

혈액대용물질의 제조 및 특성 평가

김기범 · 박재관* · 김성종** · 김종수** · 유일수*** · 김민호**** · 홍철운***** · 김진상 · 강형섭†

전북대학교 수의과대학 약리학교실
561-756 전북 전주시 덕진구 덕진동1가 664-14
*CIC

565-854 전북 완주군 이서면 이문리 711
**전북대학교 공과대학 화학공학부
561-756 전북 전주시 덕진구 덕진동1가 664-14

***전북대학교 공과대학 고분자나노공학과
561-756 전북 전주시 덕진구 덕진동1가 664-14
****전북대학교 의학전문대학원 흉부외과학교실

561-756 전북 전주시 덕진구 덕진동1가 664-14
*****전북대학교 공과대학 바이오메디칼공학부
561-756 전북 전주시 덕진구 덕진동1가 664-14
(2008년 1월 24일 접수, 2008년 3월 10일 채택)

Estimate of Characteristics and Manufacture of Blood Substitutes

Gi-Beum Kim, Jai-Koan Park*, Seong-Jong Kim**, Jong-Soo Kim**, Il-Soo You***, Min-Ho Kim****, Chul-Un Hong*****, Jin-Shang Kim and Hyung-Sub Kang†

*Department of Pharmacology, Collage of Veterinary Medicine, Chonbuk National University,
664-14, Duckjin-dong 1ga, Duckjin-gu, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea
CIC, 711 Imun-ri Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-Do, 565-854, Korea

***Division of Chemical Engineering, College of Engineering, Chonbuk National University,
64-14, Duckjin-dong 1ga, Duckjin-gu, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea*

****Department of Polymer Nano Science & Technology, College of Engineering, Chonbuk National University,
64-14, Duckjin-dong 1ga, Duckjin-gu, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea*

*****Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Chonbuk National University Medical Schools
664-14, Duckjin-dong 1ga, Duckjin-gu, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea*

******Division of Biomedical Engineering, College of Engineering, Chonbuk National University
664-14, Duckjin-dong 1ga, Duckjin-gu, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea*

(Received 24 January 2008; accepted 10 March 2008)

요 약

본 연구는 헤모글로빈을 계란의 인지질로 microencapsulation한 hemosome과 PFC 유화액을 제조하여 산소전달 특성을 향상시키고자 하였다. 실험결과 flusol-DA를 sonication하여 평균입자크기가 437 nm의 안정성 있는 유화액을 제조할 수 있었으며, glycerol의 농도를 증가시킴으로써 유화시간을 줄이고 안정도를 높일 수 있었다. 소 혈액으로부터 추출한 헤모글로빈을 달걀노른자로부터 추출한 인지질로 microencapsulation하여 직경 0.8 μm의 hemosome을 얻을 수 있었다. Hemosome의 산소포화도 곡선은 정상혈액의 적혈구와 같이 S자형을 보였으며 P₅₀은 24 mmHg이었다. Hemosome과 혈액을 1:4(V/V%)의 혼합한 혼합용액에서의 산소 포화도는 정상혈액과 유사한 결과를 보였으며, PFC 유화액과 혈액을 1:4(V/V%)로 혼합한 혼합용액에도 정상혈액과 유사한 결과를 보였다.

Abstract – The purpose of this study was to enhance gas exchange by producing hemosome, a hemoglobin microencapsulated with phospholipid of egg, and perfluorocarbon(PFC) emulsion solution. In the experiment, stable emulsion solution with 437 nm of mean particle size could be produced by Flusol-DA sonication, and shortening of emulsion time could be attained with higher stability as well. 0.8 μm sized hemosome could be produced by microencapsulation of hemoglobin with phospholipid extracted from egg yolk. The pattern of oxygen saturation curve of hemosome was S shape, which is similar to that found in normal blood, and P₅₀ was measured to be 24 mmHg. The oxygen saturation in the mixed solution of hemosome and blood in 1:4(V/V%) ratio was similar to that of normal blood, and the same result

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: kang-hs@chonbuk.ac.kr

was found in the mixed solution of PFC emulsion and blood in 1:4(V/V%) ratio.

Key words: Blood Substitutes, Perfluorocarbene Emulsion, Microencapsulate Hemoglobin, Hemosome, Oxygen Dissociation

