

Hyaluronic Acid의 특성과 응용

서 영 수

조성과 구조 및 기능

1934년 처음으로 추출된 hyaluronic acid²는 생리학적 매우 중요한 물질로 판명되었다. Hyaluronic acid는 glycosamino-glycans(GAG)이라는 amino-sugar-containing 다당류의 일종이다. 이 자연 물질은 단백질과 화학적 결합을 이루는 것이 아니어서 분리가 쉽다. 동물의 안구¹를 채우고 있는 액체에서 맨 처음 추출된 이 hyaluronic acid는 동물의 다른 조직에서도 쉽게 발견된다. 즉 태반,^{3,4} 관절의 윤활제(synovial fluid),⁵ 능막액(pleural

Table 1. Hyaluronic Acid Content of Animal Fluids and Tissues.²

Source	Hyaluronic acid content, %
Cattle vitreous humor(체양액)	0.009-0.048
Cattle aqueous humor(수양액)	0.003-0.005
Cattle synovial fluid(관절액)	0.020-0.025
Human knee synovial fluid(관절액)	0.060-0.206
(Patients with rheumatoid arthritis)	
Human knee synovial fluid(관절액)	0.080-0.150
(normal)	
Human pleural fluid(능막액)	0.14-0.019
Human umbilical cord(탯줄)	0.1-2.8
Fowl sarcoma fluid(닭벼슬)	0.13

Hyaluronic Acid: Properties and Applications

럭키 중앙 연구소(Young-Soo Soh, Lucky Central Research Institute, P. O. Box 10, Daedeogdanji, Science Town, Daejeon, Chung-Nam, Korea)

fluid), 피부, 그리고 수탉의 벼슬등에서 발견된다. Hyaluronic acid는 주로 염의 형태로 존재하며 fibrillar material 사이에 있는 연결조직(connective tissue)의 intercellular matrix의 주요 성분이다. 여기서 intercellular matrix라 함은 피부힘줄(tendon), 근육, 그리고 연골같은 조직세포 사이를 채우는 물질을 말한다. 이 hyaluronate(hyaluronic acid의 염)는 접착제 역할로서 세포 사이에 존재한다. 이 점성을 가진 세포사이의 젤리와 같은 hyaluronate 또는 hyaluronic acid는 박테리아의 침입을 막고 독의 확산을 막는 역할을 하는 것으로 보여진다. Hyaluronate는 또한 관절사이에서 다량의 물과 용액 상태에서 윤활제 역할과 충격흡수제 역할을 하고 있다.

Table 1에서 보는바와 같이 hyaluronate는 여러가지 조직에 각기 다른 양으로 존재하고 있다. 특히 태반 그리고 관절액에 다량 존재함을 나타내고 있다.

Hyaluronate는 항상 다량의 물과 같이 존재하며 Table 1에서 보는바와 같이 hyaluronate의 농도가 매우 낮은 이유는 물을 많이 함유하기 때문이다. 예를들어 수양액을 말린 후의 hyaluronate의 무게는 20%이다. 피부와 태반에서도 chondroitin sulfate의 양과 거의 같은 양의 hyaluronate가 존재한다.

Fig. 1은 hyaluronic acid의 반복단위의 구조

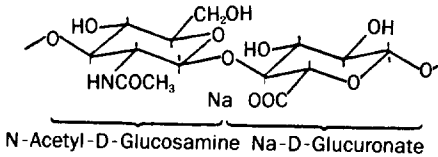


Fig. 1. Sodium hyaluronate의 repeating unit.

를 보여주고 있다. 이 긴 선형 다당류 사슬은 겉 사슬이 없고 상당한 강성도(stiffness)를 가지고 있으며 랜덤코일을 형성한다. 이 점과 흡수율과는 밀접한 관계가 있는 것으로 보여진다.⁶ 다량의 물을 유지할 수 있다는 점은 sodium hyaluronate의 가장 중요한 특성중의 하나이다. Hyaluronate보다 더 큰 흡수율을 가진 고분자는 알려지지 않고 있다.

