

적혈구를 이용한 Daunorubicin의 배송시스템

함성호 · 송 경 · 고건일 · 김재백 · 손동환[†]

원광대학교 약학대학

(1994년 7월 18일 접수)

Delivery System of Daunorubicin by Red Blood Cells

Seong ho Ham, Kyung Song, Gun Il Ko, Jae Baek Kim and Dong Hwan Sohn[†]

College of Pharmacy, Wonkwang University, 344-2, Sinyong-Dong, Iri, Jeonbuk 570-749, Korea

(Received July 18, 1994)

Drug delivery system by the use of red blood cells was established to sustain the release of drugs in the circulatory system by the intravenous injection. The entrapment method by the preswelling technique was re-examined and evaluated for searching the new entrapping conditions without hemolysis. The addition of 4 volume of 0.6× hank's balanced salt solution (HBSS) into 1 volume of 50% red blood cells suspension did not induce the hemolysis and change the hematocrit level in this experimental condition (within 15 min). Most of daunorubicin could be entrapped into red blood cells within 15 min. While the intracellular adenosine triphosphate (ATP) level followed by the entrapment was reduced to 86% of normal ATP level, the membrane fluidity and the shape factor of red blood cells were not altered. The release rate of daunorubicin from red blood cells was affected by the hemolysis under this condition. To maintain the intracellular ATP in red blood cells, the new reaction buffer was made with the addition of ATP and sodium pyruvate during the entrapment procedure because the hemolysis during the release test would reflect the loss of intracellular ATP that might result in the decrease of the viability in vivo. The addition of ATP raised the intracellular ATP level, which protect the hemolysis during the release test.

Keywords—Daunorubicin, Red blood cell, Hemolysis, Membrane fluidity

약물배송시스템으로서 생체세포인 적혈구를 이용하여 생체적합성을 갖는 서방형 약물배송시스템이 연구되고 있다.¹⁾ 적혈구는 골수의 stem cell로부터 분화되며, 개체마다 약간의 차이는 있으나 생존기간이 보통 90~120일이다. 발생초기에는 유핵세포지만, 분화과정에서 무핵세포로 되어 다른 세포들에 비해 단순한 효소시스템을 갖고 있다.²⁾ 또한 2중막 구조를 하고 있어 물질투과에 대한 barrier 기능을 갖고 있고, 삼투압의 조절에 따라 저장액에서는 swelling되고 등장상태로 되면, 다시 정상상태로 회복될 수 있다.³⁾

적혈구에 약물을 봉입하는 방법으로는 preswel-

ling technique,⁹⁾ hypo-osmotic dialysis,¹⁰⁾ electric breakdown,¹¹⁾ ionopore¹²⁾를 이용한 방법등이 있다. 삼투압조절이나 ionophore를 이용하면 막공을 확장시킬 수 있으며 이런 성질을 이용하여 cytosine arabinoside,⁴⁾ 5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate,⁵⁾ adriamycin,⁶⁾ methotrexate,⁷⁾ L-asparaginase⁸⁾ 등의 약물을 적혈구에 봉입시킬 수 있다고 보고되었다. 그러나 이 과정에서 hemoglobin이나 세포내 효소 및 세포의 생존력에 관계하는 ATP나 glucose등이 손실되어 세포의 생존기간이 경감될 수 있다.¹³⁾ 약물봉입과정에서 적혈구의 생존력이 감소되거나 막의 안정성이 감소된다면, 적혈구에 봉

[†]본 논문에 관한 문의는 이저자에게로

입된 약물의 생체내 거동을 예측하기가 곤란하다. 따라서 적혈구의 생존력을 유지시키는 것이 이 배송시스템에서 중요한 요인이 될 것이다.

본 연구에서는 모델 약물로서, 혈중농도를 낮게 유지하고 약의 부작용을 경감시켜줄 필요가 있는¹⁴⁻¹⁶⁾ daunorubicin을 도입하여 적혈구를 이용한 서방형 배송시스템을 연구하였다.