1. 서 론

혈관 내 폐 보조장치는 중공사형 막을 상대 정맥과 하대 정맥 내에 삽입한 후 자연적인 혈액흐름을 이용하므로 외부 펌프가 필요한 체외 순환 기체교환장치(Extra-Corporeal Membrane Oxygenator, ECMO)에 비하여 용혈현상과 감염을 감소시킬 수 있는 장점이 있다. 혈관 내 폐 보조장치는 장치의 삽입과 취급이 단순하여 급성호흡부전환자처럼 정상적 폐 기능을 하지 못하는 문체의 폐에 부분적인 호흡보조장치로 유용한 연구 연구대상이다[1-7]. 그러나 혈관 내 폐 보조장치는 혈액의 흐름을 제한하지 않고 정맥에서 적절한 교환면적을 제공해야 하는데 이를 위해서는 긴 길이(50~60 cm)와 작은 내경(200~250 μm)의 중공사가 사용되어야 하며, 삽입개수(1,000 개 이하)의 한계를 갖는다. 그러므로 맥관 구조 내에 존재하도록 설계된 이 장치는 설치 공간 부족으로 기체전달의 한계성을 갖는다. 결국 혈관 내 폐 보조 장치의 실용화를 위해서는 기체전달 성능 향상이 가장 중요한 관건이라 할 수 있다[4-7]. 만일 혈관 내 폐 보조 장치가 혈액이 흐르는데 높은 저항을 가진다면 대정맥의 확장이나 혈관의 분지에 의해 장치 주위의 혈액 분포가 생길 수 있어 장치의 기체 전달 성능에 영향을 준다. 그리고 기체 교환을 증가시키기 위해 단순히 막 표면적을 증가시키는 것은 정맥의 혈액학과 심장에 영향을 주기 때문에 압력 손실의 감소는 체내 삽입형 폐 보조 장치 개발에 중요한 변수이다[4-7]. 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 앞에서 서술한 것과 같은 기계적 요법과 화학적 용법을 동시에 병행하여 기체 교환을 할 필요가 있다고 판단된다. 화학적 용법의 대표적인 것은 대용혈액이라 할 수 있는데, 아직까지는 대용혈액은 사람이 불의의 사고에 의하여 실혈이 발생하였을 때 실혈에 의한 혈액 부족량을 보충하기 위하여 연구 개발되었을 뿐 급성호흡부전에는 사용된 바는 없었다. 그러므로 본 연구팀에는 급성호흡부전에 발생하였을 때 장치에 의한 기계적 요법과 더불어 대용혈액과 같은 화학적 용법을 동시에 시도하고자 하였다. 그러나 대용 혈액 물질은 세포에 산소를 공급하고 이산화탄소를 받아오는 적혈구를 대체할 수 있는 물질 또는 혈액의 삼투압과 팽압을 안정하게 해주는 능력을 갖추어야 한다. 각국에서는 수세기에 걸쳐 많은 투자와 연구자의 노력으로 혈액을 대체 할 수 있는 혈액 대용물질(blood substitutes)을 개발하여 이를 혈액의 일부로 사용하기 위한 연구들이 진행되고 있다[8-11]. 혈액 대용물질은 부족한 혈액의 양을 보충하고 혈장삼투압을 유지시키며, 안전하게 산소를 인체 조직으로 보내고 이산화탄소를 배출시키는 기능을 대신한다. 일반적으로 모든 수혈은 반드시 ABO, Rh 혈액형을 맞춰야 하고 수혈 전에 교차시험(cross-matching)을 해야 하며 수혈전과성 바이러스 감염(infection) 등 문제점을 가지고 있어 최근 산소운반능력을 가진 적혈구를 대체할 수 있는 대용물질의 개발이 필연적으로 대두되었다. 현재 perfluorocarbon emulsion(PFC 유화액), polymerized hemoglobin, liposome encapsulated hemoglobin 등의 혈액 대용물질에 대해 연구가 활발히 진행되어지고 있다.

본 연구에서는 급성호흡부전이 발생하였을 때 기계적 요법과 더불어 화학적 용법을 동시에 수행하기 위하여 대용혈액을 제조하여

이 물질의 사용가능성에 대한 연구를 수행하였다. 혈액 대용물질로 정맥혈에 비하여 점도가 낮고 산소 흡수능력이 우수하며 항염증성을 지니는 PFC 유화액을 제조하고, 높은 산소 전달능력이 있으며 혈액과 유사한 산소 포화도를 갖는 헤모글로빈을 계란의 인지질로 microencapsulation한 hemosome을 제조하여 그 특성을 평가하였다.

2. 실험방법

2-1. 실험재료

본 연구에서 사용한 perfluorodecalin과 perfluorotripropylamine의 시약은 Aldrich사(USA)의 1급 시약을 사용하였다. 그리고 pluronic F-68, glucose, 계란 인지질(yolk phospholipids), hydroxyethyl starch (Sigma Chem. Co. Ltd; USA), glycerol, NaCl, sodium bicarbonate (Showa Chem Co. Ltd; Japan), potassium chloride(Osaka, Japan), magnesium chloride(Junsei, Japan), calcium chloride(Wako, Jap)는 1급 시약들을 사용하였다. 인공적혈구(hemosome)를 제조할 때 사용되는 인지질(phospholipid)은 달걀의 노른자로부터 추출하여 사용하였다. 순수 phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, cholesterol, α -tocopherol, silicic acid, silica gel, sephacryl-400(Sigma Chem. Co. Ltd; USA), 사용된 유기용매 중 클로로포름, 아세톤, 톨루엔, 40%황산암모늄(Showa Chem. Co. Ltd; Japan), 메탄올(Hayman Chem. Co. Ltd; England), petroleum ether(Matsuneon Chem. Ltd.; Japan)을 사용하였다. 그리고 헤모글로빈은 신선한 소의 혈액을 사용하였다.

2-2. Perfluorocarbene(PFC) 유화액의 제조

본 실험에서는 perfluorocarbene(PFC) 유화액을 제조하기 위하여 perfluorodecalin은 ICI chemical의 pletec-pp5를 사용하였고 perfluorotripropylamine은 Dainippon Ink and Chemical의 1급 시약을 그대로 사용하여 7:3의 비율로 혼합한 혼합액을 사용하였다. 또한 polyoxyethylenepolyoxypropylene 유화제로 미국 Wyandotte Chemical사의 pluronic F-68을 사용하였다. 글리세롤은 유화 보조제로 사용되며, Showa Chemical사의 1급 시약을 15 mmHg로 감압 증류하여 사용하였다. PFC 화합물을 유화시키기 위하여 우선 고속 멸균기(IKA Works, Malaysia)를 사용하여 9500 rpm으로 30분간 강하게 교반하여 굵은 입자의 유화액을 만들었다. 제조된 유화액은 30분 이상 방치하여 층 분리가 일어나지 않을 때까지 수회 반복하여 안정된 유화조건을 형성하였다. 이후 ultrasonicator의 출력수를 변화시키면서 입자를 미립화 하였으며 입도분석기(Shimadzu SALD-2001)를 사용하여 유화된 PFC의 평균 입자의 크기와 입도분포를 분석하였다.

