

## 인공적혈구의 제조 및 이용

이화여자대학교 의과대학 생리학교실

하 종 식 · 조 응 행 · 김 구 자

(1990년 4월 24일 접수)

— Abstracts —

### Synthesis and Use of Artificial Red Cells

Jong Sik Hah, Eng Haeng Cho and Ku Ja Kim

*Department of Physiology, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea*

Hemoglobin was purified from the outdated human red blood cells. Phospholipids were purified from egg yolk and stored in chloroform. The artificial red blood cells (hemosome) were prepared by encapsulation of hemoglobin with phospholipid multilayer using rotary vacuum evaporator. The shape and size of hemosomes were measured by phase contrast microscope and image analyzer. The function of hemosomes was tested by measuring oxygen dissociation curve using blood gas analyzer. In order to test whether hemosomes are useful as blood substitute they were infused into rats of which one third of total blood were drawn. The results obtained are summarized as followings.

- 1) Hemosomes were spherical shape and their mean diameter was 0.7  $\mu$ m.
- 2) Oxygen dissociation curve of hemosomes showed the same figure as that of normal red blood cells.
- 3) All rats given 1/3 transfusion with hemosomes survived until sacrificed whereas three of four rats given 1/3 transfusion with saline died within 1 hour and the rest of them died within 24 hours.

**Key Words:** Hemosome, Artificial Red Cell, Blood Substitute, Encapsulation of Hemoglobin

## 서 론

지난 수세기 동안 급성실혈로 인한 사망을 줄이기 위해서 혈액 대체 목적으로 여러가지 형태의 치료가 시도되어 왔으며 (Hamilton et al, 1947; Hamilton et al, 1947) 가장 보편적으로 전혈 (whole blood)을 수혈하거나 혈구 부분을 분리하여 수혈하는 방법이 적용되었다.

그러나 수혈을 하는 경우 이로 인한 용혈반응, 알레르기 반응, 전색증, 혈액응고 방해, 질병의 전파 등 각종 부작용이 우려되기 때문에 점차 혈액의 대

용물질 개발을 서두르게 되었다.

대용물질의 개발은 두 분야로 나누어 그 하나는 실혈로 인한 혈액량의 보충을 위한 대체물질로서 혈장액, 알부민용액, 젤라틴, 카제인, 덱스트란, hydroxyethyl starch 및 colloid-free salt 용액을 응용하는 것이었는데 (Miller, 1978) 이들 물질은 혈액의 양을 보충하고 혈장삼투압을 유지시킬 수는 있지만 산소의 운반 능력이 없기 때문에 다량의 수혈을 요하는 경우에는 적절하지 못한 것으로 판명되었다.

그래서 다른 한편으로는 이러한 인공유체속에 산소를 운반시킬 수 있는 헤모그로빈을 포함시키는 이른바 Stroma-free 헤모그로빈 용액 (De Venuto et al, 1977)과 fluorocarbon 부유액을 개발하게 되었다 (Krone et al, 1974; Naito & Yokoyama, 1978).

\*이 연구는 과학재단 기초연구지원 일반연구비(1987~1989)에 의하여 이루어졌음.

Stroma-free 헤모그로빈 용액은 산소를 운반하는 능력이 있는 반면 순환도중 빨리 파괴될 뿐 아니라 (Rabiner et al, 1968; Rabiner et al, 1970) 신장에 해가 크기 때문에 (Savitsky et al, 1978) 실제로 임상에 적용하기에는 문제가 남아있다. Fluorocarbon 용액의 경우에는 산소의 결합 능력이 순전히 물리적인 용해도에 의존하므로 (Lowe, 1987) 혈액의 산소 농도를 유지시키기 위해서는 포화산소가 요구되고 이들은 이물질이므로 장기간 사용할 경우 거부반응을 일으킬 가능성이 있으므로 또한 사용에 제약이 따른다 (Sloviter, 1975). 이러한 이유들 뿐만 아니라 물질 문명의 발전이 가속화되고 사회가 다변화되면서 그 부작용으로 각종의 대형사고가 빈발함에 따라 혈액의 수요가 급증하고 있는 추세에 비하여 현혈량은 상대적으로 감소하고 있기 때문에 (김기홍, 1978) 수혈량의 전량을 현혈에 의존하고 있는 현실을 감안할 때 전체 혈액의 특성에 부합되고 수혈로 인해 생기는 문제들을 배제시킬 수 있는 새로운 인공 혈구의 제조가 절실히 요청되고 있는 실정이다.

