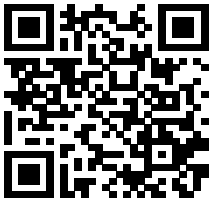


# Improving the Rheological Properties of Cross-linked Hyaluronic Acid Gels by Mixing in Mannitol as a Radical Scavenger

E Sle Kim, Bokryul Choi, Ju Hee Kang, Keyong Ho Lee\*  
Across, Chuncheon-si, Gangwon-do, Korea

\*Corresponding author: Keyong Ho Lee,  
Across, 23, Geodudanji 1-Gil, Dongnae-  
Myeon, Chuncheon-si, Gangwon-do 24398,  
Korea  
Tel.: +82 33 264 0963  
Fax: +82 33 264 0964  
Email: keyho625@naver.com

Received November 8, 2018  
Revised January 28, 2019  
Accepted February 8, 2019  
Published March 30, 2019



## Abstract

**Purpose:** This study aimed to evaluate the effect of mixing mannitol into cross-linked hyaluronic acid gels on their rheological properties. **Methods:** Cross-linked hyaluronic acid gels were prepared by mixing in mannitol to our own manufacturing process, and then the changes in their rheological properties due to chemical and thermal oxidative stress were investigated. The rheological factors evaluated were the storage modulus ( $G'$ ), loss modulus ( $G''$ ), complex viscosity ( $G^*$ ) and phase angle (P/A). **Results:** Mixing mannitol into the cross-linked hyaluronic acid gels caused their elasticity ( $G'$ ) and viscosity ( $G''$ ) to resist both frequency increase and oxidative stress caused by chemical and thermal stress. Adding mannitol also resulted in improved urine secretion in an animal model, and we therefore expect that it will reduce edema due to osmotic pressure. **Conclusion:** Mannitol's antioxidant effect contributed to the improving the cross-linked hyaluronic acid gels' rheological properties.

**Keywords:** Hyaluronic acid, Mannitol, Cross-linked gel, Rheology, Oxidative stress

## Introduction

Hyaluronic acid (히알루론산)은 분자량 5만 내지 1,000만 dalton의 무색 투명한 고점도 선형 다당류이며, 반복단위인 glucuronic acid와 N-acetyl glucosamine이 (1-3)과 (1-4)로 번갈아 결합되어 있다. 히알루론산은 피부, 눈의 초자체, 관절액, 땀줄, 닭 벼슬 등에 널리 분포되어 있으며, *Streptococcus* 속 등의 박테리아에 의해 생성되기도 한다(Kogan *et al.*, 2007). 상업적으로 생산이 가능한 히알루론산은 닭 벼슬이나 땀줄 등과 같은 생체조직으로부터 추출 및 정제하여 얻어지는 히알루론산과 미생물(주로 *Streptococcus* 속)을 배양하여 추출 및 정제로부터 생산한 히알루론산이 있다(Chien & Lee, 2007; Chong & Nielsen, 2003). 이러한 히알루론산의 사용은 주로 윤활 효과 및 세균 등의 침입에 대한 보호 효과가 있어 화장품 첨가제, 안과 수술 시 눈조직의 보호제, 퇴행성 관절염 치료제 및 조직수복용 의료기기(주로 성형필러) 등 광범위하게 사용되고 있다(Chong *et al.*, 2005; da Costa *et al.*, 2017; Kwon *et al.*,

2013).

이러한 히알루론산의 경우 화장품, 안과 및 관절주사 제품에는 히알루론산 자체로 아무런 화학적 처리없이 그대로 사용하는 경우가 과거에는 대부분이었다. 하지만 최근에는 관절주사를 포함하여 미용성형 분야에서 히알루론산을 화학적으로 수식을 통하여 새로운 형태로 사용하는 연구 및 제품 출시 사례가 증가하고 있다(Cameli *et al.*, 2016; Ha *et al.*, 2017). 히알루론산의 체내 반감기는 그 분자량의 양상에 따라서 차이는 있으나 일반적으로 혈액내에서는 3-5 min, 피부에서는 1일 이내이며 관절강 내에서 약 3주 정도의 반감기를 갖는 것으로 알려져 있다(Fraser *et al.*, 1981; Laurent *et al.*, 1991; Reed *et al.*, 1990). 따라서 이러한 히알루론산의 분해 특성으로는 조직수복을 위한 피부 보충재나 관절 내에서의 윤활 역할을 하는 관절주사제로의 기능성 특성에는 한계가 있어, 체내에서의 반감기를 연장시켜서 충분히 피부나 관절강 내의 조직보충 및 윤활 역할을 위하여 화학적으로 수식이 되어 있는 가교 히알루론산 겔(cross-linked hyaluronic acid gel) 제조연구가 많이 진행 되었고(De Bouille

et al., 2013), 현재는 이러한 가교 기술을 이용한 제품들이 다양하게 출시되어 조직 보충제 및 관절주사제로 사용되고 있다.

가교가 되지 않은 히알루론산과는 달리 cross-linked hyaluronic acid gel은 구조 자체가 변형이 되어 있어서 체내에 주입이 되었을 경우에 히알루론산과는 다른 면역반응을 나타낼 수 있어, 이것은 예상하지 못하는 부작용을 나타낼 수 있다. Funt와 Pavicic의 조사연구에 의하면 세계적으로 허가된 제품의 경우 50여개 이상의 업체에서 약 160여 제품이 유통되고 있고, 이러한 제품에서 다양한 부작용이 보고 되었다. 부작용의 종류로는 부종(edema), 멍(bruising), 피부 트러블(skin disorderation), 감염(infection), 결절(nodular masses), 마비(paresthesia), 혈관압박(vascular compromise) 등이 있다. 이러한 부작용의 발생건수는 월당 약 4.9±5.8건인 것으로 조사되었다(Funt & Pavicic 2013; Funt & Pavicic, 2015). 이 중에서도 edema의 경우는 필러시술 후 6개월 이내에 발생하는 급성부종(acute edema)과 이후에 나타나는 지연성부종(delayed edema)으로 type I hypersensitivity 반응으로 인한 것으로 알려져 있다(Lowe et al., 2005). 특히 이러한 부종의 부작용은 미용, 성형 특성상 민감한 불만사항으로 나타나고 있다. 일반적으로 히알루론산 필러 시술 후의 edema의 발생은 원재료의 수분 흡수성 특성으로부터 기인한 swelling 및 감염에 의한 염증 가능성이 있으나(Alijotas-Reig & Garcia-Gimenez, 2008), delayed edema의 경우는 정확한 원인을 찾기가 어려운 것이 현실이다.