유화액이 혈액 속에 주입되었을 때 혈장의 이온농도, physiological osmolarity, oncotic pressure, buffer capacity 등에 변화를 주지 않아야 하며 전 균형을 갖춘 annex solution을 hydroxyethylstarch, hypertonic Krebs-Ringer bicarbonate solution의 조성으로 제조하여 혼합한다. 여기서 annex solution을 제조할 때 모든 무기염류를 한꺼번에 혼합하면 magnesium(MgCO_3)나 calcium carbonate(CaCO_3)의 전이가 생

기게 되므로 magnesium와 calcium carbonate가 생기지 않게 sodium bicarbonate와 magnesium carbonate, calcium carbonate를 따로 용해하여 혼합하여야 한다. 각 조성의 emulsion 원액 80 ml에 제조된 annex solution 20 ml를 혼합하여 Shaker로 교반(agitation)하였다. 이렇게 하여 최종 얻어진 혈액대용물질은 충분히 교반한 후에 냉동 보관하였다.

2-3. Hemoglobin-Microencapsulation 용액의 제조

2-3-1. 헤모글로빈의 정제

헤모글로빈은 소에서 채취한 신선한 혈액으로부터 분리정제하여 사용하였다. 먼저 소의 혈액 50 ml를 취하여 원심분리관에 넣고 4,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리하면 3개의 분리층이 생기는데 55%에 해당하는 상등액(혈장)과 미량의 가운데 층(백혈구, 혈소판 등)은 제거하였다. 이렇게 취한 적혈구에 생리식염수를 넣어 약 50 ml로 한 다음 유리막대로 저어서 혼합하고 위와 같은 조건으로 다시 원심분리한 후 상등액은 제거하였다. 이후 적혈구와 같은 양의 증류수/톨루엔(1:0.4, V/V) 용액을 가하여 적혈구를 용혈시킨 후 냉장실(4 °C)에 하루 밤 동안 정치하였다. 이후 수술용 형질로 여과하고 이 여과액을 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 헤모글로빈 용액은 상등액에 포함되므로 상등액을 취하고 여기에 40% 황산암모늄을 가하여 헤모글로빈이 결정화되도록 하였다. 결정화된 헤모글로빈을 다시 냉장실에 하루 밤 방치한 후 4,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 헤모글로빈 결정의 침전물을 얻었다. 이렇게 얻은 헤모글로빈 결정은 생리적 식염수를 사용하여 24시간씩 연속 투석시킨 후 냉동 보관하여 사용하였다.

2-3-2. 인지질(phospholipid)의 추출

계란의 노른자로부터 인지질을 추출하기 위해서 우선 달걀의 노른자 100 g을 취하여 삼각플라스크에 넣고 chloroform methanol (1:2, V/V)용액 300 ml를 가하여 잘 흔들어 섞어 수 분간 방치한 후 다시 chloroform과 증류수를 100 ml를 가하여 혼합하였다. 이후 Whatman No. 1 여과지로 여과한 후 용매의 층 분리가 이루어질 때까지 어두운 곳에 방치한 후 메탄올층을 제거하고 chloroform 층을 얻었다. 여기에는 인지질과 중성지질이 혼합되어 있으므로 순수 인

지질을 분리하기 위하여 methane 용매층을 충분히 건조시킨 후 100 ml의 petroleum ether를 가하여 다시 용해시켰다. 이 용액에 아세톤 약 200 ml를 가한 후 얼음 속에 2시간 방치하여 인지질을 침전시킨 후 침전된 인지질을 취하여 아세톤으로 수회 세척하여 질소가스를 사용하여 건조시켜 순수 인지질을 추출하였다.

2-3-3. Hemosome의 제조

헤모글로빈 0.5 g을 증류수 100 ml에 녹이고 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide(EDC)를 Hb:EDC(1:10, mol/mol)의 비율로 첨가하여 교반하여 용해시켰다. 헤모글로빈이 완전히 용해 되면 용액에 적정량의 아세톤을 첨가하여 가교된 헤모글로빈을 석출하였다. 잔류된 우레아기와 EDC는 증류수로 수회 세척하여 제거하였다. 세척된 헤모글로빈은 냉동 건조하여 순수한 가교 헤모글로빈을 얻었다.