지금까지 혈액의 대체목적으로 시도된 것 중에서 이상의 조건에 가장 잘 부합되는 인공적혈구의 제조는 농축헤모그로빈을 지질의 막으로 뒤집어 싸운 hemosome의 제조 (Djordjevich & miller, 1980)를 꼽을 수 있다. 즉 hemosome은 헤모그로빈을 함유하고 있어 순환하면서 폐로부터 조직으로의 산소 운반이 가능할 뿐 아니라 hemosome의 막은 지질로만 사용할 경우 면역반응 등의 거부반응을 배제할 수 있어 응급처치용으로도 임상적 적용이 가능하다. 그러나 순환도중 쉽게 파괴되므로 다량주입하면 세망내피계 조직 등에 헤모그로빈이 축적되어 피해가 예상되고, 산소의 포화도 곡선이 정상혈액과는 차이가 있으므로 아직도 개선의 여지가 많으며, 현실적으로는 hemosome의 제조에 사용되는 지질이 고가이고 국내에는 생산업체가 없기 때문에 보편화 되기에는 아직도 여건이 미진한 상태이다.

이에 본 연구는 hemosome을 제조할 때 사용되는 지질을 합성 지질 외에 구입이 비교적 용이하고 가격이 저렴한 계란으로부터 추출한 것을 사용함으로써 대량 생산을 도모코져 하였으며 동물실험을 통하여 임상 응용이 가능한지를 시험하였다.

## 실 험 방 법

### 1. 재 료

대부분의 인지질 (phospholipid)은 달걀의 노른자로부터 추출하여 사용하였다. 순수 phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine 및 phosphatidylserine은 Avanti polar lipid사 (Birmingham, Alabama, USA)에서 구입하였고 cholesterol 및  $\alpha$ -tocopherol은 Sigma사 (St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하였다. 사용된 유기용매 중 chloroform과 acetone은 Shinyo사(일본), methanol은 Jame Burrough (E.A.D)사(영국), toluene은 Rots chemical사(벨지움) 그리고 petroleum ether는 일본석유 주식회사(일본) 제품을 사용하였다.

그 외 시약은 모두 일급이상의 시약으로 국내에서 구입하였다. 헤모그로빈은 병원으로부터 수술시에 사용하고 남은 신선한 혈액이나 혈액은행으로부터 구입한 수혈기간이 지난 혈액으로부터 정제하여 사용하였다.

### 2. 헤모그로빈의 정제

De Venuto등(1977)의 방법을 약간 수정하여 수혈기간이 지난 인체 혈액으로부터 분리·정제하였다. 즉 혈액을 4,000×g에서 10분간 원심분리하여 적혈구를 얻고 생리적 식염수로 3회 세척한 후 적혈구 용적과 동량의 증류수와 0.4배의 toluene을 가하여 용혈시켰다. Hemolysate를 잘 저은 후 냉장실 (4°C)에 하룻밤 동안 보관하였다가 수술용 형검을 통하여 여과를 시키고 이 여과액을 6,000×g에서 20분간 원심분리하여 상등액의 헤모그로빈 용액을 얻었다. 여기에 40% 황산 암모니움을 가하여 헤모그로빈을 결정화시킨 후 냉장실에 하룻밤 더 방치하였다가 4,000×g에서 30분간 원심분리하여 헤모그로빈 결정의 침전물을 얻었다. 이를 증류수와 생리적 식염수에 각각 24시간씩 연속 투석시키고 헤모그로빈 농도가 10% 이상되도록 농축시킨후 용기에 나누어 사용할 때까지 -70°C에 냉동보관하였다.

### 3. 인지질(phospholipid)의 추출

Bligh & Dyer (1959)의 방법 및 Hui (1989)의 방

법을 이용하였다. 100 g의 달걀노른자를 100 ml의 Chloroform과 200 ml의 methanol로 2분간 blending 한 후 chloroform과 증류수를 각각 100 ml씩 차례로 가하여 저어주었다. 이 용액을 Whatman No. 1 여과지를 통하여 500 ml 메스실린더에 여과하고 용매가 각 층으로 분리될 때까지 수 분동안 세워 두었다가 methanol층은 제거하고 chloroform층을 얻었다.

여기에는 인지질 및 중성지질이 혼합되어 있는데 인지질을 분리하기 위하여 chloroform 용매층을 질소가스로 건조시키고 이것이 녹을 때까지 50~100 ml의 petroleum ether를 가하여 다시 용해시켰다. 여기에 acetone 약 200 ml를 가한후 얼음속에 2시간 방치하여 인지질을 침전시킨 다음 다시 acetone으로 3회 세척하고 질소가스로 건조시켰으며, 무게를 측정하고 chloroform에 일정한 농도가 되도록 녹여서 사용하였다. 인지질의 주성분인 phosphatidylcholine과 phosphatidylethanolamine을 더욱 순수 분리하기 위해서는 silicic acid column을 사용하였다.