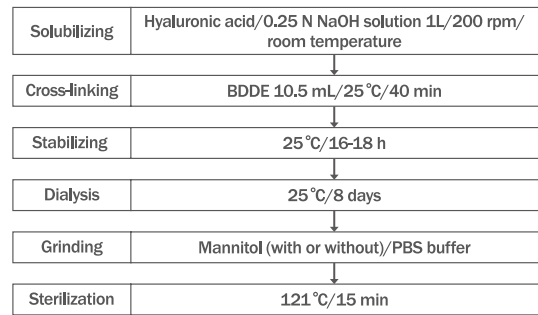
만니톨(Mannitol)은 분자식 C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>의 알코올 당류중의 하나이며, 기능적으로는 체내 대사에 장시간을 요하고, 혈액 뇌관문을 통과하지 않은 다당류로 혈중에 길게 존재하기 때문에 삼투압 활성물질로서의 작용이 있어서, 급성신부전이나 약물중독 시 배설 촉진을 위한 이뇨제, 뇌압이나 안압 강하의 약물로 사용되고 있다(Barnett et al., 1948; Heiene & Moe, 1998; Makimoto et al., 2018). 만니톨은 체내의 주사제로 현재 사용되고 있어서 안정성에 대하여 충분히 증명이 되어 있으므로 이 성분을 이용하여 조직수복에 사용되는 히알루론산 필러에 대한 기능성 첨가소재로 적합하다고 판단할 수 있다.

본 연구에서는 이러한 부종의 감소를 위하여 필러 제조공정상 사후 고압 습열 멸균을 고려하여 필러 고유의 점탄성 물성 변화를 보호하며, 동시에 염증 및 부종 감소를 위한 첨가제를 혼합한 기능성 조직수복용 필러 소재를 구현하고자 하였다.

## Methods

### 1. 재료

Hyaluronic acid (히알루론산) (MW: 1.2 MDa)는 Shiseido



**Figure 1. Manufacturing process scheme of BDDE-cross-linked hyaluronic acid gels.**

Hyaluronic acid (10g) was completely dissolved in 1L 0.25 M NaOH solution. For crosslinking reaction, 10.5 mL of BDDE was added in hyaluronic alkaline solution, followed by immediate and vigorous stirring. The mixture was incubated at 25°C for 16-18 h for stabilization. After the crosslinking reactions, the resulting crosslinked gel was purified by dialysis. Dialysis was performed against PBS for 8 days. The cross-linked gel was grinded with crusher, and then mixed with mannitol or PBS solution. The resulting cross-linked gels were sterilized at 121°C for 15 min. BDDE, 1,4-butanediol diglycidyl ether; PBS, Phosphate-buffered saline.

(Japan)으로 부터 구입하였다. 가교제인 1,4-butanediol diglycidyl ether (MW: 202.25)는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다. 히알루론산 용해를 위한 sodium hydroxide (MW: 40)는 Junsei Chemical Co. (Japan)에서 구입하였다. 투석을 위한 투석막(Cellu Sep T2)은 Membrane Filtration Products, Inc. (USA)로부터 구입하였다.

### 2. 가교 히알루론산 겔 제조

가교 히알루론산 겔의 제조는 먼저 용해, 가교반응, 가교안정화, 투석 및 분쇄 공정의 순서로 하였다(Figure 1). 먼저 용해 공정은 교반기에서 200 rpm의 속도로 0.25 N sodium hydroxide 수용액 1L에 히알루론산을 첨가하여 10% 히알루론산 수용액(w/v)을 제조하였다. 가교제인 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE)을 완전히 용해된 히알루론산 수용액에 10.5 mL (1.05%)을 넣어 40 min간 잘 혼합한 후, 반응물을 일정한 규격(132 mm×80 mm)의 가교조에 담아 25°C로 유지하면서 16-18 h 동안 가교를 시켰다. 가교 후 형성된 BDDE cross-linked 히알루론산 겔(가교 히알루론산 겔)을 투석막(Cellu Sep T2)에 담아 8일간 동안 상온에서 투석을 실시하였다. 투석이 완료된 가교 히알루론산 겔은 분쇄기(GM-300)에 담아 분쇄하였다. 분쇄는 PBS 완충액 혹은 mannitol과 PBS 완충액과 함께 첨가하면서 최종적으로 mannitol이 혼합된 가교 히알루론산 겔(1%, 5%,

20% mannitol/가교 히알루론산 겔)을 제조하였다.

### 3. 유변학적 물성 측정

가교 히알루론산 겔의 유변학적 물성 측정을 위하여 사용된 레오미터(rheometer)의 측정조건으로 플레이트는 지름 20 mm의 평판형(parallel plate type)으로, 플레이트의 간격(gap)은 2000  $\mu\text{m}$  및 분석 온도 25 $^{\circ}\text{C}$ 로 장비는 Malvern instruments (KINEXUS Pro+, USA)을 이용하여 측정하였다. 유변학적 특성은 일정한 스트레인 진폭(strain frequency,  $\gamma$ )을 유지하면서 시간( $t$ )에 따라 각주파수  $\omega = \omega(t)$ 로 점차 증가하는  $\gamma = \gamma_0 \sin \omega t$ 의 정현적 진동전단변형을 시료에 부가하여 그 응답을 측정하였다. 이때 각주파수는  $\omega = 0.025 - 10 \text{ rad/s}$ 까지 대수 스케일로 단계적으로 증가시켰다. 이로부터 탄성(storage modulus,  $G'$ ), 점성(loss modulus,  $G''$ ), 복소점도(complex viscosity,  $G^*$ ) 및 phase angle( $^{\circ}$ )을 측정하였다.

### 4. Oxidative stress 억제 효과

라디칼 반응에 의한 가교 히알루론산 겔을 분해시키기 위한 방법으로 잘 알려진 과산화수소(hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )를 사용하였다(Conrozier *et al.*, 2014; Jeong, 2017; Šoltés *et al.*, 2007). 가교 히알루론산 겔 및 mannitol 혼합 가교 히알루론산 겔에 oxidative stress을 형성시키기 위하여 30% 과산화수소를 사용하여 가교 히알루론산 겔과 혼합하여 과산화수소의 최종반응농도 2.7%가 되도록 하여 oxidative stress을 유발시켰다. 과산화수소와 혼합된 가교 히알루론산 겔은 레오메타를 이용하여 유변학적 특성을 측정하였다. 과산화수소의 첨가는 레오메타를 이용하여 유변학적 물성 측정 시간을 고려하여 레오메타의 측정 바로 직전 5 min 전에 과산화수소를 첨가하여 빠르게 교반한 후에 측정하였다.