Sodium hyaluronate 2% 수용액은 나머지 98%의 물을 보유하면서 겔인 것처럼 작용한다. 그러나 이것은 겔이 아니며 실제적인 액체이다. 즉 더욱 많은 물로 희석 되어질 수 있으며 용기를 변화시키며 흘러서 그 모양이 변한다. 이 농도의 용액은 점탄성을 가지고 있고 유사가소성(pseudoplasticity)도 가지고 있다. 이것은 sodium hyaluronate만이 갖고 있는 특성이다. 예를 들면, 다른 GAG들 heparin, chondroitin sulfate, keratan sulfate 등은 점성을 가진 용액으로 만들 수 있으나 상당히 높은 농도 수준이 요구된다. 그러나 이러한 것들의 탄성은 높은 농도에서도 불가능하다.⁶ 이러한 hyaluronic acid 특성들은 높은 분자량과 그에 따른 큰 분자당 체적이 깊이 연관되어 있다. 즉, sodium hyaluronate 분자량이 크므로 고분자 사슬은 서로 겹치게 되어 사슬이 얹히고 사슬과 사슬사이의 상호작용(chain-chain interaction)을 가진다.

Intercellular matrix는 단순한 세포 물리적인 바탕이 아니며 조직에 일어나는 생물적 공정(biological process)에 다양한 역할을 담당하고 있다. 즉 조직에 수분을 함유케 하고 윤활성을 주며,¹⁴ solute transport, cell migration, cell function, 그리고 differentiation등의 역할⁶을 담당하고 있다.

의료용

천연 고분자인 hyaluronic acid는 의료용으로 쓰이기 시작하였는데, 안과 수술용으로 맨 처음 쓰이기 시작했고 뒤이어 관절염 치료용으로 사용되었다. 부작용이 없고 몸속에 존재하는 천연 물질인 이것을 사용한 수술들은 훌륭한 결과를 낳았다.⁶ 젤리같은 점탄성을 가진 hyaluronate의 용액은 조직표면을 보호하고, 윤활제 역할을 하며 수술후 접착되는 일(post-operative adhesion formation)을 막으므로 인공수정체 삽입수술에 쓰이고 있다. 이때 hyaluronate 용액은 벌써 안구속에 존재하는 천연물질 이므로 거부 반응이 없고 통증이나 염증을 일으킬 확률이 적다. 수술시 의사들이 인공 수정체를 다루기 쉽게 이 hyaluronate solution을 점탄성 매개체(viscoelastic medium for surgical manipulation)로 사용한다.¹⁴ 이때 쓰이는 성분은 98%의 물, 1% 생리식염 그리고 1%의 sodium hyaluronate이다. Sodium hyaluronate의 또 한가지 효과로서는 눈의 표면에 있는 눈물에 함유되면 눈 표면을 항상 촉촉하게 해주는 역할을 할 수 있는 것으로 알려졌다.¹⁴ 점탄성을 가진 hyaluronate 용액을 이용한 수술을 viscosurgery¹⁴라고 부르고 있는데 처음으로 팔리기 시작한 hyaluronate가 Sweden Pharmacia사의 Healon[®]이다. 이 안과용의 viscosurgery의 성공은 다른 분야에도 영향을 미치게 되었는데 그중 하나가 관절염 치료이다. 관절염 치료에서 sodium hyaluronate의 사용은 의학계에 크게 공헌하고 있다. Sodium hyaluronate solution 투입으로 관절(articular cartilage)을 보호하고 윤활성을 좋게하며 수분을 유지시켜 준다.¹⁵

화장품용

기초 화장품 원료로서의 sodium hyaluronate의 역할은 피부내의 수분 함량을 이야기 함으로써 명확해진다. 사람의 피부는 노화와 함께 수분의 함량이 점차로 줄어 든다. 특히 50세가 넘으면

피부내에 수분의 함량은 급격히 떨어지며 이에 따라 주름살이 생기는 것으로 알려져 있다. 이 수분 함량의 감소와 더불어 피부내의 sodium hyaluronate의 양도 정비례 하여 감소함이 알려져 있다. 즉 피부 노화에 따라 물을 함유하는 능력을 가진 sodium hyaluronate가 감소함에 따라 수분이 감소하며 이에 따른 피부 노화가 동반된다.^{8,9} 나이에 따른 피부 노화는 수분 함량의 감소라는 것 이외에도 피부의 intercellular matrix의 점탄성의 변화에 따른 것으로 알려져 있다. 즉 피부의 물리적 기계적 성질중의 중요한 탄력성은 바로 피부속의 intercellular matrix의 탄력성과 깊은 상관관계가 있으며 이 탄력성의 주요 원인중 하나가 hyaluronate 용액이라 믿어지고 있다. 따라서 sodium hyaluronate 분자의 네트워크(network)는 피부를 이처럼 쫘게 보이는 것과 깊은 연관이 있으며 피부의 수분함량과는 직접적인 관계가 있다.