Hemosome의 제조는 Szebeni[12, 13]의 방법을 이용하였다. 달걀에서 추출한 인지질에 α -tocopherol을 90:10 W/W%의 조성으로 첨가하여 혼합지질을 제조하였다. 클로로포름으로 혼합지질을 용해시킨 후 둥근 플라스크에 넣고 회전 증발기로 용매를 증발시키면서 플라스크 내벽에 얇은 인지질의 막을 형성시켰다. 여기에 질소가스를 불어넣어 잔류 용매를 완전히 휘발시킨 후 지질/헤모글로빈(10:1, w/w)이 되도록 헤모글로빈 용액을 가하였다. 유리구슬이 들어 있는 회전 증발기를 이용하여 약 20 °C에서 10분간 회전시키면서 hemosome vesicle이 형성된다. 이렇게 형성된 hemosome vesicle을 인지질 박막이 형성된 다른 둥근 플라스크에 옮겨서 같은 방법으로 남아있는 자유 헤모글로빈을 encapsulating 시켰다. 이렇게 제조된 hemosome은 생리적 식염수로 수회 세척하여 직경 1 μ m의 여과지로 여과한 후 실험에 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 1은 fluosol-DA 20%를 물에 유화시키기 위하여 sonicator의 출력을 증가시키면서 입도를 측정 한 결과이다. 40 watt 이하에서는 입도가 불규칙하게 측정되었으며, 50 watt 이상에서 고른 입도 분포를 나타내었다. 일반적으로 동물실험 등에 사용되는 대용 혈액은

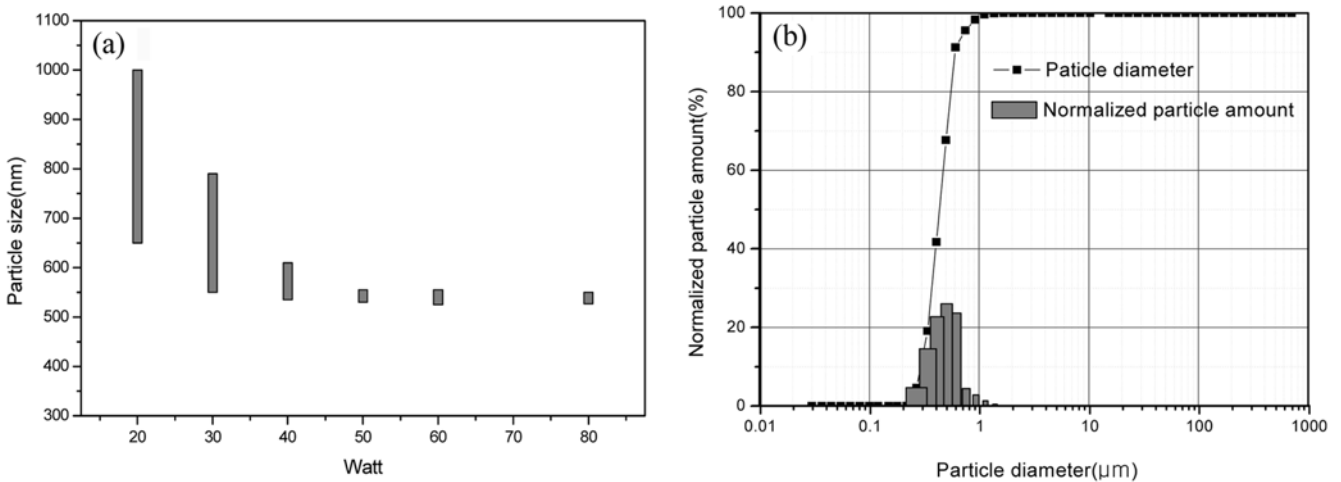


Fig. 1. Ultrasonification for particle size at variable watt. (a) Ultrasonification for particle size of Fluosol-DA 20% at variable watt, (b) Normalized particle amount(%) and particle size(μm) of PFC emulsion at 50 watt.

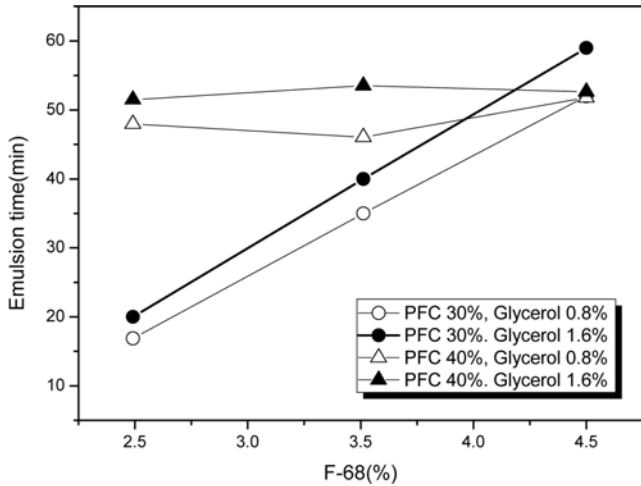


Fig. 2. Emulsification time of PFC solutions at various concentration of F-68.

PFC 자체의 독성에 의하여 200 nm에서 600 nm 사이의 입도 분포를 유지해야한다[14]. 본 실험의 결과는 250~550 nm의 입도분포를 나타내었으며 평균입자크기는 475 nm를 나타내었다. 이와 같은 분포는 일반적으로 대용 혈액으로 사용이 인정된 입도 범위이고 고른 입도와 점도를 유지하며, 안정된 유화특성을 보였으므로 혈관 내 폐보조장치에 대용 혈액으로 적용이 가능하였다.