### 5. Mannitol 혼합에 의한 가교 히알루론산 겔의 열안정성

Mannitol 혼합에 의한 가교 히알루론산 겔의 가열 시 형성되는 radical에 의한 가교 히알루론산 겔의 구조적 파괴 정도를 측정하였다. 가교 히알루론산 겔의 열안정성을 위한 열은 121 $^{\circ}\text{C}$ 의 고압습열멸균(autoclave) 조건으로 하였다. Mannitol의 농도별로 제조한 가교 히알루론산 겔을 pre-filled syringe에 1 mL씩 충전하여 121 $^{\circ}\text{C}/15 \text{ min}$  고압습열멸균기로 열을 가한 후, 각각의 시료(0%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5% mannitol/가교 히알루론산 겔)에 대하여 유변학적 특성의 변화를 측정하였다.

### 6. 부종 억제 측정을 위한 이노 작용 동물 시험

삼투압으로 발생하는 부종은 가교 겔 자체로 정맥투여가 불가능하여 겔 첨가되는 mannitol의 농도로 이노 효과를 측정하여 평가하였다. 즉, 이노 작용이 활발한 경우는 삼투압으로

부터 발생하는 부종억제 효과가 있는 것으로 평가하였다. 시험 전일부터 실험동물은 단식시켰으나 물은 공급하였다. 마취된 개(pentobarbital sodium을 35 mg/kg. i.v.)는 동물고정대에 배위로 고정하여 호흡을 용이하게 하기 위하여 기도 내에 endotracheal tube를 넣어서 고정하고 주입액의 주입과 정맥 내의 mannitol의 투여는 상지정맥을 이용하였으며 주입액의 주입은 peristaltic pump를 사용하였다. 집뇨는 고정된 개를 정중절개하여 양측수요관에 삽입고정한 polyethylene관(PE관)을 통하여 하였다. Clearance는 clearance 물질(creatinine, PAH)을 일정한 혈중농도에 일시에 도달하도록 초회량을 투여한 후 곧이어 노중에 배설되는 만큼 주입액에 첨가하여 계속 주입하였으며 매clearance 중간에 대퇴동맥에 heparine-saline으로 채워서 삽입 고정하여둔 PE관을 통하여 채혈하여 곧 원침한 다음 혈장을 분리하여 냉장고에 보관하였다가 노와 함께 분석에 사용하였다. Creatinine은 Peters & Van Slyke (1944)의 방법, PAH는 Smith *et al.* (1945)의 방법을 준하였고  $\text{Na}^+$ 과  $\text{K}^+$ 은 flame photometer (Models PFP7, Jenway, UK)로 osmolarity는 osmometer (3250; Fisher scientific lab, UK)로 측정하였다. 본 실험을 위하여 동물윤리위원회의 승인을 득하였다(KJAEC-2018207).

### 7. 통계분석

실험결과는 평균 및 표준편차로 나타내었으며, 이를 위한 통계학적 검증은 Student's paired *t*-test로 하였다.

## Results and Discussion

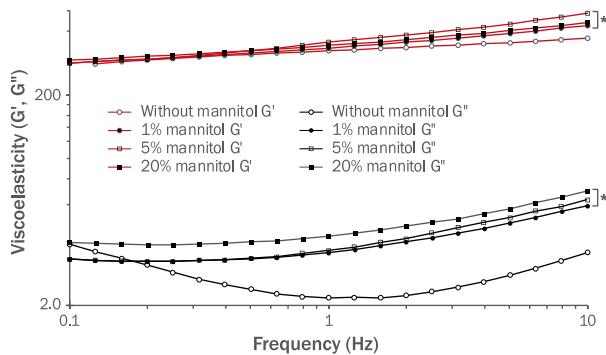
### 1. 가교 히알루론산 겔의 유변학적 성질의 변화

Mannitol 첨가가 가교 히알루론산 겔의 탄성( $G'$ ) 및 점성( $G''$ )에 미치는 영향은 Figure 2와 같았다.

가교 히알루론산 겔에 있어서mannitol의 첨가는 농도와 상관없이 측정된 모든 frequency (0.1-10 Hz) 범위에서 증가하는 경향이 나타났다.  $G'$ 에서 0.1 Hz frequency의 값은 mannitol의 첨가 농도에 따라서 큰 변화는 없었다. Mannitol 0%, 1%, 5% 및 20% 첨가군에서  $G'$ 의 값은 0.1 Hz에서 각각 280.5, 283.0, 283.1 및 291.5 Pa로 측정이 되었다. 20% 첨가군은 약간의  $G'$ 의 상승을 가져왔으나, 나머지 첨가군 대비 유의적으로 증가된 값은 아닌 것으로 평가되었다.

한편  $G''$ 의 경우는 mannitol의 첨가농도의 증가에 따라서 0.1 Hz에서 각각 38.9, 33.1, 33.1 및 39.8 Pa로 나타났으며, mannitol 0%와 20%에서 모두 나머지 2군 대비 다른 값이 나타났으나 유의적인 차이는 없었다.

Frequency가 10배 정도 증가된 시점 인 1 Hz에서의  $G''$ 의 경



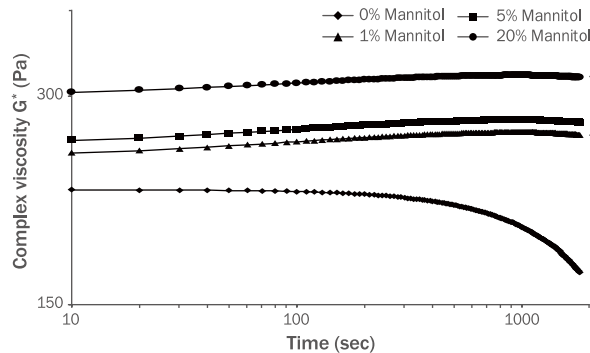
**Figure 2. Dynamic rheological properties of cross-linked HA gel mixture with and without mannitol.**

Rheological analyses were performed under continuous and oscillatory flow conditions using a rotational rheometer (Kinexus DSR; Malvern, USA) with a plate-plate geometry (fixed 2 mm gap) at 25 °C. The viscoelastic properties,  $G'$  and  $G''$  were measured at fixed oscillation amplitudes within each material's linear viscoelastic region by varying the oscillation frequency (0.025-10 rad/s). Results significantly different from those of the control group ( $p < 0.05$ ).  $G'$  storage modulus;  $G''$ , loss modulus.

우, mannitol이 첨가된 군과 그렇지 않은 군에서 극명한  $G''$ 의 차이를 나타내었다. Mannitol이 첨가되는 않은 군에서는 21.6 Pa로 초기 Hz 값은 38.9 Pa 대비 감소하였으며, mannitol이 첨가된 군은 농도와 상관없이 커다란 변화없이 유지되는 경향을 보였으며, 구체적으로 0.1 Hz와 1 Hz 사이에서 서서히 증가되는 경향을 보였으나 유의적인 증가로는 볼 수 없었다.