Silicic acid를 110°C에서 3시간 활성화시킨 후 건조기 내에서 식히고 400 g을 chloroform : methanol (2:1) 혼합유기용매 2 l에 현탁시켜 딸아버림으로서 미세 분말가루를 제거하였다. 이를 매번 chloroform : methanol (6:1)의 혼합유기 용매 1 l씩으로 2~3회 씻어버리고 column (23×3.5 cm)에 채웠다.

Column에 silicic acid 1 g당 약 25 mg의 인지질을 도포하고 chloroform : methanol (6:1)의 혼합 유기용매로 용출시키면 900 ml와 1,250 ml 사이의 용출액에서 phosphatidylethanolamine이 용출되었고 용매를 바꾸어 chloroform : methanol (3:2)의 혼합용매로 용출시키면 3,200 ml와 4,200 ml 사이의 용출액에서 phosphatidylcholine이 용출되었다. Phosphatidylcholine과 phosphatidylethanolamine이 함유된 각 분획의 용출액을 합하여 질소가스로 건조시키고 적당농도가 되도록 chloroform에 용해시킨후 사용할 때까지 -70°C의 냉동기에 보관하였다.

#### 4. Hemosome의 제조

경제된 헤모그로빈을 16~18%가 되도록 농축시킨 후 2, 3-diphosphoglycerate (DPG)를 2, 3 DPG/헤모그로빈의 비율이 1.5가 되도록 가하여 헤모그로빈 용액의 pH를 7.4, 삼투질 농도는 40 mosm/l 이하

가 되도록 유지하였다. 이 헤모그로빈을 뒤집어 썬을 지질의 조성은 가급적 정상적혈구막의 조성보다 비슷하도록 인지질 : 콜레스테롤을 약 75:25로 하였고 (Szoka & Papahadjopoulos, 1978) 인지질의 조성은 phosphatidylcholine : phosphatidylethanolamine :  $\alpha$ -tocopherol=45:45:10이 되도록 하였다.

한편, 달걀에서 추출한 인지질을 사용할 경우 인지질 90%와  $\alpha$ -tocopherol 10%의 혼합지질을 사용하였다. Hemosome의 제조는 Szebeni등(1985)의 방법에 따랐다. 즉 혼합지질을 chloroform에 용해시킨 후 1 l의 둥근 플라스크에 넣고 회전 증발기로 용매를 증발시키면서 플라스크 내벽에 얇은 인지질막을 형성시키고 질소가스로 잔여 용매를 완전히 휘발시켰다. 여기에 헤모그로빈 용액 (16%)을 지질 : 헤모그로빈=10:1(w/w)이 되도록 가하고 직경 3~4 mm 정도의 유리구슬 5~6개를 넣어 회전 증발기를 이용, 약 20°C에서 10분간 회전시키면서 hemosome vesicle을 만들었다.

이것을 다시 인지질 박막을 형성시킨 다른 플라스크에 옮겨서 같은 방법으로 남아 있는 자유 헤모그로빈을 encapsulating시켰다. 이때 아직도 hemosome을 형성하지 못하고 남아 있는 자유헤모그로빈은 Sephacryl S-500 column을 통하여 제거하였으며 hemosome을 생리적 식염수로 세척하고 직경 1  $\mu$ m의 여과지로 여과한 후 실험에 사용하였다.

#### 5. Hemosome의 형태분석

Hemosome의 크기 및 hemosome내의 헤모그로빈 포함 여부를 분석하기 위하여 위상차 현미경 (Laborlux S, Leitz Co., Wetzlar, West Germany) 하에서 관찰하고 필름 (plus-X pan 125, Kodak)을 사용하여 촬영하였다.

이 사진을 화상 분석기 (Quantimet 520, Cambridge Instruments Co., Cambridge, United Kingdom)로 분석하여 hemosome의 크기 (size)와 이의 분포도 (size distribution), 면적, 위치, 형상등을 측정하였다.