이처럼 인간 피부의 노화 현상과 sodium hyaluronate 감소의 밀접한 관계가 알려짐에 따라 화장품 산업체에서는 sodium hyaluronate를 사용한 기존 화장품을 개발, 시판하기 시작 하였다. 분자량이 큰 sodium hyaluronate의 용액을 피부에 발랐을 때에 점탄성 막이 형성된다. 이 용액은 완전히 투명하며 끈적거리는 느낌이 없고 피부를 부드럽게 하고 탄탄하게 한다. 이 용액의 피부에서의 역할은 sodium hyaluronate의 분자량과 농도에 깊이 관계 있다. 같은 농도에서 분자량이 크면 얹힘이 커질 것이고 막의 점탄성도 커진다. 이 분자량이 큰 sodium hyaluronate는 진피층을 통과 하지 않는다.

Sodium hyaluronate의 피부층에서의 역할, 특히 생물학적인 역할에 대한 연구는 계속 되어지고 있으며 의료용으로서 성공한 이물질에 대한 기초 화장품용으로서의 수요와 개발은 급증 하고 있다. 미국에서는 Estée Lauder가 선두 주자중의 하나이며 일본 Shiseido는 hyaluronic acid를 이용한 기초 화장품 생산 뿐만 아니라 hyaluronic acid도 자체 생산 하는 것으로 알려져 있다. 그밖

의 많은 업체도 hyaluronic acid를 구입하여 2-3 % solution을 만들어 기초 화장품으로 상당히 비싼 값에 팔고 있다.

인공장기와 혈관예의 흡착

생체에 대해 거부 반응이 없는 다당류를 인공 장거나 인공혈관에 부착시키는 연구는 꾸준히 되어 왔다.¹⁰ 인공 혈관의 경우 피와 표면사이의 계면에 대한 의학적 보고서는 수없이 많다. 이 때 중요한 것은 계면의 화학적 물리적 성질이다. Sodium hyaluronate가 인공혈관 또는 인공장기등의 표면에 칠해지면 표면의 생체에 대한 거부감을 줄일 수 있으리라 기대된다. 이때 부착(grafting)시키는 기술과 방법에 따라 기질(substrate)과 결합되는 sodium hyaluronate양과 결합력이 달라지게 된다. 여기서는 수용성인 sodium hyaluronate는 표면에 어떻게 붙이며 얼마나 붙어 있는지를 조사하는 방법을 간단히 살펴 보기로 한다.

Hyaluronic acid는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 -OH group이 있어서 이 히드록시기와 반응을 일으킬 수 있는 반응성기를 가진 표면에 sodium hyaluronate를 칠하여 반응시킨다. 반응 후 이 코팅이 된 표면은 물로 씻어낸다. 이 표면은 대부분 물 또는 수용액인 혈액 또는 체액과 접촉하는 용도로 많이 쓰이기 때문이다. 즉 몸속에 들어가는 인공이식기관(implants)인 경우 몸속에 있는 물이 sodium hyaluronate에 대하여 용매 역할을 하므로 표면에 화학결합을 형성한 sodium hyaluronate만이 영구적으로 붙어 있을 수 있기 때문이다.

Sodium hyaluronate가 코팅된 표면이 체내 혹은 물속에 잠겼을 때의 상태를 Fig. 2에 나타

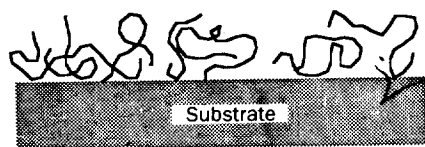


Fig. 2. Hyaluronic acid treated surface immersed in aqueous environment.