Frequency가 초기 대비 100배 증가된 10 Hz에서는  $G'$  및  $G''$  모두 mannitol이 첨가된 군과 첨가되지 않은 군의 차이는 극명하게 나타났다.  $G'$ 의 경우, mannitol의 농도 의존적 첨가(0%, 1%, 5% 및 20%)에 따라서 10 Hz에서 각각 378.3, 427.4, 487.2 및 440.2 Pa로 측정되었으며, mannitol이 첨가된 군과 첨가되지 않은 군에서는 0.1 Hz 및 1 Hz 대비 모두 유의적으로 증가하였다.

한편 mannitol 첨가 농도에 따라서는 농도 의존적 효과는 볼 수 없었다.  $G''$ 의 경우는 mannitol의 첨가 농도 0%, 1%, 5% 및



**Figure 3. Change of complex viscosity ( $G^*$ ) of cross-linked gel mixtures with and without mannitol by hydroxyl radicals.**

Cross-linked gels with and without added mannitol were subjected to oxidative stress, generated by adding hydrogen peroxide (30%) at a final concentration of 2.7% (v/v). The complex viscosity was measured using a plate-plate rheometer at 25 °C, at a frequency of 1 Hz. Results significantly different from those of the control group ( $p < 0.05$ ).

20%에 따라서 각각 35.5, 59.5, 63.5 및 69.6 Pa로 농도 의존적이며 유의 있게 증가하였다. 특히 mannitol이 첨가된 군과 첨가되지 않은 군의 차이는 확실하게 나타났다. Mannitol은 항산화 효과가 우수한 polyol 계열의 ROS scavenger로 알려져 있다. 이러한 항산화 효능이 히알루론산 가교 젤이  $G'$  및  $G''$ 에 안정화를 가져오는 것으로 사료된다.

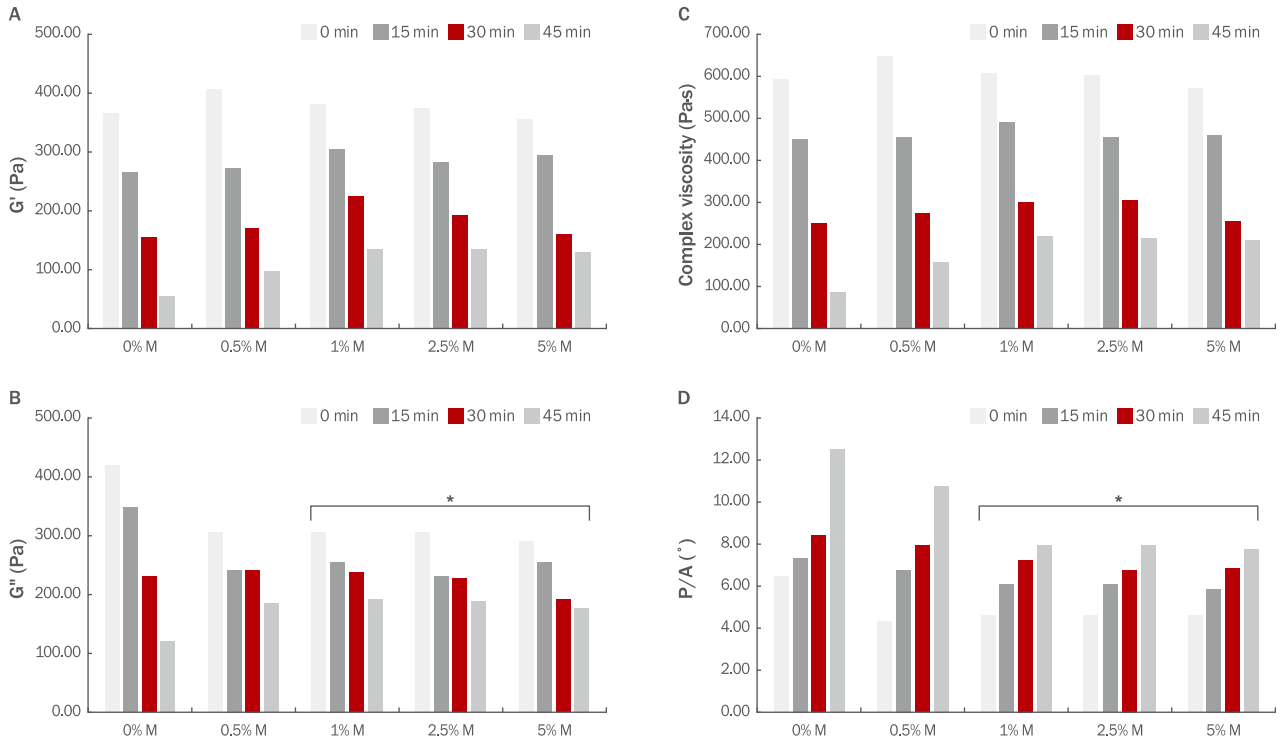
## 2. 가교 히알루론산 젤의 산화 안정성

히알루론산의 화학적인 특성으로 산화에 의하여 분자량이 감소되어 점도가 떨어진다. 따라서 산화로 부티의 보호는 분자량의 감소를 막아 고유의 점도를 유지해 줄 수 있다. 가교된 히알루론산 젤의 산화로부터 보호효과를 위하여 첨가된 mannitol의 산화 안정성을 측정하였으며, 그 결과는 Figure 3 및 Table 1와 같았다. 가교 히알루론산 젤의 과산화수소( $H_2O_2$ )에 의한 산화 안정성의 평가는 가교 젤의 유변학적 요소인 탄성( $G'$ ), 점성( $G''$ ) 및 복소 점도( $G^*$ )로 평가하였다.

**Table 1. Changes in the rheological properties ( $G'$ ,  $G''$ ) of cross-linked gel mixtures with and without mannitol due to hydroxyl radicals**

	Time (s)	10	120	1,000	1,800
0% Mannitol	$G'$ (Pa)	242.6	241.1	217.3	190.0
	$G''$ (Pa)	43.0	42.5	40.3	38.8
1% Mannitol	$G'$ (Pa)	243.7	254.9*	262.5*	259.9*
	$G''$ (Pa)	48.3*	45.7*	45.0*	46.0*
5% Mannitol	$G'$ (Pa)	253.7*	264.9*	272.5*	269.9*
	$G''$ (Pa)	53.3*	50.7*	50.0*	51.0*
20% Mannitol	$G'$ (Pa)	293.7*	304.9*	312.5*	309.9*
	$G''$ (Pa)	79.3*	76.7*	76.0*	77.0*

Results significantly different from those of the control group ( $p < 0.05$ ).