#### 6. Hemosome의 산소해리 곡선 제도

Hemosome 부유액의 산소이동능력을 알 수 있는

**Table 1.** The composition of the mixture gas possessing a various oxygen partial pressure.

PO <sub>2</sub> (mmHg)	%O <sub>2</sub>	Vol/4L (ml)	PCO <sub>2</sub> (mmHg)	%CO <sub>2</sub>	Vol/4L (ml)	PN <sub>2</sub> (mmHg)	%N <sub>2</sub>	Vol/4L (ml)
0	0	0	40	5.3	212	720	94.7	3788
10	1.3	52	40	5.3	212	710	93.4	3736
20	2.6	80	40	5.3	212	700	92.1	3684
30	3.9	156	40	5.3	212	690	90.8	3632
40	5.3	212	40	5.3	212	680	89.4	3576
50	6.6	264	40	5.3	212	670	88.1	3524
60	7.9	316	40	5.3	212	660	86.8	3472
70	9.2	368	40	5.3	212	650	85.5	3420
80	10.5	420	40	5.3	212	640	84.2	3368
90	11.8	472	40	5.3	212	630	82.9	3316
100	13.2	528	40	5.3	212	620	81.5	3260
110	14.5	580	40	5.3	212	610	80.2	3208
120	15.8	632	40	5.3	212	600	78.9	3156

산소해리 곡선을 그리고 Hill 방정식(Gaber et al., 1983)을 만족시키는 각 제원의 값을 비교하였다.

산소의 각 분압을 갖는 기체를 만들기 위해서 spirometer를 이용하여 표 1과 같이 질소, 이산화탄소 및 산소의 혼합기체를 만들고 hemosome의 부유액에 3분간 bubbling시켜 포화시킨 후 산소분압 및 산소 포화도를 혈액가스 분석기(Stat Profile 3, NOVA CO., Waltham, MA, USA)로 측정하였다.

### 7. 지질정량

추출한 지질의 분석정량은 Hah등(1983)의 방법에 준하였다. 즉, chloroform에 녹아있는 지질을 200  $\mu$ l씩 Ways & Hanahan(1964)과 같이 두께 0.25 mm의 K 6F silica gel의 thin layer에 도포하고 chloroform : methanol : acetic acid : H<sub>2</sub>O (100 : 50 : 14 : 6)의 분리용 혼합용매로 크로마토그래피(Skipski et al., 1964)하였다.

크로마토그램을 황산 : 알콜(1:1) 혼합액체로 분무한 후 180°C에서 10분간 태워 인지질의 각 성분을 가시화하고 사진을 찍어 보관하였으며 각 성분은 판에서 긁어내어 Bartlett(1959) 방법으로 무기인의 양을 측정하였다. 인지질의 양은 위의 방법으로 측정된 무기인의 양을 25배하여 계산하였다.

### 8. 헤모그로빈의 농도 측정

헤모그로빈의 농도는 하(1988)의 방법으로 혈액 소제(Hellige Inc., Garden, NY, USA)를 사용하여 측정하였다.

### 9. 동물실험

인공혈액으로서의 hemosome의 생체적용여부를 시험하기 위하여 Hunt등(1985)과 같이 동물실험을 시작하였다. 실험동물로는 체중 200~300 g의 Sprague Dawley 쥐를 암수구별없이 사용하였으며 Somnopentyl 주사액(6.48% Sodium pentobarbital)을 쥐 체중 100g당 0.1 ml 주사하여 마취시킨 후 양쪽 경정맥을 노출시켜 한쪽에서 혈액을 채취하고 다른쪽으로 생리적식염수 또는 hemosome 용액을 주입하였다.

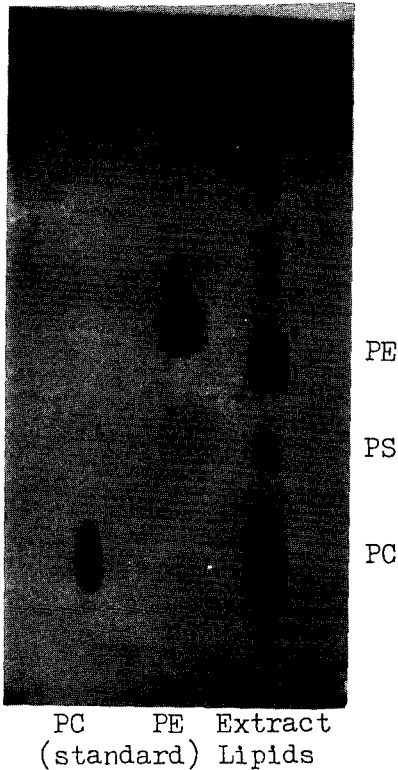
Hemosome의 혈액대용효과를 보기 위하여 쥐의 혈액량을 체중의 6%로 계산하여 전체혈액의 1/3을 채혈한 후 실험군에는 동량의 hemosome 용액을 주입하였고 대조군에는 동량의 생리적 식염수를 주입하였으며, 주입이 끝난후 봉합하고 항생제로 Kanamycin을 쥐 체중 100g당 40 mg 주사하였다.

