Journal of Radiation Industry 5 (2) : 159~164 (2011)

전자선 조사를 이용한 히알루론산의 특성 조절

신영민 · 김우진 · 김용수 · 조선영 · 박종석 · 권희정 · 임윤묵 · 노영창*

한국원자력연구원 방사선과학연구소 방사선공업환경연구부

Modulation of Hyaluronic Acid Properties by Electron Beam Irradiation

Young Min Shin, Woo-Jin Kim, Yong-Soo Kim, Sun-Young Jo, Jong-Seok Park, Hui-Jeong Gwon, Youn-Mook Lim and Young-Chang Nho*

Radiation Research Division for Industry & Environment, Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea

Abstract - A variety of natural polymers have been used as tissue engineering scaffolds, drug delivery system, and cosmetic materials due to their higher biocompatibility and water uptake. As a major component of extracellular matrix, hyaluronic acid consisting of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine has been popularly used as a hydrogel material. Even though it has good properties to be used in the tissue engineering and cosmetic industry, its higher viscosity has limited a potential use in a variety of applications; only low content should be applied in preparing above products. In the present study, we investigated the effect of electron beam irradiation on the properties of hyaluronic acid. Hyaluronic acid paste containing low contents of water changed to solution after electron beam irradiation ranging from 1 to 10 kGy, which didn't exhibit any alteration of surface properties and morphological change after freeze-drying. However, its viscosity was significantly decreased as absorbed dose increased, which was approximately one by hundred in comparison with the viscosity of original hyaluronic acid solution with same concentration. In addition, it can still interact with positive charged chitosan generating polyelectrolyte complex. Therefore, only viscosity was decreased after electron beam irradiation, whereas other properties of hyaluronic acid maintained. Consequently, these hyaluronic acids with lower viscosities can be used in a variety of applications in tissue engineering, drug delivery, and cosmetic industry.

Key words : Hyaluronic acid, Electron beam irradiation, Polyelectrolyte complex, Tissue engineering

서 론

초고령화 사회로의 진입 가속화에 따라 다양한 의료 소요가 증가하고 있으며, 특히 노화 또는 사고로 인해 손상된 조직의 재생 소요 역시 증가하고 있다. 이러한 소요의 충족을 위해 다양한 의료 기술의 개발이 진행되고 있으며, 조직공학 또는 재생의학이 손상된 조직의 재생을 목적으로 하는 새로운 학문으로 인식되어 최근 10여년 이상 활발하게 연구되고 있다. 조직공학은 손상된

* Corresponding author: Young-Chang Nho, Tel. +82-63-570-3060, Fax. +82-63-570-3069, E-mail. ycnho@kaeri.re.kr

조직의 재생을 위해 인체 외에서 적절한 형태의 지지체 위에서 세포를 배양하고 이를 다시 병변에 이식하는 전략으로, 다양한 고분자에 기반한 지지체의 개발과 세포 배양 그리고 세포의 생존을 조절할 수 있는 세포활성신호의 전달로 구성된다. 특히, 세포가 고정되어 증식 또는 분화할 수 있는 장소를 제공하는 지지체는 합성 또는 천연고분자들이 활발하게 이용되고 있으며, 3차원 다공성 구조 지지체, 나노섬유형 지지체가 개발되어 다양한 조직 기원세포뿐만 아니라 성체줄기세포, 배아줄기세포 등의 세포들이 지지체 위에서 배양되고 있다(Shin *et al*. 2003).

이들 지지체는 병변의 기계적 특성(예를 들어 골조직, 근육조직)에 따라 다양한 물성이 필요하기 때문에 병변의 기계적 특성을 만족할 수 있는 고분자 소재를 사용하며, 경우에 따라서 표면 개질 등을 통해 원하는 물리적, 화학적, 생물학적 특성을 갖는 지지체를 개발한다.

지지체용 고분자 소재 중 천연고분자로서 다당류 기반의 소재들이 많이 사용되고 있는데 대표적인 재료들이 알지네이트, 키토산, 히알루론산 등이다. 이들 소재는 생체적합성이 우수하며 인체 내 이식 시 면역반응이 적게 일어나 이식용 재료로 많이 연구되고 있으며, 높은 습윤율로 인해 원활한 세포 생존 환경을 제공하고 있다. 특히, 알지네이트는 2가 이온 가교를 통해 손쉽게 하이드로겔 형태를 유지하며, 심근조직 및 연골 재생용 소재로 연구되고 있다.