Fig. 2는 산소 전달 능력을 향상시키기 위하여 PFC 화합물의 분율을 30%와 40%로 높였을 때 각각의 유화시간을 나타낸다. Fluosol-DA 20% 유화액의 경우 약 20분 정도에서 상분리가 없어져 안정된 유화특성을 나타냈으며 유화제의 첨가량에 따른 유화시간을 알아보기 위하여 유화제 F-68의 양을 변경하며 유화시간을 측정한 결과이다. 유화제의 양을 증가함에 따라 유화시간이 길어졌지만 유화상태는 안정되었고 PFC 30% 일 경우 2.8%, PFC 40% 일 경우 3.1%의 조성에서 빠르고 안정된 유화특성을 보였다. 제조된 유화액을 대용 혈액으로 사용하기 위하여 sodium bicarbonate magnesium chloride와 calcium chloride를 용해하여 K⁺, Ca⁺⁺ 이온농도를, 0.1 N 염산용액과 sodium lactate 용액을 사용하여 pH를 조절하였다(Fig. 3). 전해질 농도 및 기체 용해도는 혈액/가스분석기를 이용하여 측정한 결과로서 전해질이 포함된 유화액은 전해질이 포함되지 않은 유화액에 비하여 유화시간은 약간 길어졌으나 안정성 및 용해도에는 큰 차이를 보이지 않았다. 이를 통하여 인체 내 혈액의 성분과 유사한 조성을 위하여 추가한 전해액 등은 PFC 유화액의 산소전달 능력에는 별다른 영향을 미치지 않음을 예측할 수 있었다.

Fig. 4는 순환시간에 따른 두 개체의 백혈구 수의 변화를 나타낸 그림이다. 순환하는 백혈구 수는 시간이 경과함에 따라 감소하였다. 120분의 체외순환(ECC) 동안, 백혈구 수는 초기의 약 75%까지 감소하였다. 이는 PFC 유화액이 백혈구의 역할을 대신하여 백혈구의 활성화를 억제한 결과라고 판단된다.

Fig. 5는 두 개체가 순환되는 동안 neutrophil의 활성화를 나타내는 그림이다. 역시 PFC 유화액이 첨가되지 않은 경우가 neutrophil의 소모량이 많음을 나타낸다. 각 측정시간에서 순환한 혈액으로부터 neutrophil의 소비는 PFC 유화액 개체보다 처리되지 않은 개체에서 더 컸다. 개체사이의 차이는 순환이 시간이 60분에서 90분 사이에 가장 크게 나타났으며 120분에서는 처리되지 않은 neutrophil은

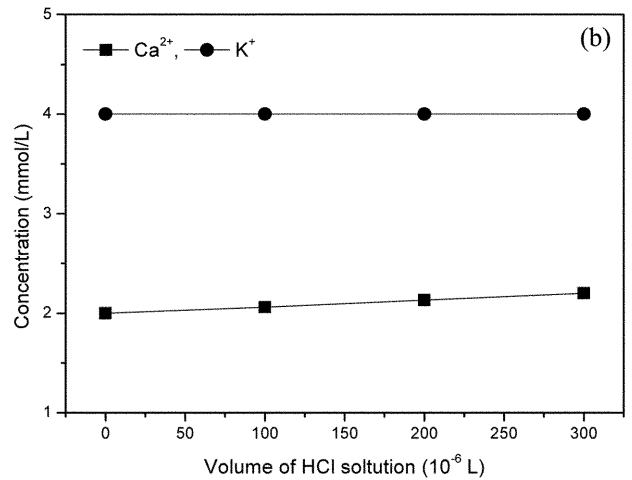
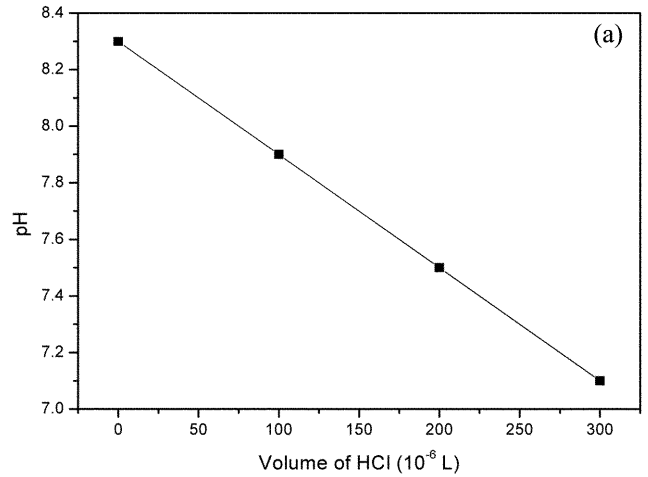


Fig. 3. Change of pH and concentration of potassium and calcium ion in PFC emulsion by various volume of 1N HCl solution. (a) pH, (b) potassium and calcium ion.

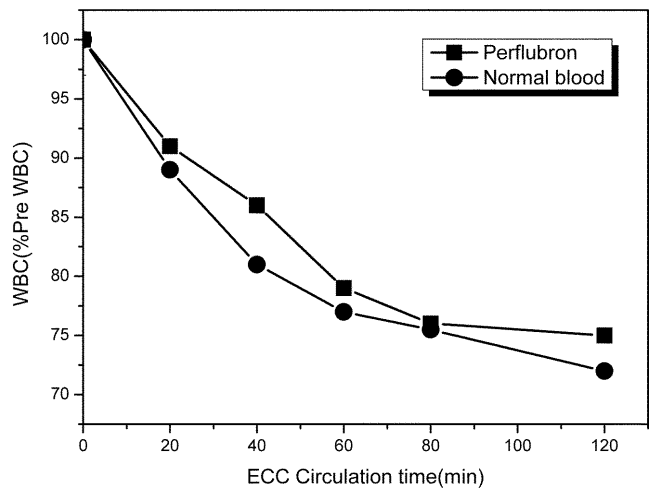


Fig. 4. White blood cell concentration with circulation time.