실험 방법

실험재료 및 기기

본 실험에 사용한 시료로는 daunorubicin (Farmitalia, Carlo Erba, Lot No. N2001, Italy), Hank's balanced salt solution (Sigma Chem. Co., ST, USA), red blood cell lysing buffer solution (Sigma Chem. Co., ST, USA), NBD-pc (Molecular Probe Inc., Eugene, USA), 5-carboxyfluorescein diacetate (Molecular Probe Inc., Eugene, USA), adenosine-5-triphosphate disodium salt (Sigma Chem. Co., ST, USA), sodium pyruvate (Life Tech. Inc., USA)를 사용하였으며, 기타 다른 시약들은 모두 특급 혹은 세포배양용을 사용하였다. 실험기기로는 spectrophotometer (MPS-5000, Shimadzu Instr. Co., Japan), spectrofluorometer (SFM 25, Kontron Instr. Co., Swiss), high performance liquid chromatograph Set (Waters Instr. Co., USA)를 사용하였고 검출기로는 model 440 absorbance detector 및 model 420 AC fluorescent detector를 사용하였다. 또한 anchored cell analysis and sorting system (ACAS 570, Meridian Instr. Co., MS, USA), microcentrifuge (Centrifuge 5415 C., Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Germany), table top centrifuge (VS-6000 CF, Vision Scientific Co., Ltd, Korea)를 사용하였다.

실험동물 및 채혈

본 실험에 이용한 실험동물로는 Rabbit (체중 3.0 ~ 3.5 kg의 웅성 Newzealand white, Hanil Animal Co., Cheonboog, Korea)를 사용하였으며, 본 대학의 실험동물실에서 사육하였다. 채혈은 heparin 처리된 주사기로 rabbit의 귀정맥으로부터 약 10 cc를 채혈한 다음, 4°C에서 3000 rpm 으로 15분간 원심분리 한 뒤, 혈장과 buffy coat를 흡인제거하였다.

여기에 4°C의 Hank's balanced salt solution (이하 HBSS라고 약함)으로 3회 세척(원심분리, 4°C, 1000 rpm, 5 min.)한 뒤, 최종적으로 hematocrit 치(10000 rpm, 15 min., in capillary tube)가 50% (이하 50% 적혈구 suspension이라 표기함)가 되도록 조절하였다.

Daunorubicin의 봉입 조건

50% 적혈구 suspension 1 volume (4°C)에 4°C의 HBSS (HBSS 원액을 정제수로 희석하여 각각 0~100% 가 되게한 용액)를 4 volume 가한 다음, 4°C에서 800 rpm으로 5분간 원심분리하고, 가해진 HBSS와 동량의 상정액을 제거한 다음, 남아있는 적혈구층에 daunorubicin 용액 (4°C) 1 volume 가하여 4°C에서 방치하였다. 이 용액에 다시 10x HBSS를 가하여 등장화시킨 다음, 37°C에서 1 시간 동안 방치하고, 다시 4°C의 HBSS로 세척 (800 rpm, 4°C)하여 daunorubicin이 봉입된 적혈구를 조제하였다. 이 실험에서 hemolysis가 일어나지 않는 pre-swelling 조건과, 그 조건에서 daunorubicin을 봉입할 수 있는 조건에 대한 parameter로서 pre-swelling media의 처리시간, 처리농도 및 용량에 따른 용혈시험과 daunorubicin의 봉입시간 및 용량의존성에 따른 봉입실험을 하였다. 또한 적혈구내의 ATP level을 조절하기위하여 ATP 및 sodium pyruvate가 함유된 HBSS를 이용하였다.

Daunorubicin이 봉입된 적혈구의 분석

적혈구내 ATP는 A. D. Flora⁶⁾의 방법에 따라 HPLC로 정량하였으며, Yu- Li Wang 등의 방법¹⁷⁾에 따라 적혈구의 image analysis를 하였다. 이 방법을 간략히 요약하면 다음과 같다. 50% 적혈구 suspension을 HBSS로 희석하여 1×10^6 cell/ml로 만든 다음 이 suspension 1 volume을 poly-L-lysine (MW = 150 kd)으로 pre-coating된 35 mm 직경의 plastic culture dish에 넣고, 37°C의 CO₂ incubator (5% to air)에서 1 시간동안 방치한 다음 여기에 5-carboxyfluorescein diacetate (in acetone)를 20 µg/ml이 되게 가하고 다시 30분간 incubator에서 방치하였다. 이 culture dish를 다시 HBSS로 3회 세척한 다음 ACAS-570의 image analysis program을 이용하여 적혈구의 image analysis를 하였다. 또한 John L. Wang 및 D.E. Koppel 등^{18,19)}의 방법에 따라 ACAS-570으로 적혈구막의 lateral mobility를 측정하였다.