**Figure 4. Thermal stability of cross-linked gel mixtures with and without mannitol.**

(A)  $G'$ , (B)  $G''$ , (C) Complex modulus, (D)  $P/A$ . The complex viscosity was measured using a plate-plate rheometer at 25 °C, at a frequency of 1 Hz. Results significantly different from those of the control group ( $p < 0.05$ ).  $G'$  storage modulus;  $G''$ , loss modulus;  $P/A$ , phase angle.

Mannitol이 첨가되는 낮은 군에서는 과산화수소의 첨가에 의하여  $G'$  및  $G''$  모두 과산화수소에 의한 노출 시간이 지남에 따라서 유의적으로 감소하였다.  $G'$  및  $G''$ 의 측정 초기(10 s)의 값은 각각 242.6과 43.0 Pa로 나타났고, 측정 최종(1,800 s) 값은 각각 190.0 및 38.8 Pa로 나타났으며 감소율은 각각 21.7% 및 9.7%로  $G'$ 값이  $G''$  대비 많이 감소하는 것으로 나타났다.

Mannitol 첨가군에서는 첨가한 농도에 따른 농도 의존적인 효과는 나타나지 않았다. 특히  $G'$ 값의 경우는 mannitol 첨가에 의하여 과산화수소에 의한 노출 시간이 경과하여도 감소가 관찰되지 않았으며,  $G''$ 의 경우는 mannitol 첨가량에 따라서  $G''$ 의 감소에 저항성을 나타내는 경향을 보였으나 유의차는 없었다. Mannitol 첨가의 유무에 따라서는  $G'$  및  $G''$  모두 유의적인 효과가 나타났다(Table 1).

$G'$  및  $G''$ 의 변화를 복합적으로 반영하는 것이  $G^*$ 인데,  $G^*$  역시  $G'$  및  $G''$ 의 변화와 같이 mannitol의 첨가 유무에 따라서 산화적 스트레스에 대한 저항성이 유의하게 나타났다. 또한 mannitol의 첨가 농도에 따라서 농도 의존적인 효과가 나타났다(Figure 3). Conrozier *et al.* (2014)의 연구내용에서 mannitol이 3.5%의 농도로 첨가된 히알루론산 관절주사제와 mannitol이 첨가되지 않은 기존의 관절주사제에 의한 산화 스트레스에 대한 관절주

사제의 유변학적인 변화를 측정된 결과, mannitol이 첨가된 관절주사제가 산화에 대한 저항이 나타났다. 본 실험의 결과 역시 Conrozier *et al.* (2014)의 연구결과와 일치하는 것으로 판단하였다.

### 3. 가교 히알루론산 겔의 열안정성

가교 히알루론산 겔의 제조 후 최종 제품을 위해서는 멸균을 시켜야 한다. 멸균의 방법으로는 고압습열멸균을 실시하게 되며, 이때에 열에 의한 산화 스트레스가 발생하게 되어 가교 겔의 분해를 가져오게 된다. 이러한 분해는 곧바로 유변학적 물성에 영향을 주어 탄성( $G'$ ), 점성( $G''$ ), 복소점도( $G^*$ ) 및 phase angle ( $P/A$ )에 변화를 가져오는데, mannitol 첨가에 의하여 이와 같은 유변학적 물성 변화에 어떠한 영향을 주는지 측정하였다. 일반적으로 히알루론산은 열에 대하여 불안정하며, 가교된 히알루론산 겔 역시 열에 불안정할 수밖에 없다(Caspersen *et al.*, 2014). 121 °C의 고압습열멸균에서 가교 히알루론산 겔은 가열로 인하여 가열 전의 유변학적인 물성의 붕괴를 가져왔다(Figure 4).

가열 시간이 증가함에 따라서  $G'$ ,  $G''$  및  $G^*$ 의 감소와  $P/A$ 의 증가를 가져와 겔상의 구조가 가열 스트레스로 인하여 붕괴되는 것으로 평가되었다. 즉,  $G'$ 의 경우는 가열 시간 15 min, 30

## Effect of Mannitol on Cross-linked Hyaluronic Acid Gels

min 및 최종 45 min까지 측정된 결과, 최초 370.0 Pa에서 각각의 물성 값은 267.4 Pa (감소율 24%), 155.2 Pa (감소율 58%) 및 54.5 Pa (감소율 85%)이었고(Figure 4A),  $G'$  값은 변화는 최초 41.7 Pa에서 각각 34.6 Pa (감소율 17%), 23.0 Pa (감소율 45%) 및 12.1 Pa (감소율 71%)(Figure 4B),  $G''$  값은 최초 592.5 Pa에서 각각 451.1 Pa (감소율 24%), 249.7 Pa (감소율 58%) 및 88.9 Pa (감소율 85%)(Figure 4C), P/A 값은 최초 6.4° 에서 각각 7.4°, 8.4° 및 12.5°로 나타났다(Figure 4D).

Mannitol의 첨가에 의하여  $G'$ ,  $G''$ ,  $G''$  및 P/A의 변화에 영향을 미쳤다. 가교 겔에 대하여 mannitol의 첨가는 가열에 의한 스트레스트로부터 가교 구조의 안정화를 가져다 주는 것으로 평가되었다.

0.5% mannitol 첨가 군의 경우,  $G'$  값의 가열시간(15 min, 30 min 및 45 min)에 따른 변화는 최초 407.9 Pa에서 각각 272.6

Pa (감소율 33%), 170.9 Pa (감소율 58%) 및 98.2 Pa (감소율 76%)이었고(Figure 4A),  $G''$  값은 최초 30.5 Pa에서 각각 24.1 Pa (감소율 21%), 24.0 Pa (감소율 21%) 및 18.6 Pa (감소율 39%)(Figure 4B),  $G''$  값은 최초 651.0에서 각각 456.5 Pa (감소율 30%), 274.7 Pa (감소율 58%) 및 159.0 Pa (감소율 76%)(Figure 4C), P/A 값은 최초 4.3°에서 각각 6.7°, 8.0° 및 10.7°로 나타났다(Figure 4D).