히알루론산은 동물조직의 세포외기질에 존재하는 glycosaminoglycan으로 D-glucuronic acid와 N-acetylglucosamine이 번갈아 결합된 구성단위로 되어있다. 일반적으로 100만이 넘는 분자량을 갖고 있으며, 수용액 상태에서는 높은 점도와 높은 수분 함유율을 보여주어 최근 관절염 치료제용 소재 및 보습성 화장품의 주된 소재로 사용되고 있다. 또한, 히알루론산은 조직공학용 지지체를 개발하는데 많이 사용되고 있는데 하이드로겔 및 나노섬유형태의 지지체로 개발되어, 세포의 흡착을 조절하는 지지체로 연구되고 있다(Kogan *et al*. 2007). 하지만, 히알루론산은 매우 높은 분자량으로 인해 용해 시 매우 높은 점도를 보임에 따라 고농도의 수용액 제작이 어렵고, 결과적으로 조직공학적 응용이나 화장품 산업에서 다양하게 사용될 수 없는 문제를 야기하고 있다.

분자량이 매우 높은 천연고분자의 분자량 및 특성 조절을 위해 방사선 조사 기술을 이용하여 분자량의 조절 및 물리화학적 특성을 변화시키는 연구가 많이 보고 되고 있다. 예를 들어, 생체 내 비분해성 천연고분자 물질인 알지네이트는 감마선 조사를 통해 분자량의 감소뿐만 아니라 생분해성을 특성을 보여주었으며, 이는 연골세포와의 동시 이식을 통해 병변에서 연골세포의 생존과 지지체의 생분해성을 모두 보여주었다(Alsberg *et al*. 2003). 또한, 합성고분자로써 poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) (PLCL)은 방사선 그라프트 기술을 이용한 아크릴산을 그라프트 했을 때 기능기의 도입과 동시에 분자량을 낮춰주어 인체 내에서 생분해도 조절의 가능성을 보여주었다(Shin *et al*. 2008). 또한, 히알루론산 분말은 약 50 kGy의 전자선, 감마선, 마이크로웨이브, 열분해를 통해 분자량이 조절되었는데 원 물질 대비 약 20% 수준으로 낮아져 히알루론산의 응용가능성을 더욱 높여주고 있다(Choi *et al*. 2010).

따라서, 본 연구에서는 히알루론산의 고점도 특성의 조절을 위해 히알루론산 페이스트를 제작한 후 전자선를 이용하여 다양한 조사량에 대한 히알루론산의 특성 및 형태를 분석하였으며, 조사량에 따른 점도 변화와 또 다른 다당류 기반 소재인 키토산과의 고분자 전해질 복합체 (polyelectrolyte complex) 형성을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 재료

전자선 조사에 사용된 히알루론산은 (주)태평양(Korea)에서 구입하였으며, 분자량 분포는 1.8～2.5 mDa였다. 키토산은 200～800 cP을 갖고 있었으며, Sigma aldrich사(WI, USA)의 제품을 구입하여 사용하였고, 사용된 모든 시약류는 정제과정 없이 사용되었다.

2. 히알루론산 페이스트의 전자선 조사

히알루론산의 전자선 조사는 히알루론산 페이스트의 제작을 통해 수행되었다. 히알루론산 30 g을 2 ml의 초순수에 첨가한 후 planetary centrifugal mixer (ARE-310, Thinky co., Japan)으로 2,000 rpm에서 30초 혼합한 후 다시 1,500 rpm에서 10분 혼합하였다. 혼합된 히알루론산 페이스트는 35 mm petridish(페이스트 두께 약 10 mm) 옮겨 담고 전자선 조사를 실시하였다. 전자선 조사를 위해 ELV4-electron accelerator (energy 10 MeV, beam power 570 kW)를 사용하였으며, 전자선의 전류량은 0.05 mA이었고, 조사량은 1, 2, 3, 5, 10 kGy이었다. 전자선 소스와 시료간의 거리는 약 50 cm였으며, 시료의 이동속도는 10 m min^{-1}이었다.