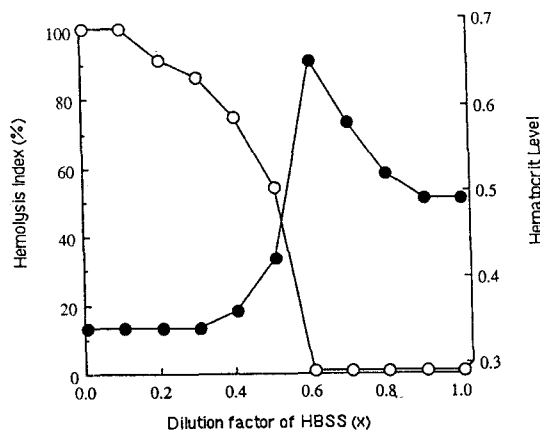


Figure 1—Hematocrit level (closed circle) and hemolysis index (open circle) at 2 min after adding each hank's balanced salt solution (HBSS) solution into red blood cells suspension at 4°C. 4 volume of each HBSS was added into 1 volume of 50% red blood cells suspension, which was cooled under 4°C.

이를 간략히 요약하면 적혈구 suspension (1×10^6 cell/ml) 1 volume을 plastic culture dish에 넣고, image analysis를 할 때와 같은 방법으로 NBD-pc를 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 가한 다음 세척한 뒤, Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 방법으로 적혈구막의 lateral mobility를 측정하였다.

Daunorubicin의 방출실험 및 용혈실험

Daunorubicin이 봉입된 적혈구 suspension 1 volume에 10 mM phosphate buffered saline (이하 PBS로 약함, pH 7.4), HBSS 및 각 개체 자신의 혈청을 각각 9.0 volume씩 가한 다음, 37°C에서 방치하면서 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48시간에 이 시료 200 μl 씩을 취하여 A. D. Flora 등의 방법⁶⁾에 따라 방출액중 daunorubicin을 HPLC로 정량하였으며, 방출 용액중의 hemoglobin 농도를 cyanmethemoglobin법에 따라 540 nm에서 흡광도 측정법으로 정량하였다.

결 과

봉입조건에 관한 실험결과—50% 적혈구 suspension 1 volume에 각 농도로 희석된 HBSS 4 volume을 가하고 2분간 incubation 후에 hemolysis와 hematocrit값을 측정하였다. Fig. 1에서 같이

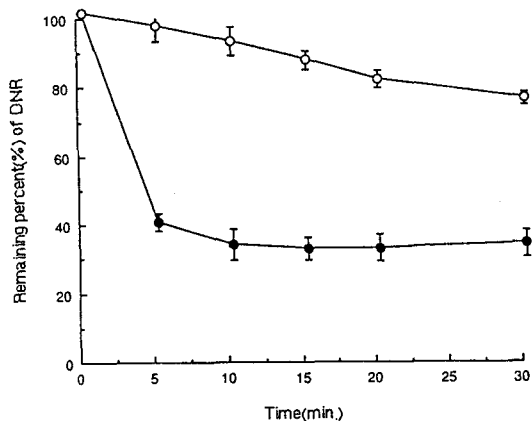


Figure 2—Effect of preswelling time on entrapment efficiency into red blood cells with daunorubicin. After swelling with 0.6× hank's balanced salt solution (0.6×HBSS, O) and control (1×HBSS, O) at 4°C, supernatant was removed after centrifugation (4°C, 800 rpm, 3 min). Daunorubicin (DNR) containing solution (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added and then red blood cells suspension was incubated. At desired time the final red blood cells suspension was centrifugated in the speed of 1000 g for 3 min. Daunorubicin in the supernatant was determined by spectrofluorometry.