1% mannitol 첨가 군의 경우,  $G'$  값의 가열시간에 따른 변화는 최초 382.5 Pa에서 각각 306.1 Pa (감소율 20%), 226.0 Pa (감소율 41%) 및 137.4 Pa (감소율 64%)이었고(Figure 4A),  $G''$  값은 최초 30.6 Pa에서 각각 25.4 Pa (감소율 17%), 23.7 Pa (감소율 23%) 및 19.1 Pa (감소율 37%)(Figure 4B),  $G''$  값은 최초 610.7에서 각각 489.7 Pa (감소율 20%), 298.5 Pa (감소율 51%) 및 220.8 Pa (감소율 64%)(Figure 4C), P/A 값은 최

**Table 2. Effect of mannitol injections on renal function in the dog model**

Treatment	Parameter	Time since mannitol injection		
		0-30 min	0-60 min	0-120 min
Control	Urine Vol (mL/min)	6.8±0.8	13.9±0.9	19.1±3
	GFR (mL/min)	44.1±2.6	44.2±4.5	44.1±3.8
	RPF (mL/min)	91.1±4.1	100.1±11.3	105±10.6
	Cosm (mL/min)	4.35±0.3	4.79±0.7	5.03±1.1
	C <sub>H2O</sub> (mL/min)	-1.03±0.1	-1.56±0.1	-1.33±0.4
	E <sub>Na</sub> (μEq/min)	384.5±26.1	422.9±24.1	444.1±30.1
	E <sub>K</sub> (μEq/min)	46.1±2.6	50.3±6.7	52.8±6.1
	MAP (mmHg)	139.3±3.6	153.2±11.8	150.2±19.7
1% Mannitol	Urine Vol (mL/min)	7.1±0.4	14.3±1.2	19.5±1.8
	GFR (mL/min)	45.9±5.1	45.1±6.5	45.0±8.1
	RPF (mL/min)	94.7±9.4	102.1±14.2	107.1±10.5
	Cosm (mL/min)	4.5±0.7	4.9±1.1	4.9±1.4
	C <sub>H2O</sub> (mL/min)	-1.1±0.1	-1.1±0.1	-1.2±0.1
	E <sub>Na</sub> (μEq/min)	399.9±29.2	431.4±28.5	453.0±19.6
	E <sub>K</sub> (μEq/min)	47.9±3.7	51.3±4.8	53.9±5.1
	MAP (mmHg)	144.9±10.4	156.3±9.9	153.2±11.4
5% Mannitol	Urine Vol (mL/min)	8.4±0.8*	16.2±0.6*	21.3±3.9
	GFR (mL/min)	50.5±2.9*	47.8±3.5	49.5±4.7
	RPF (mL/min)	104.2±9.9	108.2±2.4	117.8±5.5
	Cosm (mL/min)	5.0±0.7	5.2±0.8	5.4±0.5
	C <sub>H2O</sub> (mL/min)	-1.2±0.1	-1.2±0.1	-1.3±0.1
	E <sub>Na</sub> (μEq/min)	439.9±24.1	457.2±30.5	498.3±22.2
	E <sub>K</sub> (μEq/min)	52.7±6.3	54.4±3.7	59.2±8.2
	MAP (mmHg)	159.4±9.6	165.6±11.5	168.5±10.2
20% Mannitol	Urine Vol (mL/min)	47.7±2.9*	85.2±2.5*	107.2±21.3*
	GFR (mL/min)	50.5±2.9*	47.8±3.5*	49.5±4.7*
	RPF (mL/min)	177.2±30.3*	227.3±28.4*	271.0±30.7*
	Cosm (mL/min)	8.5±0.7*	10.9±0.4*	12.5±1.1*
	C <sub>H2O</sub> (mL/min)	-2.0±0.1*	-2.4±0.1*	-1.6±0.1*
	E <sub>Na</sub> (μEq/min)	483.9±40.2*	503.0±20.6*	548.1±17.8*
	E <sub>K</sub> (μEq/min)	58.0±4.1*	59.8±3.3	65.2±5.6*
	MAP (mmHg)	270.9±20.1*	281.6±17.3*	286.5±19.4*

Data show means±S.D. of 6 experiments. Vol, urine flow rate; GFR, glomerular filtration rate, calculated from the creatinine clearance; RPF, renal plasma flow, calculated from the p-aminohippuric acid clearance; Cosm and C<sub>H2O</sub>, osmolar substance and free water clearances, respectively; E<sub>Na</sub> and E<sub>K</sub>, amounts of sodium and potassium excreted in urine, respectively; MAP, mean arterial pressure. Results significantly different from those of the control group (\**p*<0.05); S.D., standard deviation.

초 4.6°에서 각각 6.1°, 7.3° 및 7.9°로 나타났다(Figure 4D).

2.5% mannitol 첨가 군의 경우, G'값의 가열시간에 따른 변화는 최초 377.7 Pa에서 각각 283.7 Pa (감소율 25%), 191.0 Pa (감소율 49%) 및 191.0 Pa (감소율 64%)이었고(Figure 4A), G''값은 최초 30.5 Pa에서 각각 22.9 Pa(감소율 25%), 22.6 Pa (감소율 26%) 및 18.7 Pa (감소율 39%)(Figure 4B), G\* 값은 최초 603.0에서 각각 453.8 Pa (감소율 25%), 306.1 Pa (감소율 49%) 및 215.9 Pa (감소율 64%)(Figure 4C), P/A값은 최초 4.6°에서 각각 6.0°, 6.8° 및 7.9°로 나타났다(Figure 4D).

5% mannitol 첨가 군의 경우, G'값의 가열시간에 따른 변화는 최초 357.7 Pa에서 각각 296.9 Pa (감소율 17%), 158.3 Pa (감소율 56%) 및 131.5 Pa (감소율 63%)이었고(Figure 4A), G''값은 최초 28.9 Pa에서 각각 25.4 Pa (감소율 12%), 19.1 Pa (감소율 34%) 및 17.7 Pa (감소율 39%)(Figure 4B), G\* 값은 최초 571.1에서 각각 462.0 Pa (감소율 19%), 253.8 Pa (감소율 56%) 및 211.2 Pa (감소율 63%)(Figure 4C), P/A값은 최초 4.6°에서 각각 5.9°, 6.9° 및 7.7°로 나타났다(Figure 4D).

위의 결과로부터 알 수 있듯이 mannitol의 첨가농도에 따라서 각각 유변학적인 항목인 G', G'', G\* 및 P/A농도 의존적인 효과는 볼 수 없었으며, 첨가량 1% 이상(가열시간 45 min)에서 G\* 및 P/A 값에서 mannitol을 첨가하지 않은 군 대비 유의한 효과가 관찰되었다. 즉, mannitol은 가교 겔의 점탄성 성질을 균형 있게 유지하면서 열에 의한 점탄성 물성의 감소에 저항성을 주는 것으로 평가되었다.