내었다. 이 때 hyaluronic acid의 사슬은 체액과 용액 상태를 이루게 되어 체액에 떠있는 상태로 되게 된다. 이 때 표면의 물리적 성질은 기질의 종류, hyaluronic acid의 분자량, 그리고 hyaluronic acid의 양에 따라 변한다.

여기서 부착 시키는 방법에 따라 표면과 화학 결합을 이룬 hyaluronic acid 양이 변한다. 그 양을 측정하는 정량적 방법의 하나가 기질과 물의 contact angle 측정법이다.

Effective Use of Hyaluronic Acid

Hyaluronic acid의 유체화학적 물성들은 반복 단위의 화학적 구조에서 기인하는 것이 아니고 고분자 사슬 상호간의 얽힘에 의한 것으로 보인다. 즉 분자량의 크기에 따라 분자 사이의 상호작용이 변하며 이것이 농도와 함께 점탄성의 matrix를 형성하는가에 따라 결정하게 된다. 이 때 분자량은 intrinsic viscosity와 상관관계가 있으며 예를 들면 분자량이 2천5백만인 hyaluronic acid의 intrinsic viscosity는 4000 cc/g이다. Hyaluronic acid의 농도를 $C(g/cc)$ 라고 하고 intrinsic viscosity를 $\eta(cc/g)$ 라고 할 때 $C\eta$ 는 무단위 정수이며 이것을 coil overlap parameter라고 부른다. 이 parameter가 점성의 matrix 형성을 결정하는 지표이다. Coil overlap parameter가 일정한 숫자 이상이면 얽힘이 생기고 그 이하이면 용액내에서 hyaluronic acid 분자들이 각기 떨어져 독자적인 domain을 가지고 있는 것이다.

Hyaluronic acid solution의 사용에 있어서 이 coil overlap parameter가 점탄성을 지닌 matrix를 형성할 수 있는 최소한 농도를 결정하는 중요한 척도이다. 이론적으로는 Flory-Fox relationship에 의해서는 $C\eta$ 가 1.5일때 얽힘(entanglement behavior)이 나타나기 시작 한다고 한다.¹³ Sodium hyaluronate solution도 이론적인 지점에서 molecular entanglement가 시작된다. Fig. 3에서는 specific viscosity와 coil overlap parameter의 상관관계가 나타나 있다. 여기에서 $C\eta$ 가 약 1.5일때 선의 기울기가 급격히 달라진다. 즉 $C\eta$ 가 약 1.5 이하이

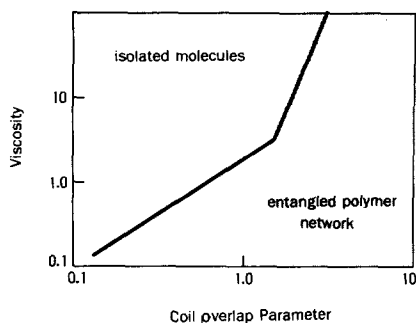


Fig. 3. Abrupt discontinuity in the specific viscosity of an HA solution at the point of chain entanglements.

면 hyaluronic acid molecule이 서로 떨어져 있으며 viscosity의 $C\eta$ 에 대한 증가 속도는 비교적 느리다. Coil overlap value가 1.5 이상이면 molecule entanglement가 생겨 그 기울기가 증가한다. 따라서 entanglement가 생기는 최저농도는

$$C = \frac{1.5}{\eta}$$

의 식으로 구할 수 있다.

Matrix formulation시 탄성 또한 점성과 더불어 중요한 역할을 한다. 즉 hyaluronic acid가 서로 떨어져 얽혀 있지 않으면 탄성이 없으며 coil overlap parameter는 탄성과 정비례하게 증가된다. Intrinsic viscosity는 hyaluronic acid 분자량과의 관계는 Mark Houwink 식으로 다음과 같이 나타난다.

$$\eta = K(\bar{M})^a$$

여기서 $K=0.0291$ 이고 $a=0.81$ 이다. 이 식을 이용하여 주어진 분자량에 대한 matrix를 형성하는 값 즉, $C\eta$ 이 1.5가 되는 최소한의 hyaluronic acid 농도를 구할 수 있다. 즉 충분한 점성을 가진 용액을 만들기 위해서는 농도 또는 분자량이 커야 된다. 위 식에 의하면 분자량의 증가가 농도의 증가보다 더욱 큰 영향력을 specific viscosity 또는 서로 얽

힘(chain entanglement)에 미친다. 이처럼 분자량 조절은 hyaluronic acid formulation에서 중요한 역할을 한다.