0.6x HBSS 사용시 hematocrit가 0.66으로 등장상태보다 28% 증가해 최대값을 보였다. HBSS의 농도가 1x HBSS로부터 0.6x HBSS까지는 hematocrit가 지속적으로 상승했고 0.5x 부근에서 급격한 감소가 있었으며 그 이하에서는 적혈구의 용혈로 인해 변화가 없었다. 최대의 swelling을 보이는 0.6x HBSS를 사용하여 preincubation한후 50% 적혈구 suspension에 같은 volume의 daunorubicin 용액 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0.6x HBSS)을 넣고 incubation 시간에 따른 봉입효율을 조사하였다. 봉입되는 정도는 원심분리한 후 상정액에 남아있는 daunorubicin의 양을 정량하여 측정하였다. 봉입은 매우 신속히 일어났고 15분후는 평형에 도달했다 (Fig. 2). Preswelling 용매로 1x HBSS를 사용시 15분후 상정액에 남아있는 daunorubicin의 양은 사용량의 약 80% 정도되어 약 20%의 daunorubicin은 적혈구막표면에 흡착되는 것으로 추측된다. 따라서 적혈구내에 봉입되는 양은 상기의 조건에서 가한 전체 약물의 약 40% 정도가 될 것으로 추정된다. 이 조건으로 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 daunorubicin 용액을 사용하여 적혈구에 봉입시켰을때 적혈구중

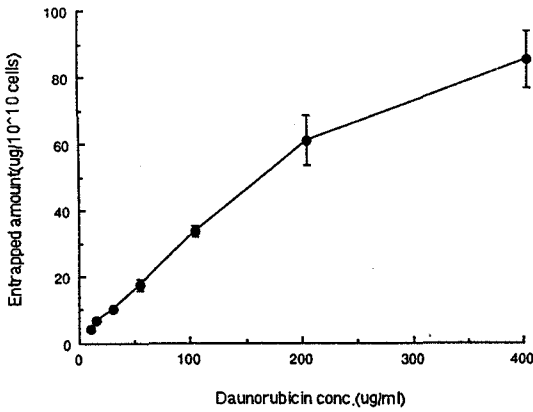


Figure 3—Intracellular daunorubicin (DNR) content as a function of the external daunorubicin loading concentration. After swelling red blood cells with 0.6× hank's balanced salt solution (HBSS) (4°C, 2 min) and removing the supernatant (4°C, 800 rpm, 3 min), DNR containing solution was added into preswollen red blood cells. Red blood cells were washed and the intracellular DNR amount was determined by spectrofluorometry.

Table I—Intracellular ATP Level (nmole/ml packed cells) in Each Experimental Condition

Conditions	ATP level (nmole/ml packed cells)
Normal	1528.56 ± 28.36 ^b
After resealing ^a	1313.76 ± 32.17
Ghost	332.96 ± 17.44

^aRBCs were preswollen by 0.6x HBSS and resealed with 10x HBSS at 37°C for 30 min.

^bMean ± SD calculated from 12 experiments.

daunorubicin의 봉입량은 Fig. 3과 같다. 즉 각 농도에 따라 평균 2.80 (봉입율 56%), 5.18 (봉입율 51.8%), 8.25 (봉입율 41.2%), 15.85 (봉입율 31.7%), 31.96 (봉입율 32%), 59.27 (봉입율 29.7%), 83.39 (봉입율 20.8%) $\mu\text{g}/10^{10}$ cells 였다. 그러나 Fig. 2에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 daunorubicin 용액을 사용하여 봉입하였을때 상징적 중 잔존율이 32%로 봉입율은 68%로 예상되나 적혈구 중에 봉입된 양이 32%에 불과한 것은 daunorubicin을 봉입후 다시 annealing 하기 위해 incubation (37°C, 1 hr)하는 조작 및 세척과정에서 손실이 일어난 것으로 사료된다.