초기의 48%를 유지하였으며, PFC 유화액으로 처리된 개체의 neutrophil은 초기의 55%를 유지하였다. 두 그림을 통하여 PFC 유화액이 백혈구(white cell, WBC)와 neutrophil의 활성화를 억제하는 현상을 확인 할 수 있었다. 이는 급성 호흡중후군이 neutrophil의 활

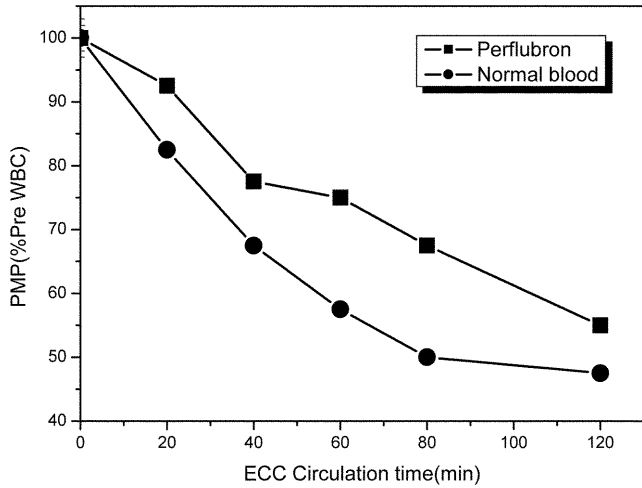


Fig. 5. Neutrophil concentration with circulation time.

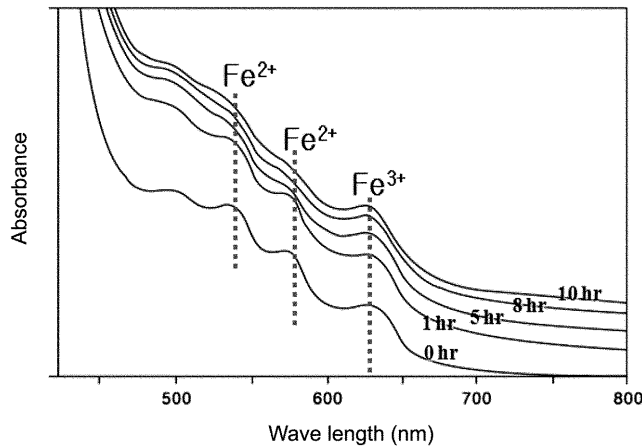


Fig. 6. Oxidation of heme iron(Fe) with time.

성화에서 기인된다는 점에 착안하면 PFC 유화액은 급성 호흡중후군 환자에게 적용되어지는 혈관 내 폐 보조장치에서 우수한 혈액 대용물질로 적용될 수 있다고 판단된다.

Fig. 6은 헤모글로빈의 안정성 측정을 위하여 Hb(Sigma)을 PBS로 용해시킨 후 옥시헤모글로빈(Fe^{2+})에서 메트헤모글로빈(Fe^{3+})으로 전자 변화하였을 때 적외선 분광계를 사용하여 관찰한 그림이다. 헤모글로빈은 535 nm, 573 nm 및 626 nm에서 특성피크를 보이는데 이중 산소를 운반할 수 있는 상태인 Fe^{2+} 이온의 피크는 535 nm와 573 nm의 피크이고, 이미 산소에 의하여 산화된 met-Hb의 Fe^{3+} 이온의 피크는 626 nm의 피크이다. 또한 그림은 헤모글로빈을 정상인의 체온인 36.5 °C에서 방치한 후 시간에 경과에 따른 헤모글로빈의 변화 특성을 나타내기도 한다. 그림은 6시간 이후 Fe^{2+} 이온의 피크는 거의 나타나지 않는 반면 산소를 운반할 수 없는 Fe^{3+} 이온의 피크의 특성값에는 변화가 없음을 보인다. 이는 헤모글로빈의 반감기를 나타내며, 헤모글로빈 자체만으로는 혈액 대용물질로 안정적으로 산소전달 능력을 향상시킬 수 없다고 판단된다.

Fig. 7은 헤모글로빈을 EDC로 가교한 후 FT-IR을 사용하여 가교 상태를 확인하기 위한 그림이다. EDC의 가교 결합은 헤모글로빈의 카르보닐기와 EDC가 공유결합을 하고 다시 다른 아민기가 EDC에 결합함으로써 이루어진다. 그림에서 헤모글로빈의 카르보닐기의 특성피크가 가교결합이 일어나면서 1,533 cm^{-1} 에서 1,560 cm^{-1} 으로 이

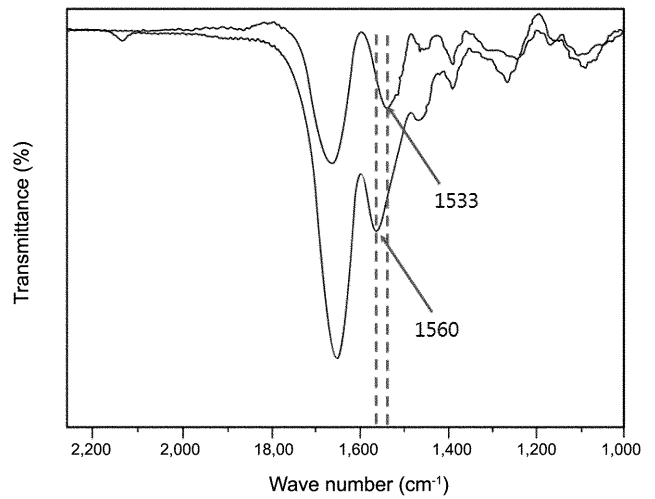


Fig. 7. IR spectra of cross linked 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and hemoglobin.