3. 적외선 분광 분석

전자선 조사된 히알루론산은 동결 건조 후 적외선 분광기 (Tensor 37, Bruker optics, MA, USA)를 이용해 분석

하였다. 시료의 크기는 5×5×0.1 mm였으며, 분광기의 해상도는 8 cm^{-1}이었고, 4,000～600 cm^{-1} 범위에서 24번 스캔하여 스펙트럼을 얻었다.

4. 전자현미경

조사된 히알루론산의 형태 변화를 관찰하기 위해 24시간 동결 건조된 히알루론산을 전자현미경(JSM-6390, JEOL, Japan)으로 관찰하였다. 시료는 약 5×5 mm 크기로 고정했으며, 10분간 백금 코팅한 후, 10 kV에서 시료의 표면을 관찰하였다.

5. 히알루론산 수용액 점도 측정

동결 건조된 히알루론산은 초순수에 1 wt% 농도로 용해한 후 LV spindle (Middlebro, MA, USA)이 장착된 점도계 (DV-II+ viscometer, Brookfield, MA, USA)를 이용하여 100 rpm에서 수용액의 점도를 측정하였다.

6. 고분자 전해질 복합체 형성

키토산을 초순수에 용해한 후(1 wt%) 2 ml을 35 mm 페트리디쉬에 옮겨 담고, 선량별로 조사된 히알루론산 수용액 (1 wt%)을 각 2 ml씩 키토산 용액이 담겨있는 페트리디쉬에 넣어주고, 교반기로 혼합하면서 30초 간격으로 고분자 전해질 복합체의 형성을 관찰하였다.

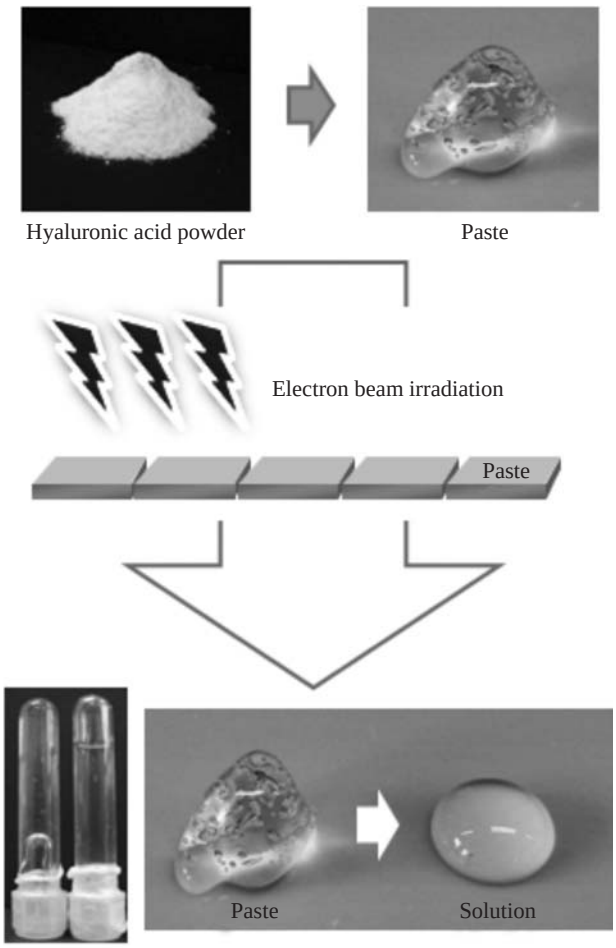

Fig. 1. Schematic diagram of the effect of electron beam irradiation on hyaluronic acid.

결과 및 논의

히알루론산은 조직공학, 약물전달, 화장품 산업에 이르기까지 그 응용 범위가 확대되고 있으며, 생물학적인 안전성 및 생체 친화성으로 인해 천연고분자로써의 그 중요성이 더욱 커지고 있다. 하지만, 히알루론산은 높은 분자량으로 인해 쉽게 적용되기 어려우며, 조직공학용 지지체 또는 화장품 산업에서 미량만 사용해야 하는 문제가 있다.