## 실 험 성 적

### 1. 추출한 지질의 성분

Hemosome을 제조하기 위하여 달걀로부터 추출한 지질의 성분은 제 1도와 같다. 본 실험방법으로 추출한 지질에는 phosphatidylcholine과 phosphatidylethanolamine이 동량 포함되어 있었으며 phosphatidylserine 및 미지의 지질이 소량 포함되어 있었다.

이 혼합지질로부터 phosphatidylcholine과 phosphatidylethanolamine을 분리하기 위하여 silicic acid column으로 크로마토그래피한 결과는 제 2도와 같다. 이 그림에서 보는 바와같이 phosphatidylethanolamine은 chloroform : methanol(6:1)의 용매로 초기에 용출되었고 phosphatidylcholine은 chloroform : methanol(3:2)의 용매로 후기에 용출되었다.



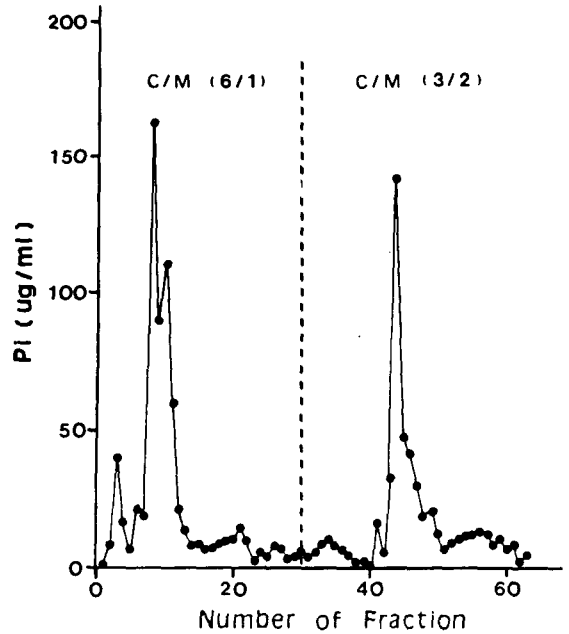
**Fig. 1.** Thin layer chromatogram of the extracted egg yolk phospholipids with standards of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. A solvent system containing chloroform : methanol : acetic acid : water (100 : 50 : 14 : 6) was used to develop the chromatograms. The spots were visualized by charring at 180°C for 10 min after spraying with sulfuric acid : ethanol (1 : 1).

### 2. Hemosome의 크로마토그램

Hemosome의 제조과정중 지질막에 싸이지 않은 자유헤모그로빈은 Sephacryl S-500 column 크로마토그래피를 이용하여 분리 제거하였다. 크로마토그램은 제 3도와 같다. 이 그림에서 보는 바와같이 Hemosome은 지질에 쌓인 liposome의 형태로서 그 크기가 헤모그로빈 입자보다는 크기 때문에 먼저 용출되었고 자유헤모그로빈은 뒤에 용출되었다.

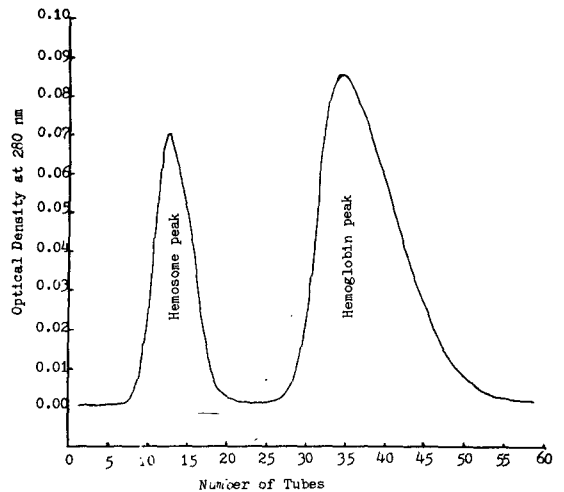
### 3. Hemosome의 형태

Hemosome의 형태와 크기를 분석하기 위하여 위



**Fig. 2.** Silicic acid separation chromatogram of the extracted egg yolk phospholipids.

The extracted egg yolk phospholipids were applied on the column, phosphatidylethanolamine was eluted with a solvent containing chloroform : methanol (6 : 1) and phosphatidylcholine was eluted with a solvent containing chloroform : methanol (3 : 2).



**Fig. 3.** Sephacryl S-500 column chromatogram of hemosome solution prepared by the method.

Optical density was automatically recorded by the instrument. The bed volume of column was 7 ml and 550  $\mu$ l per tube were collected.