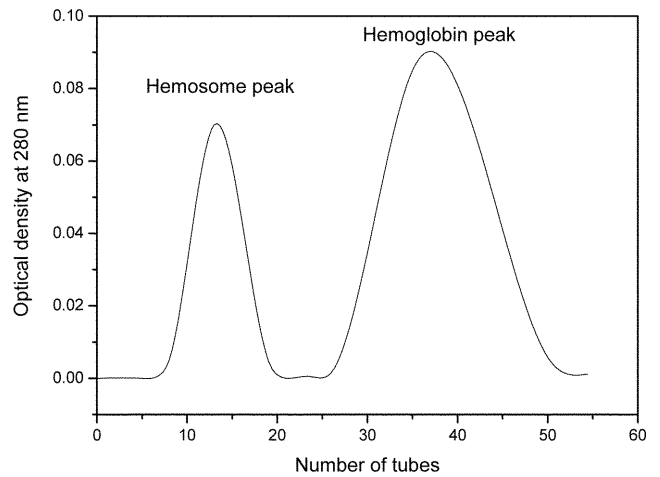


Fig. 8. Sephacryl S-500 column chromatogram of hemosome solution.

동됨을 알 수 있다. 이를 통하여 EDC와 헤모글로빈과의 가교결합이 효과적으로 이루어졌음을 판단하였다.

Fig. 8은 제조된 hemosome의 크로마토그램으로 제조과정에서 지질막에 microencapsulation 되지 않은 미반응 헤모글로빈이 상당수 존재함을 알 수 있다. 본 실험에서는 미반응 헤모글로빈을 제거하기 위하여 Sephacryl S-500 column을 사용하였다. 지질에 쌓인 liposome의 형태의 hemosome은 헤모글로빈보다 크기 때문에 먼저 용출 된다. 반복된 컬럼분리를 통하여 효과적으로 미반응 헤모글로빈을 제거할 수 있었다.

Fig. 9는 particle size analyzer를 사용하여 hemosome의 크기와 입자분포를 확인한 결과이다. 제조된 hemosome의 평균크기는 0.8 μm 이었으며, 95%가 1.9 μm 이내에 분포하였다.

Fig. 10은 산소 이동능력을 알 수 있는 산소 포화도를 나타낸 그림이다. 그림에서 정상 적혈구의 포화곡선은 S자 형태를 나타내고 있다. 그 이유는 혈액의 경우 헤모글로빈의 Fe원자의 배위결합되어 있어 산소포화곡선은 S자 형태를 유지하며 P_{50} 은 24.0 mmHg이었다. 제조한 hemosome의 경우 정상 혈액과 유사한 S자 형태의 포화도를 보여주기 때문에 정상 혈액과 유사한 산소 이동능력을 보여 주리라 판단된다. Hemosome과 혈액을 1:4(V/V%)의 혼합한 혼합

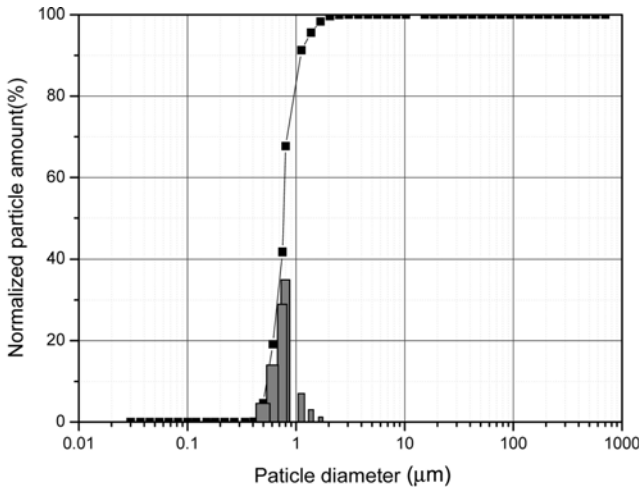


Fig. 9. Normalized particle amount(%) and particle size(μm) of hemosome.

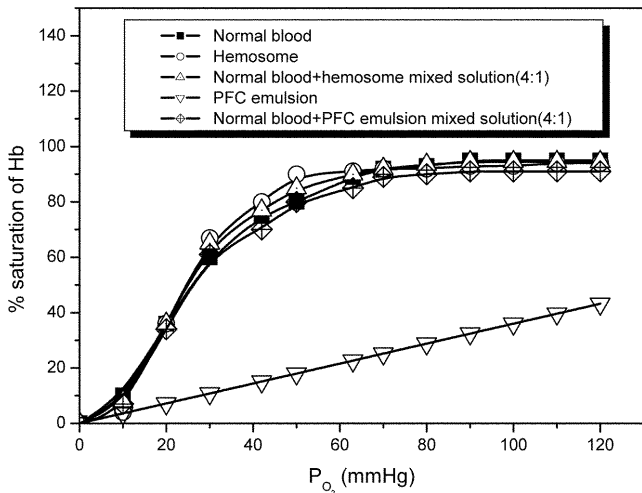


Fig. 10. Oxygen dissociation curve of various solution.