전자선은 최근 생명공학기술에서 활발히 연구되고 있는 에너지원으로 그 기원은 반도체 제조 공정에 있다. 전자선은 높은 에너지율을 바탕으로 표면 특성을 변화시켜 고해상도의 특정 패턴을 실리콘 기판 위에 제작할 수 있는데 이를 생체고분자에 이용하여 생분해 조절이나 표면 개질 기술, 멸균기술로써 이용되고 있다(Filipczak *et al*. 2006; Jozwiakowska *et al*. 2011). 예를 들면, 히알루론산 분말은 전자선, 감마선, 마이크로웨이브, 열처리 등으로 분해되어 히알루론산의 특성이 유지되면서 분자량이 약 80% 가량 감소되는 결과가 보고되었으며 (Choi *et al*. 2010), poly(trimethylene carbonate)는 전자선 조사를 통해 가교와 분해가 일어나 분자량의 변화가 관찰되었다(Jozwiakowska *et al*. 2011). 다양하게 사용되고 있는 생체재료로써 poly(L-lactide) (PLLA)와 poly(glycolide-co-lactide) (PLGA) 나노섬유도 전자선 조사에 따른 기계적 강도의 변화를 보여주어 분자량의 변화를 예측할 수 있다(Zhang *et al*. 2010). 하지만, 전자선 조사 연구는 대부분 건조된 시료를 이용하여 높은 조사량에서 진행이 되었으나, 수용액 상태 또는 저 선량에서의 연구는 일부 보고되어 있다. 따라서, 본 연구에서는 히알루론산 수용액의 점도를 조절할 수 있는 방법으로 전자선을 통해 히알루론산 페이스트를 조사하고, 조사된 히알루론산의 특성을 분석하였다(Fig. 1).

Fig. 2에서는 적외선 분광기를 이용하여 조사 전후 시료의 스펙트럼을 확인할 수 있다. 히알루론산은 다수의 -OH 기를 포함하고 있기 때문에 3,450～3,100 cm^{-1}에서 -OH peak을 확인할 수 있으며, 이는 전자선 조사에 따라 변화되지 않고 지속적으로 관찰되었다. 또한, 전자선 조사

와 상관없이 1,618 cm^{-1}에서 C=O stretch peak가 관찰되었으며, 1,412 cm^{-1}에서는 C−O peak, 1,040 cm^{-1}에서는 C−OH 등의 메인 peak들이 관찰되어 전자선 조사 전후에 히알루론산의 화학 구조적 특성은 변화가 없는 것으로 확인되었다. 이는 기존에 보고되었던 전자선, 감마선 등으로 처리된 히알루론산 분말에서의 결과와 유사한 결과로 전자선 조사 자체는 히알루론산은 화학적 특성에 영향을 주지 않는 것으로 보인다.

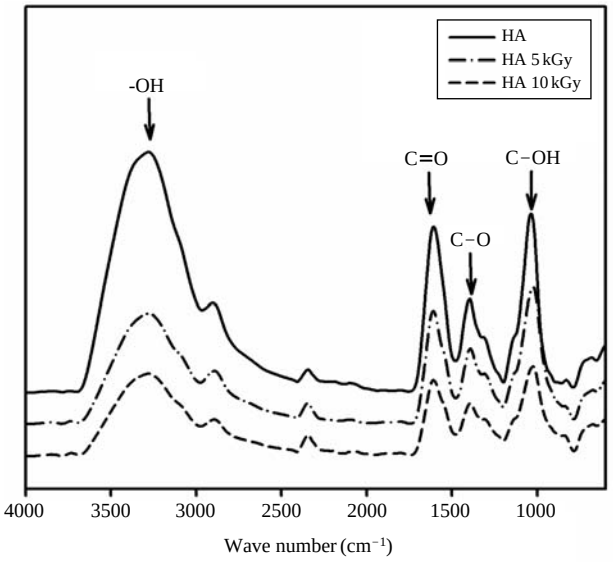

Fig. 2. ATR-FTIR spectrum of hyaluronic acid before- and after electron beam irradiation.

