 63: 276-283.
46. Xie H, Khajanchee YS, Shaffer BS. Chitosan hemostatic dressing for renal parenchymal wound sealing in a porcine model: implications for laparoscopic partial nephrectomy technique. JSLS 2008; 12: 18-24.
47. Xie H, Khajanchee YS, Teach JS, Shaffer BS. Use of a chitosan-based hemostatic dressing in laparoscopic partial nephrectomy. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2008; 85: 267-271.
48. Yu Y, Park WH, Lee SC, Ko BM. Effects of chitooligosaccharide on the early stage of wound healing. J Chitin Chitosan 2003; 8: 35-39.