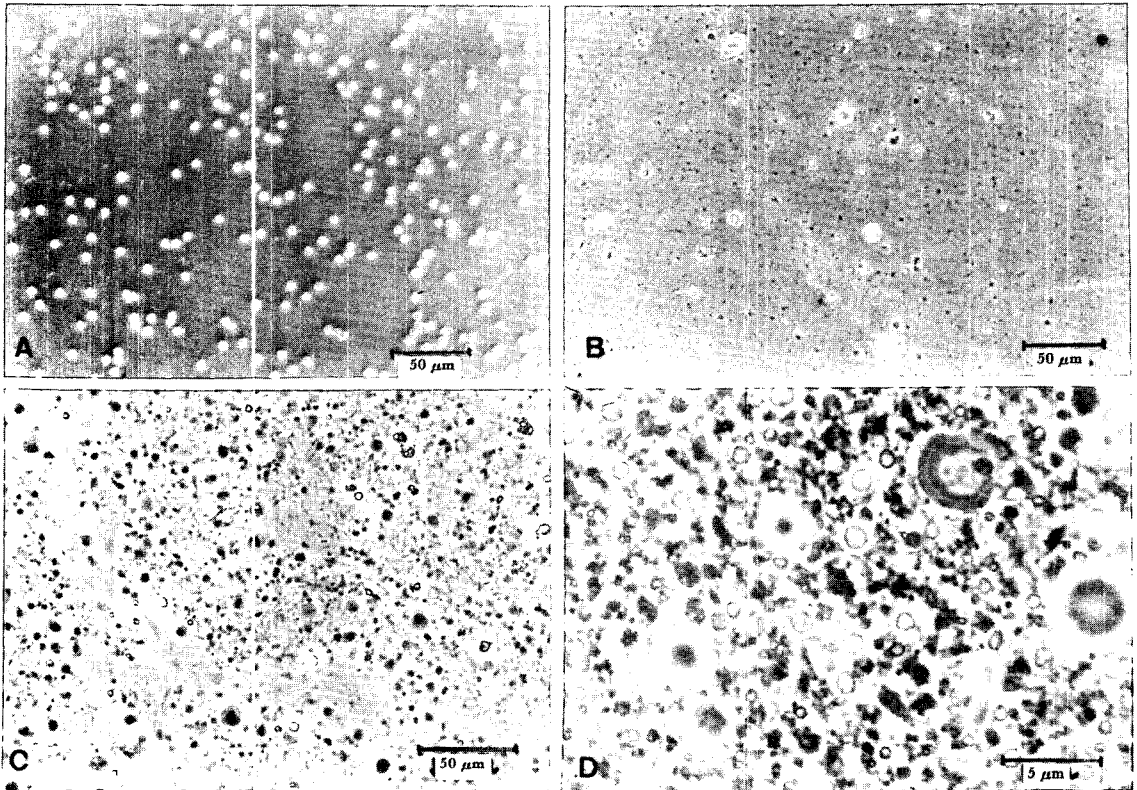


Fig. 4. The pictures of normal RBC and artificial red cells.

- (A) Picture of normal RBC
- (B) Picture of the artificial red cells (Hemosomes)
- (C) Picture of hemosomes after storage for 2 weeks at 4°C
- (D) Picture of hemosomes with higher magnification

상차현미경하에서 관찰하고 찍은 사진은 제 4 도와 같다. 제 4(A) 도는 정상혈액의 적혈구의 모양과 크기를 보이는 것으로서 hemosome과 비교하고자 하였다.

제 4(B) 도는 실험방법에서 설명한 바와 같이 hemosome을 만들고 위상차 현미경 하에서 찍은 사진으로 정상적혈구와 비교하여 크기가 작고 모양도 다양한 것으로 나타났다. 제 4(C) 도는 제조된 hemosome을 냉장고(4°C)에 2주일간 보관해 두었다가 관찰한 것으로서 크기와 모양이 거의 변화가 없었다. 제 4(D) 도는 확대 배율을 높여 크기와 모양을 관찰한 것이다.

#### 4. Hemosome의 화상분석 분포도

Hemosome의 크기와 형태를 분석하고 그 분포양상을 관찰하기 위하여 제 4(B) 도를 화상분석기(Image analyzer)로 분석한 결과는 제 5 도와 같다.