전자선 조사 전후의 히알루론산의 형태는 히알루론산 1 wt%용액을 동결 건조한 후 전자현미경을 통해 관찰하였다. 일반적으로 동결 건조된 히알루론산은 전형적인 하이드로겔의 건조 형태를 띠며, 수십에서 수백 마이크로미터 수준의 공극과 높은 다공도를 보인다(Luo *et al.* 2000). Fig. 3에서 보는 바와 같이 전자선 조사전의 히알루론산은 표면에 벌집모양의 공극을 갖고 있으며, 시트가 적층된 형태의 표면 구조를 갖고 있다. 전자선 조사 후의 히알루론산은 공극의 크기가 많이 증가했으나, 조사 전과 동일하게 높은 다공도와 벌집모양의 공극을 포함하고 있으며 적층형의 구조를 유지하고 있다. 그러나 조사량에 따른 형태의 변화는 관찰되지 않아 전자선 조사 자체가 전자현미경 상에서 관찰할 수 있는 히알루론산의 구조에 영향을 주지 않을 것으로 판단된다.

전자선 조사 전후 히알루론산 용액의 점도 변화를 관찰하기 위해 전자선이 조사된 히알루론산 1 wt% 수용액을 만들어 점도를 측정하였다. 서론에서 언급한 것처럼 히알루론산은 분자량이 매우 높아(1.8～2.5 mDa) 높은 점도를 유지하고, 고농도의 용액을 만드는 것이 어려워 사용에 제한이 있다. Fig. 4a에서 보는 바와 같이 조사전의 히알루론산 용액의 점도는 1,089 cP였으나, 이는 흡수선량의 증가에 따라 1 kGy에서는 293 cP, 2 kGy: 116 cP, 3 kGy: 56 cP, 5 kGy: 35 cP, 10 kGy: 16 cP로 감소하였다. 실제로 히알루론산 분말은 전자선 조사에 의해 50 kGy