용액에서의 산소 포화도는 정상혈액과 유사한 결과를 보였으며, PFC 유화액과 혈액을 1:4(V/V%)로 혼합한 혼합용액에도 정상혈액과 유사한 결과를 보였다. 그러나 PFC 유화액의 산소 포화도는 1차 함수 형태를 유지하였다. 실험결과 PFC 유화액의 산소 포화도는 hemosome의 산소 포화도보다 낮게 나타났다. 그러나 혼합액에서의 산소포화도는 유사한 경향을 보였으나, 혈액에 hemosome을 혼합한 혼합액의 산소 포화도는 PFC 유화액을 혼합한 혼합액보다 더 높은 산소 포화도를 보였다. 그 이유는 hemosome의 산소포화도가 PFC 유화액보다 더 높기 때문에 이와 같은 결과를 얻게 되었다.

4. 결 론

본 연구는 PFC 유화액과 높은 산소 전달능력이 있으며 혈액과 유사한 산소 포화도를 갖는 헤모글로빈을 계란의 인지질로 microencapsulation한 hemosome을 제조하여 그 특성을 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. Fluosol-DA를 sonication하여 (출력 50 watt) 평균입자크기가 437 nm인 안정성 있는 유화액을 제조할 수 있었으며, glycerol의 농도를 어느 정도 증가시킴으로써 유

화시간 시간을 줄이고 안정도를 높일 수 있었다. 소 혈액으로부터 추출한 헤모글로빈을 달걀노른자로부터 추출한 인지질로 microencapsulation하여 직경 0.8 μm의 hemosome을 얻을 수 있었다. Hemosome의 산소포화도 곡선은 정상혈액의 적혈구와 같이 S 자형을 보였으며 P₅₀은 24 mmHg이었다. 그러나 PFC 유화액의 산소 포화도는 1차 함수형태를 유지하였다. Hemosome과 혈액을 1:4(V/V%)의 혼합한 혼합용액에서의 산소 포화도는 정상혈액과 유사한 결과를 보였으며, PFC 유화액과 혈액을 1:4(V/V%)로 혼합한 혼합용액에도 정상혈액과 유사한 결과를 보였다. 그러므로 hemosome과 PFC 유화액을 혈액과 혼합하여 사용한다면 대용혈액으로 사용 가능하다고 판단된다.

감 사

본 연구는 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2006-521-D00619)과 전북대학교병원 임상연구소의 학술연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. Vaslef, S. N., Cook, K. E., Leonard, R. J., Mockros, L. F. and Anderson, R. W., "Design and Evaluation of a New, Low Pressure Loss, Implantable Artificial Lung," *ASAIO J.*, **40**, M522-M526(1994).
2. Baskaran, H., "Blind-Ended Hollow Fiber Prototypes of the Penn State Intravascular Lung," Ph.D. Dissertation, The Pennsylvania State University(1997).
3. Federspiel, W. J., Lund, L. W., Bultman, J. A., Wanant, S., Matoney, J., Golob, J. F., Frankowski, B. J., Watach, M., Litwak, P. and Hattler, B. G., "Ex-vivo Testing of the Intravenous Membrane Oxygenator(IMO)," *ASAIO J.*, **45**, 127(1999).
4. Kim, G. B., Kwon, T. K., Lee, S. C., Kim, S. J., Cheong, I. S., Oh, I. H., Kim, K. J., Byun, Y. S. and Jheong, G. R., "Characteristics of Oxygen Transfer in Intravascular Lung Assist Device by Vibrating," *Korean Chem. Eng. Res.*, **42**(2), 151-162(2004).
5. Kim, G. B., Kim, S. J., Hong, C. U., Kwon, T. K. and Kim, N. G., "Enhancement of Oxygen Transfer in Hollow Fiber Membrane by the Vibration Method," *Korean J. Chem. Eng.*, **22**(4), 521-527(2005).
6. Kim, G. B., Hong, C. U. and Kwon, T. K., "Design of An Intravenous Oxygenator," *J. Artif. Organs*, **9**, 34-41(2006).
7. Kim, G. B., Hong, C. U. and Kwon, T. K., "Vibration Characteristics of Piezoelectric Lead Zirconate Titanate by Fluid Flow in Intravascular Oxygenator," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **45**(4B), 3811-3817(2006).
8. Winslow, R. M., "Hemoglobin-Basec Red Cell Substitutes," The Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA(1992).
9. Alpha Therpeutic Corporation. Fluosol 20% intravascular perflorochemical emulsion delivers oxygen to protect the heart during PTCA. Product Monograph, Alpha Therapeutic Corp., Los Angeles(1990).
10. Ivanitsky, G. R. and Vorobyev, S. I., "Perfortan Blood Substitute with Gas-Transporting Function," Product Monograph; Perfortan Co., Pushchino, Russia(1997).
11. Park, J. K., "Characteristics of Gas Transfer in Intravenous Lung

- Assist Device by using Blood Substitute; Ph.D. Dissertation, Chonbuk National University(2003).
12. Szebeni, J., Di Iorio, E. E., Hauser, H. and Winterhalter, K. H., "Encapsulation of Hemoglobin in Phospholipid Liposomes: Characterization and Stability; *Biochemistry*, **24**, 2827-2832(1985).
 13. Szoka, F. and Papahadjopoulos, D., "Procedure for Preparation of Liposomes with Large Internal Aqueous Space and High Capacity by Reverse-phase Evaporation; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 4194-4198(1978).
 14. Fujita T., Sumaya T. and Yokohama, K., "Fluorocarbon Emulsion as a Candidate for Artificial Blood: Correlation Between Particle Size of the Emulsion and Acute Toxicity; *Europ. Surg. Res.* **3**, 436-453(1971).