추 출

Hyaluronic acid 추출에는 많은 방법이 있으나 대체로 서로 비슷한 경로를 거친다. 여기서는 그 대표적인 몇가지 방법을 소개한다.

먼저 동물 안구속의 액체인 체양액(vitreous humor)을 아세트이나 초산에 넣어서 침전시킨다. 이때에 동물의 장액(serum)을 가하면² 추출되는 이당류의 양을 늘릴 수가 있다. 이렇게 한 다음 약 24시간 두었다가 potassium acetate 또는 sodium acetate로 pH 9에서 extraction 시키면 염의 형태 즉 potassium hyaluronate 또는 sodium hyaluronate가 얻어진다. 이 때 단백질도 같이 추출되어 있는데 이것은 chloroform-amyl alcohol을 넣고 흔들면 없앨 수 있다. 다음에는 질소 함유물을 없애기 위하여 zinc hydroxide로 흡착(adsorption)한다. 마지막으로 초산으로 산성화 시키면 hyaluronic acid가 얻어지고 에탄올로 침전시킨다. 높은 점도의 sodium hyaluronate를 얻기위한 방법의 하나로 탯줄을 사용한다. 탯줄을 2% phenol로 녹인 다음 초산으로 응집시킨다. 안구속 액체와 탯줄을 이용한 방법과 비교해 볼 때 더 좋은 방법으로 수탉의 벼슬을 이용한 방법이 있다. 이 방법은 얻어진 hyaluronic acid의 질이 우수할 뿐만 아니라 수율도 높으며 원재료 수급 면에서도 상당한 잇점을 가지고 있다. 먼저 전처리 과정으로 잘게 썬 벼슬에 proteolytic enzyme을 넣어 다당류들이 밖으로 빠져 나오게 한다. 그 이후의 과정은 전술한 방법을 쓸 수 있다.

참 고 문 헌

1. K. Meyer and J. W. Palmer, *J. Biol. Chem.*, **107**, 629 (1934).
2. R. L. Whistler and C. L. Smart, "Polysaccharide Chemistry", Chapter 32, Academic Press, (1953).
3. K. Meyer and J. W. Plamer, *J. Biol. Chem.*, **114**, 689 (1936).
4. R. W. Jeanloz and E. Forchielli, *J. Biol. Chem.*, **186**, 495 (1950).
5. K. Meyer, E. M. Smyth, and M. H. Dawson, *J. Biol. Chem.*, **128**, 319 (1939).
6. E. A. Balazs and P. Band, *Cosmetics & Toiletries*, **99** (1984).
7. N. Rydell and E. A. Balaz, *Clin. Orthop.*, **80**, 25(1971).
8. J. H. Poulsen and M. K. Cramers, *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, **12**, 545 (1982).
9. R. Fleischmajer, J. S. Perlish and R. I. Bashey, *Biophys. Acta*, **279**, 265(1972).
10. I. H. Elan, H. Nygren, and M. Stenbery, *J. Biomedical Mat. Res.*, **18**, 1953 (1984).
11. M. D. Lelah, T. G. Grasel, J. A. Pierce, and S. L. Cooper, *J. Biomedical Mat. Res.*, **19**, 1011 (1985).
12. P. Band, *Drug and Cosmetic Industries*, Oct. (1985).
13. E. R. Morris, D. A. Rees, and E. J. Walsh, *J. Mol. Biol.*, **138**, 383 (1980).
14. E. A. Balazs, "Sodium Hyaluronate and Viscosurgery" in "Healon: A Guide to its use in Ophthalmic Surgery", D. Miller and R. Stegmann, eds., p.5, John Wiley & Sons, N. Y. (1953).
15. E. A. Balazs and D. A. Gibbs, "The Rheological Properties and Biological Function of Hyaluronic Acid" in "Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix", Volume 3, E. A. Balazs, ed., p.1241, Academic Press, N. Y. (1970).
1. K. Meyer and J. W. Palmer, *J. Biol. Chem.*