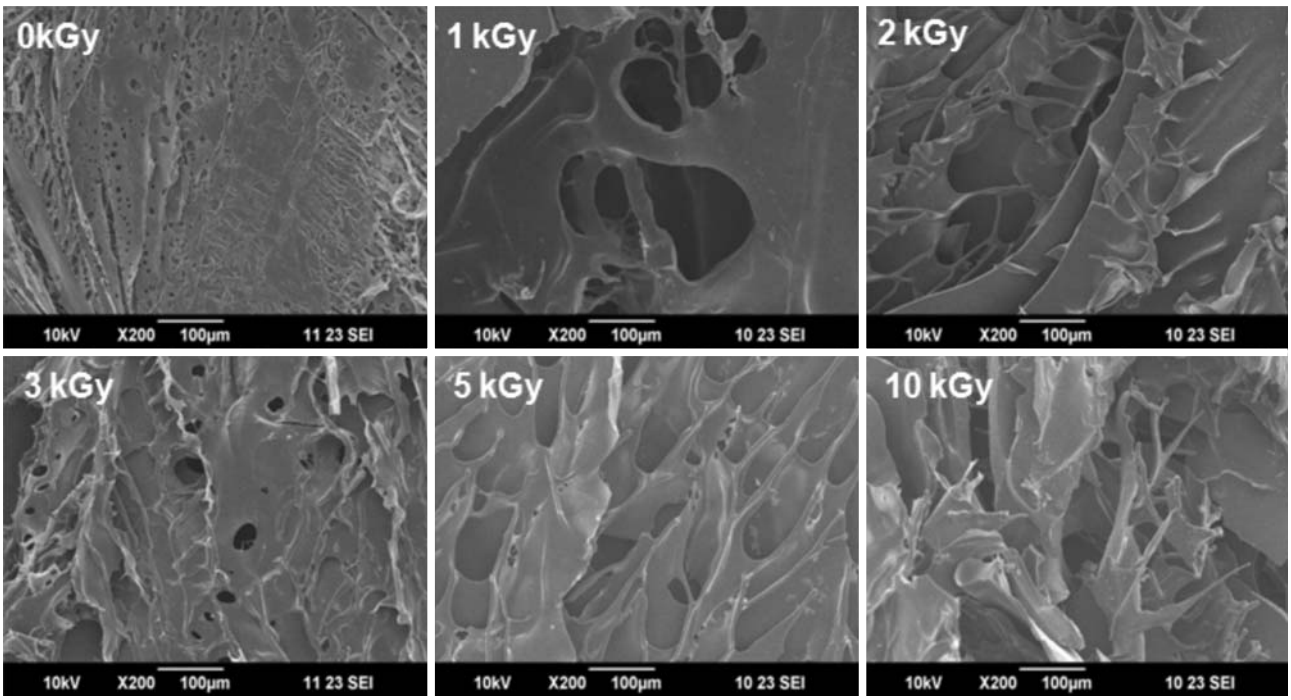

Fig. 3. SEM of freeze-dried hyaluronic acids with different absorbed doses.

에서 분자량이 약 80% 감소하는 결과가 보고 되었는데, 유사하게 저 선량에서도 매우 높은 점도의 감소폭을 보여주었다. 이는 분말과 수분을 함유하고 있는 페이스트 형태의 히알루론산의 차이로 보여지는데 이는 수분의 방사선 분해 생성물인 e^-, H_2O^+, H_2O^-, H^+, O^-, OH^-, $OH\cdot$, $HO_2\cdot$에 의해 전자선에 의해 활성화된 라디칼에 의한 것으로 생각된다. 이전에 유사하게 전자선 조사에 의한 분말과 용액의 점도변화를 관찰하였는데 용액에서 히알루론산의 점도 변화가 훨씬 컸다고 보고했다. 전자선 조사된 히알루론산(10 kGy)을 다양한 농도로 용해한 후 점도를 재측정 해본 결과, 농도의 증가에 따라 점도가 증가하지만 3 wt%에서 조차도 약 117 cP의 점도가 관찰되어 전자선을 조사하지 않은 히알루론산 용액보다 훨씬 낮은 점도를 유지하고 있었다(Fig. 4b). 따라서, 수분을 포함하는 페이스트 형태의 히알루론산의 전자선 조사는 흡수선량에 의존하여 높은 수준으로 점도를 감소시킨다고 볼 수 있다.

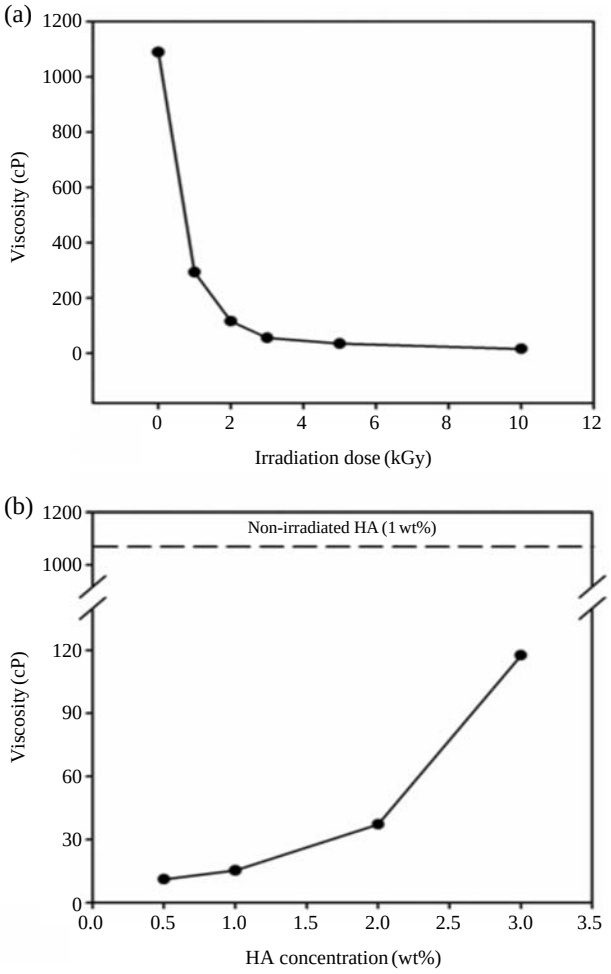

Fig. 4. Viscosity of a hyaluronic acid solution. (a) effect of absorption doses on viscosity, and (b) viscosity corresponding to concentration of hyaluronic acid-irradiated with 10 kGy.