#### 4. Mannitol의 이노 효과

Table 2는 mannitol의 농도별에 따른 신장작용에 대한 결과이다. Mannitol의 투여 농도에 따라서 투여 후 시간에 따른 노량과 생화학적 관련 인자 들을 측정하였다. 그 결과 mannitol 1% 및 5% 농도 투여군에서는 노량의 증가를 나타내었고, 5% 농도 투여군에서는 유의적인 증가가 나타났다. 관련 생화학적인 지표 들인 사구체여과율(glomerular filtration rate, GFR), 신혈류량(renal plasma flow, RPF), 삼투질제거율(clearance of osmolar, Cosm), 평균혈압(mean arterial pressure, MAP) 및 노중의 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>의 배설량(E<sub>Na</sub> 및 E<sub>K</sub>)이 증가하였으나 유의적이지는 않았다. Mannitol 20%의 경우는 노량과 동시에 사구체여과율(GFR), 신혈류량(RPF), 삼투질제거율(Cosm), 평균혈압(MAP) 및 노중의 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>의 배설량(E<sub>Na</sub> 및 E<sub>K</sub>)이 유의적으로 증가하였다. 이와 같이 mannitol의 경우는 혈류학적 개선에 의해서 이노작용을 나타내는 것으로 평가되었다. 이러한 혈류학적 개선효과는 부종의 조절을 위하여 임상적으로 자주 사용되는 것(Jeon, 2011)으로 가교 겔에 mannitol을 첨가하는 것은 이러한 생리활성을 충분히 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

## Conclusion

Mannitol은 항산화 효과가 우수한 polyol 계열의 ROS scavenger로 알려져 있다. 본 연구에서 이러한 mannitol의 항산화 효과를 이용하여 가교 히알루론산 겔의 화학적 또는 가열에 의한 산화적 스트레스에 저항성이 있는 가교 겔을 구현하고자 하였다.

그 결과 가교 겔에 mannitol의 첨가 유무에 따라서 가교 겔이 갖는 고유의 유변학적 물성인 탄성(G'), 점성(G''), 복소점도(G\*) 및 phase angle (P/A)에 유의적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. Mannitol의 첨가는 가교 겔의 점탄성(viscoelasticity)에 영향을 주는 탄성(G') 및 점성(G'')에 있어서 frequency (변형율)의 증가에 따라서 매우 안정적인 변화거동을 보였다. 따라서 mannitol의 첨가로 인하여 frequency의 증가에 따른 스트레스에 저항을 주어 frequency의 증가에 불구하고 가교 겔의 G'과 G''급격한 증가나 감소에 영향을 미치지 않고 일정한 거동을 유지해 주었다.

가교 겔의 화학적 산화에 대한 스트레스에 있어서도 mannitol의 첨가에 따른 유변학적 물성을 보호해 주는 것으로 나타났다. 특히 G'과 G''의 거동을 모두 종합하여 나타내는 복소점도(G\*)에 있어서 mannitol의 첨가가 과산화수소에 의한 산화적 스트레스에 대한 저항성을 노출시간의 증가에 따라서 극명하게 관찰할 수 있었으며, 첨가량의 증가에 따라서 초기 G\*값의 증가가 나타났고 그 거동의 변화는 산화적 스트레스의 노출시간이 증가하여도 변화 없이 안정한 거동 양상을 나타내었다.

또한 가교 겔의 제조 후에 가열에 따른 안정성을 가열 시간의 증가에 따라서 관찰한 결과, mannitol의 첨가는 가열 시간이 증가함에 따라서 열에 대한 산화적 스트레스에 대한 저항성을 나타내었다. 농도에 따른 농도 의존적인 효과 보다는 열에 대한 노출 시간이 길어짐에 따라서 유변학적 물성 들의 감소에 대한 저항 효과가 더 잘 나타났다. 그 이유는 mannitol 자체가 열에 안정하여 그 생리활성을 유지하기 때문으로 사료되었다.

의약품에서 mannitol의 약효로는 이노제로 수술 중 혹은 수술 후나 외상으로 인한 급성신부전의 예방 및 치료, 약물 중독 시의 배설 촉진, 뇌압 및 안압의 강하에 대한 적응증을 가지고 있다. 이로 인한 효과로 부종의 조절에 주로 사용되고 있다. 이러한 기능은 가교 겔을 이용한 조직수복용 필러에서 발생할 수 있는 부종의 감소에 영향을 줄 수 있다고 판단된다.

본 연구내용에서는 이러한 이노 효과를 측정함으로써 부중에 영향을 줄 수 있을 것으로 평가하였다. 본 연구에서는 mannitol이 혼합된 가교 겔로 피하 투여로 인한 평가가 불가능하여 mannitol 용액으로 평가하였으나, 가교 겔을 이용하여 부종의 발생 유무를 직접 평가할 수 있는 동물 모델의 개발도 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로 mannitol의 항산화 기능에 의하여 가교 히알루론산 겔의 유연학적 성질을 개선시키는 것으로 평가되었다. 본 연구의 결과로 기존의 의약품과는 다르게 성형 필러에서의 유발이 될 수 있는 부종을 예방할 수 있는 최소의 농도를 도출하였다는 데 의의가 있다고 판단된다.

### Acknowledgements

본 연구는 중소벤처기업부의 2017년도 제4차 제품공정개선 기술개발사업에 의하여 이루어진 것임(과제번호 S2561438).

### References

- Alijotas-Reig J, Garcia-Gimenez V. Delayed immune-mediated adverse effects related to hyaluronic acid and acrylic hydrogel dermal fillers: clinical findings, long-term follow-up and review of the literature. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 22: 150-161, 2008.
- Barnett HL, Hare K, McNamara H, Hare R. Measurement of glomerular filtration rate in premature infants. *The Journal of Clinical Investigation*, 27: 691-699, 1948.
- Cameli N, Mariano M, Serio M, Berardesca E. Clinical and instrumental evaluation of a cross-linked hyaluronic acid filler dermal injection: effects on nasolabial folds skin biophysical parameters and augmentation from a single-dose, monocentric, open-label trial. *Giornale Italiano Di Dermatologia E Venereologia*, 151: 507-514, 2016.
- Caspersen MB, Roubroeks JP, Qun L, Shan H, Fogh J, Ruidong Z, Tømmeraas K. Thermal degradation and stability of sodium hyaluronate in solid state. *Carbohydrate Polymers*, 107: 25-30, 2014.
- Chien LJ, Lee CK. Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin. *Biotechnology Progress*, 23: 1017-1022, 2007.
- Chong BF, Blank LM, Mclaughlin R, Nielsen LK. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66: 341-351, 2005.
- Chong BF, Nielsen LK. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Biotechnology*, 100: 33-41, 2003.
- Conrozier T, Mathieu P, Rinaudo M. Mannitol preserves the viscoelastic properties of hyaluronic acid in an *in vitro* model of oxidative stress. *Rheumatology and Therapy*, 1: 45-54, 2014.
- da Costa A, Biccigo DGZ, de Souza Weimann ET, Mercadante LM, Oliveira PRG, Prebianchi SB, Abdalla BMZ. Durability of three different types of hyaluronic acid fillers in skin: are there differences among biphasic, monophasic monodensified, and monophasic polydensified products? *Aesthetic Surgery Journal*, 37: 573-581, 2017.
- De Bouille K, Glogau R, Kono T, Nathan M, Tezel A, Roca-Martinez JX, Paliwal S, Stroumpoulis D. A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatologic Surgery*, 39: 1758-1766, 2013.
- Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Baxter E. Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. *Biochemical Journal*, 200: 415-424, 1981.
- Funt D, Pavicic T. Dermal fillers in aesthetics: an overview of adverse events and treatment approaches. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 6: 295-316, 2013.
- Funt D, Pavicic T. Dermal fillers in aesthetics: an overview of adverse events and treatment approaches. *Plastic Surgical Nursing*, 35: 13-32, 2015.
- Ha CW, Park YB, Choi CH, Kyung HS, Lee JH, Yoo JD, Yoo JH, Choi CH, Kim CW, Kim HC, et al. Efficacy and safety of single injection of cross-linked sodium hyaluronate vs. three injections of high molecular weight sodium hyaluronate for osteoarthritis of the knee: a double-blind, randomized, multi-center, non-inferiority study. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 18: 223, 2017.
- Heiene R, Moe L. Pharmacokinetic aspects of measurement of glomerular filtration rate in the dog: a review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12: 401-414, 1998.
- Jeon US. Principles and practice of diuretic therapy. *The Korean Journal of Medicine*, 80: 8-14, 2011.
- Jeong SH. Anti-oxidant activities of phytol on keratinocytes. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 15: 457-465, 2017.
- Kogan G, Šoltés L, Stern R, Gemeiner P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 29: 17-25, 2007.