제 5(A) 도는 장경(length)의 크기 분포도를 보이는 것으로서 크기는  $0.749 \pm 0.491$  (mean $\pm$ SD)  $\mu\text{m}$ 였고 97.5%는 0~2.083  $\mu\text{m}$  범주에 속하였다. 제 5(B) 도는 면적(area)의 크기 분포도를 보이는 것으로서 크기는  $0.412 \pm 1.072$  (mean $\pm$ SD)  $\mu\text{m}^2$ 였고 92.8% 이상이 1  $\mu\text{m}^2$  이내에 속하였다. 제 5(C) 도는 둘레(perimeter)의 크기 분포도를 보이는 것으로서 크기는  $2.219 \pm 1.579$  (mean $\pm$ SD)  $\mu\text{m}$ 였고 99% 이상

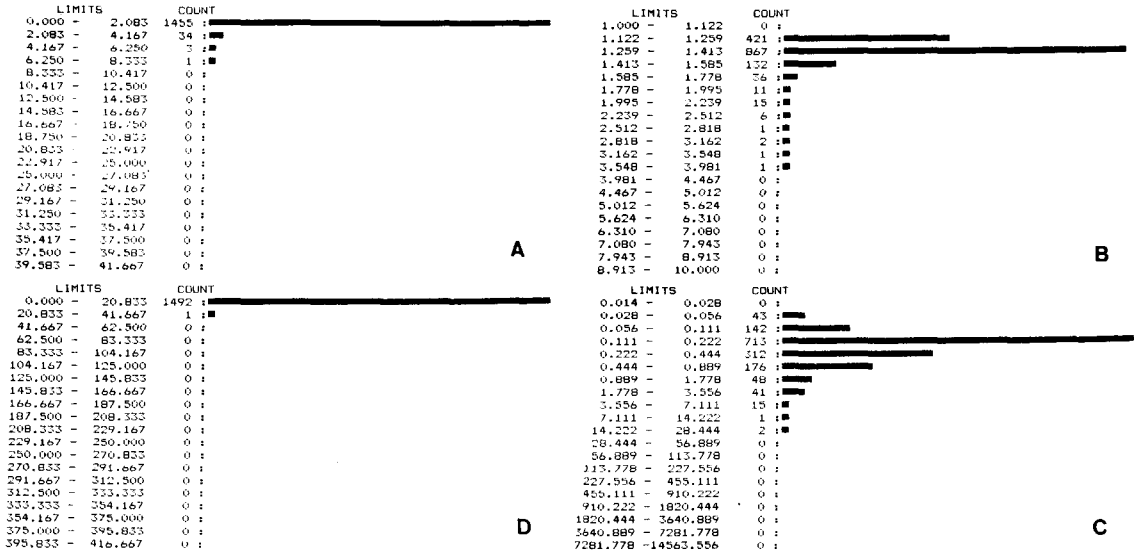


Fig. 5. Histogram results obtained by image analysis (Quantimet 520) of hemosomes.

- (A) Histogram showing distribution of count vs length
  - (B) Histogram showing distribution of count vs area
  - (C) Histogram showing distribution of count vs perimeter
  - (D) Histogram showing distribution of count vs shape
- All calibration units are microns.

이 0~20.833  $\mu\text{m}$  이내에 속하였다. 제 5(D) 도는 hemosome의 구형(roundness shape)의 크기 분포도를 보이는 것으로서 크기는  $1.336 \pm 0.185$  (mean  $\pm$  SD)였고 86.2% 이상이 mean  $\pm$  1SD에 속하였다.

### 5. Hemosome의 산소포화도 곡선

산소 이동능력을 알 수 있는 산소포화도 곡선은 제 6도와 같다. 이 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 hemosome의 산소포화도 곡선과 정상 적혈구의 산소포화도 곡선은 큰 차이가 없었다.

### 6. Hemosome의 혈액 대응효과

취에서 혈액의 1/3을 사혈시키고 동량의 hemosome을 투여한 후 생존율을 측정하므로써 혈액의 대응효과를 시험하였다. 이 실험결과와 표 2와 같다. 즉 1/3의 혈액을 채혈하고 hemosome 용액을 투여한 실험군에서는 5마리가 3주동안 희생시킬 때

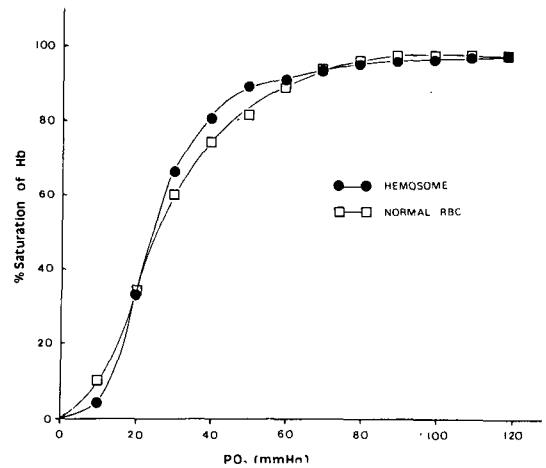


Fig. 6. Hemoglobin-Oxygen saturation curve for normal erythrocytes and for hemosomes. Both have about the same P50 (the oxygen pressure at which 50% of the hemoglobin is saturated).