히알루론산은 카르복실기를 가지고 있어 수용액 상에서 아민기를 가진 물질과 고분자 전해질 복합체를 형성한다(Tan *et al*. 2009). 이러한 특성으로 인해 히알루론산과 키토산은 고분자 전해질 복합체를 형성하고 이를 하이드로겔로 이용하는 연구가 보고 되었는데, 실제로 전자선을 조사한 히알루론산도 키토산과 고분자 전해질 복합체를 형성하는지 평가하기 위해 전자선 조사에 의해 점도가 감소한 히알루론산과 키토산 용액을 동일한 농도, 부피로 혼합하고 50 rpm에서 시간 경과에 따른 고분자 전해질 복합체의 형성을 관찰하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 키토산 용액에 히알루론산 용액에 넣는 즉시 키토산과 히알루론산은 고분자 전해질 복합체를 형성하여 흰색의 침전이 관찰된다. 이 침전은 가교된 하이드로겔의 형태를 갖고 있으며 형태를 유지하고 있다. 하지만, 시간 경과에 따라 전자선 조사된 히알루론산은 다른 양상을 보이는데 60초까지는 비슷한 형태를 보이지만 약 80초 후에 10 kGy로 조사된 시료부터 용액 전체의 색깔이 흰색으로 변하며 하이드로겔의 형태가 무너졌다. 150초 후에는 전자선 조사된 시료에서 모두 흰색의 침전이 증가하면서 하이드로겔의 형태가 무너졌으

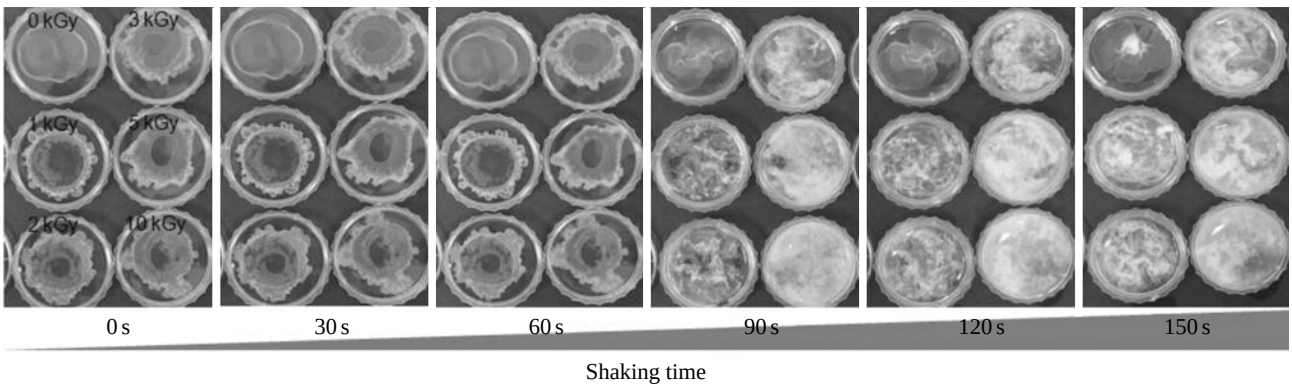

Fig. 5. Time-dependent observation of polyelectrolyte complex with irradiated hyaluronic acid and chitosan.

며 전자선이 조사되지 않은 히알루론산만이 초기 형태를 그대로 유지하고 있었다. 이러한 고분자 전해질 복합체 형태의 변화는 분자량에 기인한다고 추정할 수 있다. 실험에 사용된 키토산은 히알루론산보다 분자량이 상대적으로 낮은 편으로 긴 사슬의 히알루론산과 복합체를 형성하면서 하이드로겔의 형태를 유지할 수 있는데, 전자선 조사를 통해 사슬의 길이가 짧아진 히알루론산은 키토산과의 반응 초기 하이드로겔의 형태를 유지하다가 지속적인 회전력과 시간 경과에 따라 하이드로겔의 형태가 무너지고 상대적으로 작은 크기의 복합체로 침전이 형성되는 것으로 생각된다(Shin *et al*. 2007). 따라서, 전자선이 조사된 히알루론산도 조사 전과 동일한 화학적 특성을 유지하고 있음을 유추할 수 있다.