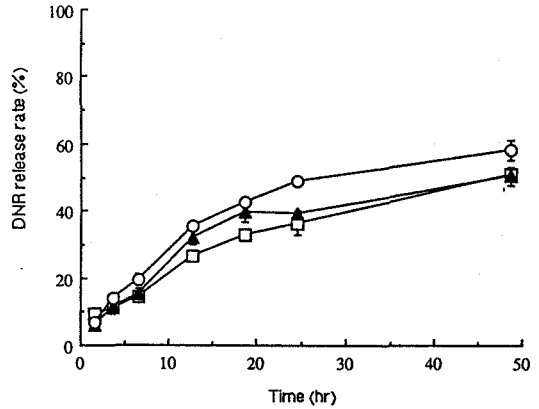


Figure 4—In vitro release profile of daunorubicin (DNR) from DNR entrapped red blood cells. One volume of red blood cells suspension was added into 9 volume of individual serum (□), HBSS (△), PBS (○). DNR content in red blood cells prepared by preswelling technique was $31.96 \pm 0.6 \mu\text{g}/10^{10}$ cells.

적혈구중 Adenosine Triphosphate (ATP) level의 측정 결과—상기 조건에서는 hemoglobin의 손실이 없어 거대분자의 손실은 없을 것으로 사료되나 저분자의 세포내용물의 손실이 예상되므로 적혈구의 생존력에 대한 직접적인 parameter인 세포내 ATP의 양을 측정하였다 (Table I). 채혈하여 세척한 직후에 측정된 적혈구중의 ATP는 1528.26 ± 18 nmole/ml packed cells 이었고, preswelling을 시켜 Daunorubicin을 봉입후에는 1314 ± 32 nmole/ml-packed cells로 약 15% 정도의 감소가 관측되었다.

적혈구의 형태분석 및 적혈구막의 lateral mobility의 측정결과—ACAS-570을 이용해 적혈구의 image analysis 및 막의 안정성을 측정하기 위하여 lateral mobility를 측정된 결과는 Table II와 같다. 정상 적혈구의 perimeter는 $10.17 \mu\text{m}$ 였으며, 이를 0.6x HBSS로 swelling 시켰을 때는 $11.82 \mu\text{m}$ 로 커졌고, 다시 resealing 시켰을 때에는 $10.20 \mu\text{m}$ 로 정상 적혈구와 그 크기가 같아졌으나 ghost의 경우에는 $12.20 \mu\text{m}$ 로 상당히 커져있었다. 형태계수(shape factor)에 있어 정상 적혈구는 1.30으로 원형을 유지하고 있었고, swelling 시켰을 때 1.32로 큰 변화를 가져오지 않았다. 또한 이를 resealing 시킨 경우 1.30으로 그 형태를 유지하고 있었으나, ghost의 경우에는 1.34로 약간 변형이 일어났음을 알 수 있었다.

Table II—Image analytical parameters and membrane fluidity of red blood cells in each condition determined by anchored cell analysis and sorting system (ACAS-570)

Red cells	Image analytical parameters		Membrane fluidity parameters	
	Perimeter (μm)	Shape factor	Mobility ($\times 10^{-8} \mu\text{m}^2/\text{sec}$)	Recovery (%)
Normal (n=580)	10.17 \pm 3.03 ^b	1.30 \pm 0.92	7.37 \pm 2.68	75.14 \pm 16.50
Swollen (n=497) ^a	11.82 \pm 4.17	1.32 \pm 0.14	6.82 \pm 4.26	78.86 \pm 11.48
Ghost (n=548)	12.20 \pm 4.37	1.34 \pm 0.14	4.57 \pm 3.41	51.71 \pm 27.09
Resealed (n=564)	10.20 \pm 3.87	1.30 \pm 0.34	7.27 \pm 2.59	70.71 \pm 20.55

^aSwollen red blood cells were prepared by 0.6x HBSS using the same procedure as the preswelling condition.

^bMean \pm SD calculated from each cell numbers (n).

Table III—Hemolysis index (%) during the release experiment of daunorubicin in serum, PBS or HBSS at 37°C

Entrapment method	Release media	Time (hr)					
		0	6	12	18	24	48
Preswelling technique	Serum	0.0*	0.30	1.30	1.76	1.86	2.21
	HBSS	0.0	0.34	1.25	1.57	1.79	2.10
	(0.6 \times HBSS) PBS	0.0	0.61	0.96	2.27	3.03	5.57

* Relative standard deviation (RSD) in all data was within maximal 5%, which was calculated from 12 experiments.