- Kwon SB, Lee GT, Choi SJ, Lee NK, Park HW, Lee KS, Lee KK, Ahn KJ, An IS. The effect of glycerin, hyaluronic acid and silicone oil on the hydration, moisturization and transepidermal water loss in human skin. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 11: 761-768, 2013.
- Laurent UB, Dahl LB, Reed RK. Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymphnodes and liver. *Experimental Physiology*, 76: 695-703, 1991.
- Lowe NJ, Maxwell CA, Patnaik R. Adverse reactions to dermal fillers: review. *Dermatologic Surgery*, 31: 1616-1625, 2005.
- Makimoto G, Ichihara E, Hotta K, Ninomiya K, Oze I, Minami D, Ninomiya T, Kubo T, Ohashi K, Tabata M, *et al.* Randomized phase II study comparing mannitol with furosemide for the prevention of renal toxicity induced by cisplatin-based chemotherapy with short-term low-volume hydration in advanced non-small cell lung cancer: the OLCSG1406 study protocol. *Acta Medica Okayama*, 72: 319-323, 2018.
- Peters JP, Van Slyke DD. Quantitative clinical chemistry. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp596-606, 1944.
- Reed RK, Laurent UB, Fraser JR, Laurent TC. Removal rate of [3H]hyaluronan injected subcutaneously in rabbits. *The American Journal of Physiology*, 259: H532-H535, 1990.
- Smith HW, Finkelstein N, Aliminosa L, Crawford B, Graber M. The renal clearances of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dog and man. *The Journal of Clinical Investigation*, 24: 388-404, 1945.
- Šoltés L, Kogan G, Stankovska M, Mendichi R, Rychlý J, Schiller J, Gemeiner P. Degradation of high-molar-mass hyaluronan and characterization of fragments. *Biomacromolecules*, 8: 2697-2705, 2007.

## 국문초록

### 항산화제 만니톨의 히알루론산 가교체의 유변학적 성질 및 기능에 미치는 영향

김이슬, 최복열, 강주희, 이경호\*  
아크로스, 강원도 춘천시, 한국

**목적:** 본 연구는 라디칼 소거제로인 만니톨 혼합에 의한 가교 히알루론산 겔의 유변학적 물성의 개선효과를 평가하기 위함이다. **방법:** 가교겔의 제조공정에 따라서 만니톨을 혼합하여 가교겔을 제조하였으며, 그 유변학적 성질을 화학적 및 가열 산화적 스트레스를 가하여 탄성( $G'$ ), 점성( $G''$ ), 복소점도( $G^*$ ) 및 위상각( $P/A$ )을 측정하여 관찰하였다. **결과:** 만니톨 혼합 가교겔은 주파수의 증가 및 화학적 또는 가열 산화적 스트레스에 대한 저항력을 나타내었다. 또한 동물실험에서 만니톨은 첨가농도에서 노 배출의 증진을 나타내었다. 이러한 결과는 삼투압에 의한 노 배출로 인한 부종의 감소를 기대할 수 있을 것으로 평가된다. **결론:** 만니톨의 항산화 기능은 히알루론산 가교 겔의 유변학적 물성의 개선을 나타내었다.

**핵심어:** 히알루론산, 만니톨, 가교 겔, 유변학, 산화적 스트레스

본 연구는 중소벤처기업부의 2017년도 제4차 제품공정개선 기술개발사업에 의하여 이루어진 것임(과제번호 S2561438).

---

## 참고문헌

- 권승빈, 이강태, 최성진, 이나경, 박현우, 이광식, 이진국, 안규중, 안인숙. 글리세린, 히알루론산, 실리콘 오일이 피부의 보습 및 경피수분손실량에 미치는 효과. *아시아뷰티화장품학술지*, 11: 761-768, 2013.
- 전은실. 일차진료에서 흔히 접하는 수분 전해질 문제: 이노제 사용의 원칙과 실제. *대한내과학회지*, 80: 8-14, 2011.
- 정선희. 인간각질형성세포에서 Phytol의 항산화 효능. *아시아뷰티화장품학술지*, 15: 457-465, 2017.

## 中文摘要

### 甘露醇作为自由基清除剂混合改善交联透明质酸凝胶的流变性

金璆, 崔福烈, 姜周希, 李庚鎬<sup>\*</sup>  
(株)Across, 江原道春川市, 韩国

**目的:** 评估将甘露醇混合到交联透明质酸凝胶中对其流变学特性的影响。**方法:** 通过将甘露醇混合到我们自己的制造过程中来制备交联的透明质酸凝胶, 然后研究由于化学和热氧化应力引起的其流变性质的变化。评价的流变学因素是储能模量 ( $G'$ ), 损耗模量 ( $G''$ ), 复数粘度 ( $G^*$ ) 和相角 ( $P/A$ )。**结果:** 将甘露醇混合到交联的透明质酸凝胶中会使其弹性 ( $G'$ ) 和粘度 ( $G''$ ) 抵抗由化学和热应力引起的频率增加和氧化应激。添加甘露醇还可以改善动物模型中的尿液分泌。因此, 我们希望它能减少因渗透压引起的水肿。**结论:** 甘露醇的抗氧化作用有助于改善交联透明质酸凝胶的流变性质。

**关键词:** 透明质酸, 甘露醇, 交联凝胶, 流变学, 氧化应激