결 론

본 연구에서는 천연고분자로써 조직공학, 약물전달 그리고 화장품 산업에서 사용되고 있는 히알루론산의 전자선 조사 효과를 평가하였다. 히알루론산은 높은 생체적합성을 보이고 다량의 수분 함유가 가능해 하이드로겔이나 보습용 화장품의 용도로 사용되는데 분자량이 너무 높아 고농도의 용액의 제조 등의 문제가 있었다. 수분을 포함하는 페이스트 형태의 히알루론산은 1～10 kGy의 전자선 조사를 통해 화학 구조적, 형태학적 구조가 유지되었으며, 흡수선량이 증가할수록 점도는 낮아지는 경향을 보여주었다. 특히 페이스트 형태에서 감소된 점도는 분말을 전자선으로 조사할 때보다 낮아지는 것으로 기대되어, 저선량에서의 전자선 조사가 히알루론산의 점도를 감소시키는데 유효할 것으로 생각된다. 또한, 전자선 조사된 히알루론산은 키토산과 고분자 전해질 복합체를 형성함으로써 기능적인 특성 또한 유지되어 이들 저점도를 특성을 갖는 히알루론산은 조직공학 및 약물전달용 고분자 소재뿐만 아니라 보습용 화장품 및 기타 의료용 소재로 사용될 수 있을 것으로 예상된다.

사 사

이 논문은 교육과학기술부의 재원으로 시행하는 한국과학재단의 원자력기술개발사업으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

Alsberg E, Kong HJ, Hirano Y, Smith MK, Albeiruti A and Mooney DJ. 2003. Regulating bone formation via controlled scaffold degradation. *J. Dent. Res.* **82**(11):903-908.

Choi J-i, Kim J-K, Kim J-H, Kweon D-K and Lee J-W. 2010. Degradation of hyaluronic acid powder by electron beam irradiation, gamma ray irradiation, microwave irradiation and thermal treatment: A comparative study. *Carbohydr. Polym.* **79**(4):1080-1085.

Filipczak K, Wozniak M, Ulanski P, Olah L, Przybytniak G, Olkowski RM, Lewandowska-Szumiel M and Rosiak JM. 2006. Poly(ε-caprolactone) biomaterial sterilized by E-beam irradiation. *Macro. Bios.* **6**(4):261-273.

Jozwiakowska J, Wach RA, Rokita B, Ulanski P, Nalawade SP, Grijpma DW, Feijen J and Rosiak JM. 2011. Influence of electron beam irradiation on physicochemical properties of poly(trimethylene carbonate). *Poly. Deg. and Stab.* In Press.

Kogan G, Šoltés L, Stern R and Gemeiner P. 2007. Hyaluronic acid: A natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol. Lett.* **29**(1):17-25.

Luo Y, Kirker KR and Prestwich GD. 2000. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: New biomaterials for drug delivery. *J. Cont. Rel.* **69**(1):169-184.

Shin DY, Hwang E, Cho I-H and Moon MH. 2007. Molecular weight and structure characterization of sodium hyaluronate and its gamma radiation degradation products by flow field-flow fractionation and on-line multiangle light scattering. *J. Chromato. A* **1160**(1-2):270-275.

Shin H, Jo S and Mikos AG. 2003. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* **24**(24):4353-4364.

Shin YM, Kim K-S, Lim YM, Nho YC and Shin H. 2008. Modulation of spreading, proliferation, and differentiation of human mesenchymal stem cells on gelatin-immobilized poly(l-lactide-co-epsilon-caprolactone) substrates. *Biomacromolecules* **9**(7):1772-1781.

Tan H, Chu CR, Payne KA and Marra KG. 2009. Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **30**(13):2499-2506.

Zhang X, Kotaki M, Okubayashi S and Sukigara S. 2010. Effect of electron beam irradiation on the structure and properties of electrospun PLLA and PLLA/PDLA blend nanofibers. *Acta Biomater.* **6**(1):123-129.

Manuscript Received: May 24, 2011
Revision Accepted: May 30, 2011