perimeter가 완만히 증가되었고 형태계수에는 큰 변화를 주지 않고 있다는 사실로 볼때, 이와같은 조건으로 약물을 봉입시킬 경우에는 비록 ATP 양의 감소는 있을지라도 적혈구의 형태에는 변화를 가져 오지 않았음을 알 수 있었다. 또한 정상 적혈구의 lateral mobility는 평균 $7.37 \times 10^{-8} \mu\text{m}^2/\text{sec}$ 였으며, 0.6x HBSS로 swelling 시켰을 경우에는 평균 $6.82 \times 10^{-8} \mu\text{m}^2/\text{sec}$ 로 약간 감소하였다. 또한 이를 다시 resealing 시켰을 때에는 평균 $7.27 \times 10^{-8} \mu\text{m}^2/\text{sec}$ 로 정상 적혈구와 같아졌으나, ghost의 경우에는 평균 $4.57 \times 10^{-8} \mu\text{m}^2/\text{sec}$ 로 막의 유동성이 현저히 감소된 것을 볼 수 있었다.

방출실험 결과—Daunorubicin이 봉입된 적혈구를 이용하여 daunorubicin의 방출실험을 한 결과 (Fig. 4), 개체 자신의 혈청에서 1시간후 평균 7.52%, 12시간에 24.90%, 24시간에 34.70%, 48시간에 49.36%였으며, PBS중 방출실험을 했을 때에는 1시간에 5.14%, 12시간에는 33.87%, 24시간에는 47.13%였고 48시간 후에는 56.42%가 방출되었다. 즉 두 경우 모두 방출은 지연되었으며 혈청보다는

Table IV—Hemolysis index (%) during the release test of daunorubicin in HBSS and individual serum at 37°C

		medium	12 hr	24 hr	48 hr
ATP (0 μM)	HBSS		1.29*	1.88	2.31
	Serum		1.25	1.84	2.34
ATP addition (1.0 μM)	HBSS		0.00	0.03	0.05
	Serum		0.00	0.03	0.04

* All data were presented as mean and the relative standard deviation (RSD) was within maximum 9.8% (n=12)

PBS중에서 방출이 약간 빠른 속도로 일어났다. 48시간 후 용혈된 양을 비교해보면 혈청중에서는 2.21%, PBS중에서는 5.57%가 용혈되어 자연적인 방출과 더불어 용혈에 의한 방출이 관여되고 있음을 알 수 있었다 (Table III). 이런 용혈은 약물 봉입시 적혈구내의 ATP level이 감소되어 적혈구의 생존력이 감소되었기 때문으로 추정된다. 두 매질에서 용혈의 차이가 나타나는 것도 에너지원인 glucose가 PBS에는 포함되어 있지 않고 혈청중에는 천연적으로 함유되어 있음을 고려할때 적혈구내의 ATP의 양과 관계가 있을 것으로 예상된다. 따라서 적혈구내 ATP를 유지시켜 주기 위한 실험을 하였다 (Table IV). 즉 실험 조건에서 사용된 0.6x HBSS 및 daunorubicin 용액에 ATP가 동일 농도가 되도록 가하여 daunorubicin의 봉입 실험을 하였고 이때 적혈구내의 ATP함량을 조사하였다. 따로 sodium pyruvate를 가하여 동일하게 실험하였다. 1 μM 의 농도가 되게 ATP를 가했을 경우 적혈구내의 ATP 농도가 정상적인 농도로 유지되었으며, 동시에 daunorubicin의 봉입율에는 영향을 미치지 않았다 (미

개제). 이 조건으로 daunorubicin을 봉입시킨 적혈구로부터 daunorubicin의 방출실험을 한 결과 48시간 후에 hemolysis index는 0.04~0.05%로 현저히 감소되었다.

고 찰

약물의 부작용을 줄이면서, 맥관에 직접 투여할 수 있고, 생체 적합성을 갖는 새로운 약물배송계로서 적혈구를 이용한 약물배송시스템이 연구되어 왔다. 적혈구에 약물을 봉입시키는 방법으로는 삼투압조절이나 ionophore를 이용한 방법등이 보고되었다.⁹⁻¹²⁾ 약물 봉입시 세포 내용물의 누출은 매우 중요한 문제로서 특히 L-asparaginase와 같은 거대분자를 봉입시키고자 할 경우에는 적혈구를 ghost 상태로 만들어야 했기 때문에 세포내용물의 손실이 대단히 크고 상대적으로 체내에서의 생존기간이 보장될 수 없었다.⁸⁾ 따라서 세포 내용물의 보존과 적혈구의 생존기간과의 상호관계는 중요한 요인으로 작용하고 있다.

본 연구에서는 적혈구의 생존력을 유지하면서 약물을 봉입시킬 수 있는 방법을 연구하였다. 즉 0.6x로 희석된 HBSS로 적혈구를 swelling 시킴으로써 daunorubicin이 쉽게 봉입되었으나 세포내 ATP를 분석한 결과 정상적인 적혈구에 비해 약 15%가 감소하였는데 이 결과는 A. D. Flora 등의 보고에 따르면,⁶⁾ hypo-osmotic dialysis법에 따라 사람의 적혈구에 adriamycin을 봉입시켰을 경우 세포내 ATP level이 약 13%가 감소한 결과와 유사했다. 그러나 적혈구의 형태나 막의 유동성에서는 변화가 관찰되지 않았다. 막의 유동성은 적혈구의 형태를 유지하는데 대단히 중요한 요소로서, 이는 세포의 염증화(inflammation)나 apoptosis에 의해서 감소된다고 알려져 있다.¹⁹⁻²²⁾ 따라서 적혈구의 형태가 그대로 유지되고 적혈구막의 유동성이 변화되지 않았다는 것은 본 연구의 약물봉입조건으로는 적혈구를 직접 파괴하거나 적혈구막의 손상을 거의 일으키지 않았음을 알 수 있었다. ATP는 세포의 항상성(homeostasis)을 유지시키는 필수적인 요소로서 약간의 ATP변화가 세포내외로의 이온 수송등에 큰 변화를 주는 것으로 보고 되었다.²³⁻²⁵⁾ 따라서 저자는 ATP가 적혈구의 생존력을 유지시킬 수 있는 직접적인 요

인이 될 수 있기 때문에 ATP의 존재하에 약물을 봉입하여 방출실험을 하였을 때 적혈구의 용혈현상을 현저히 막을 수 있었다. ATP는 등장상태의 세포에서는 세포내로의 수송이 불가능하지만 저장액 상태에서는 세포의 swelling을 통해 효과적으로 봉입되었다. ATP를 보충하여 줌으로써 적혈구내의 ATP농도가 정상 상태와 같이 유지되었고 *in vitro* 약물방출실험에서도 용혈이 일어나는 것을 효과적으로 막을 수 있었다. 이와같은 시도는 적혈구 약물전달에서 처음 사용된 방법이며 결과이다.

결 론

생체 적합성을 가지며 서방형제제인, 적혈구에 의한 약물배송시스템에서 적혈구의 생존력을 유지하면서 약물을 봉입시킬 수 있는 방법에 대해 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 50% 적혈구 suspension 1 volume에 0.6x HBSS 4 volume을 가하여 swelling시킨 뒤 daunorubicin을 봉입하였을 때 용혈이 거의 일어나지 않으며 적혈구의 형태와 막의 유동성은 채혈직후의 정상적인 적혈구와 유사하였다. 또한 세포내의 ATP양은 약간 감소하였는데 1 μ M의 ATP를 함유한 용액을 이용하여 Daunorubicin을 봉입시킨 경우 정상적인 농도로 유지되었으며, 방출실험에서도 적혈구의 생존력을 유지시켜 용혈이 일어나는 것을 현저히 방지할 수 있었다.

문 헌

- 1) K.J. Widder and R. Green, *Drug and Enzyme Targetting*, Vol. 112, Academic Press Inc., (1985).
- 2) R.D. Irons, *Toxicology of the Blood and Bone Marrow*, Raven Press, (1985).
- 3) J.V. Staros, B.E. Heley and F.M. Richards, Human erythrocytes and resealed ghosts, *J. Biol. Chem.*, **249**, 5004-5007 (1974).
- 4) J.R. DeLoach, Comparative encapsulation of cytosine arabinoside monophosphate in human and canine erythrocytes with *in vitro* drug efflux, *J. Appl. Biochem.*, **4**, 533-541 (1982).
- 5) A.D. Flora, E. Zocchi, L. Guida, C. Polvani and U. Benatti, Conversion of encapsulated 5-

- fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate to the antineoplastic drug 5-fluoro-2'-deoxyuridine in human erythrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 3145-3149 (1988).
- 6) A.D. Flora, U. Benatti, L. Guida and E. Zocchi, Encapsulation of adriamycin in human erythrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 7029-7033 (1986).
 - 7) H.O. Alpar and D.A. Lewis, The prolongation of the survival time of mice implanted with TLX5 cells by treatment with methotrexate encapsulated in erythrocytes, *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 3081-3083 (1987).
 - 8) E. Ang, R. Grew and G. Ihler, Enzyme loading of nucleated chicken erythrocytes, *Exp. Cell Res.*, **104**, 430-434 (1977).
 - 9) D.A. Tyrrell and B.E. Ryman, The entrapment of therapeutic agents in resealed erythrocytes 'Ghosts' and their fate *in vivo*, *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 677-680 (1976).
 - 10) J.R. DeLoach, R.L. Harris and G.M. Ihler, An erythrocyte encapsulator dialyzer used in preparing large quantities of erythrocyte ghosts and encapsulation of a pesticide in erythrocyte ghosts, *Anal. Biochem.*, **102**, 220-227 (1980).
 - 11) D.H. Mitchell, G.T. James and C.A. Cruse, Bioactivity of electric field-pulsed human recombinant IL-2 and its encapsulation into erythrocyte carriers, *Biotech. Appl. Biochem.*, **12**, 264-275 (1990).
 - 12) T. Kitao and K. Hattori, Erythrocyte entrapment of daunomycin by amphotericin B without hemolysis, *Cancer Res.*, **40**, 1351-1353 (1980).
 - 13) C.Y. Jung, S. Uchida and H. Endou, Nephrotoxicity assessment by measuring cellular ATP content, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **100**, 369-382 (1989).
 - 14) G.K. McEvoy, *Drug Information*, American Society of Hospital Pharmacists, Inc., (1988).
 - 15) D.D.V. Hoff, M. Rozenzweig, M. Layard, M. Slavik and F. M. Muggia, daunomycin induced cardiotoxicity in children and adults, *Am. J. Med.*, **62**, 200-207 (1977).
 - 16) E.A. Lefrak, J. Pitha, S. Rosenheim and J. A. Gottlieb, A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity, *Cancer*, **32**, 302-314 (1973).
 - 17) Yu-Li Wang and D. Lansing Taylor, *Fluorescence microscopy of living cells in culture: Fluorescent analogs, labeling cells and basic microscopy*, Academic Press, Inc., (1989).
 - 18) J.L. Wang, Quantitative fluorescence analysis: Digital image and statistical analysis at the level of single cells; *Application Note No. B-1* (supplied from Meridian Instr., Inc.) (1992).
 - 19) D.E. Koppel and M.P. Sheetz, Lateral diffusion in biological membranes, *Biophys. J.*, **30**, 187 (1980).
 - 20) H. Tedeschi, *Cell physiology: Molecular dynamics*, 2nd ed., Wm. C. Brown Publishers, (1993).
 - 21) L.D. Tomei and F.O. Cope, *Apoptosis: The molecular basis of cell death*, Cold spring harbor lab. press, (1991).
 - 22) D. Huhn, G.D. Pauli and D. Grassmann, Die erythrocytenmembran: Feinstruktur der gefriergeätzten membran nach einwirkung von hypotonen lösungen und saponin, *Klin. Wochenschr.*, **48**, 939-943 (1970).
 - 23) H.D. Kim, S. Sergeant, L.R. Forete, D.H. Sohn, and J.H. Im, Activation of a Cl-dependent K flux by cAMP in pig red cells, *Am. J. Physiol.*, **256**, C772-C778 (1989).
 - 24) S. Sergeant, D.H. Sohn, and H.D. Kim, Volume-Activated Na/H Exchange Activity in Fetal and Adult Pig Red Cells: Inhibition by Cyclic AMP, *J. Membrane Biol.*, **109**, 209-220 (1989).
 - 25) D.H. Sohn and H.D. Kim, Effect of Adenosine Receptor Agonists on Volume-Activated Ion Transport in Pig Red Cells, *J. Cell. Physiol.*, **146**, 318-324 (1991).