까지 생존하였으므로 혈액의 대응효과가 있음을 입증하였다.

**Table 2.** The effect of transfusion of hemosome to survival time of the bled rat

	Amount of bleeding	Transfusion solution	Number of rats	Survival time
Control	one third of total blood	saline	4	Three were died within 1 hr and the rest died within 24 hours
Experiment	〃	Hemosome	5	All were alive about 3 weeks until sacrificed

## 고 찰

혈액의 수요는 날로 급증하고 있다. 현재 수혈에 사용되는 혈액의 대부분은 현혈에 의존하고 있는 실정인바 수요는 급증하는데 반해 현혈량은 상대적으로 감소추세에 있어 그 대책이 시급하다(김기홍, 1978). 또한 현혈된 것마저도 혈액의 특성상 원하는 기간동안 장기간 보관할 수 없는 단점이 있어 일시에 많은 혈액을 보유하였다 하더라도 일정기간내에 사용치 않으면 폐기해야만 하는 문제가 있기 때문에 현혈만으로서의 근본적인 해결이 불가능하다. 따라서 응급상황에서 혈액대용으로 사용할 수 있는 물질을 개발하려는 시도가 이루어지게 되었으며, 우선 혈액량의 보충을 위한 여러가지 혈장증량제(plasma expander)가 사용되기 시작하였다(Miller, 1978).

이들이 혈액대용물질로 사용되기 위해서는 적혈구의 중요기능이라고 할 수 있는 산소운반능력을 갖추어야 하는데 혈장증량제들 만으로는 이 요구를 충족시킬 수가 없기 때문에 최근에는 산소운반 능력을 갖는 여러 형태의 인공혈구를 제조하기에 이르렀다(Farmer & Gaber, 1987).

이런 요구에 부합되는 인공혈액은 생체내에서 무독성, 무항원성을 유지해야 하고, 체내에서 파괴가 가능한(biodegradable) 물질이어야 하며, 질병을 전파하지 않고 장기간 저장이 가능하며 기능적인 헤모그로빈을 다량 함유하고 있어 산소를 원활히 운반시킬 수 있어야 하는 조건을 동시에 만족시킬 수 있어야 한다(Hunt et al, 1985; Jopski et al, 1989). 이를 위해 많은 연구자들은 여러가지 방법으로 헤모그로빈을 지질막으로 싸서 만든 혈액소함유 리포솜

(일명 "hemosome")을 개발하였다(Djordjevich & miller, 1980; Garber et al, 1983; Hunt et al, 1985; Szebeni et al, 1985; Jopski et al, 1989).

Djordjevich & Miller(1980)는 헤모그로빈을 인지질과 콜레스테롤의 혼합지질막으로 싸운 헤모그로빈 용액을 만들었고, Gaber등(1983)은 헤모그로빈이 쉽게 메트헤모그로빈으로 변하는 것을 방지하기 위하여 리포솜을 만들때 dimyristoyl phosphatidylcholine : cholesterol : diacetyl phosphate(5 : 4 : 1)의 혼합지질을 사용하였으며, Szebeni등(1984)은 헤모그로빈을 싸우는 리포솜의 구성성분이 불포화지방을 함유할 경우에는 산화가 일어남으로 포화지방을 사용하면 이를 방지할 수 있고,  $\alpha$ -tocopherol, catalase 및 ascorbate는 헤모그로빈의 산화와 지방의 과산화를 방지하는 작용이 있음을 보고하였다. 그러나 이상의 인공혈구들은 임상실험을 거치지 않아 실제로 인공혈액으로서의 대용효과는 알려지지 않았다. 또한 합성 내지 고도로 정제된 인지질은 고가이기 때문에 경제적인 측면에서도 사용이 보편화되기에는 문제가 있다.

본 실험에서는 대용혈액으로서의 인공혈구를 만들기 위한 초보단계로, 재료를 쉽게 구할 수 있고 저렴한 달걀로부터 인지질을 추출하여 일반적인 리포솜을 만드는 방법으로 인체적혈구로부터 추출된 헤모그로빈을 싸서 hemoglobin-encapsulated liposome(hemosome)을 만들고 동물실험을 통하여 임상적인 적용여부를 시험하였다.

Bligh & Dyer(1954)의 방법 및 Hui(1989)의 방법으로 달걀노른자로부터 추출한 인지질에는 phosphatidylcholine과 phosphatidylethanolamine이 거의 동량씩 함유되어 있었다(제 1 도). 여기에 Szebeni



등(1984)과 같이 산화방지제로서  $\alpha$ -tocopherol을 섞어 혼합지질(phosphatidylcholine : phosphatidylethanolamine :  $\alpha$ -tocopherol=45 : 45 : 10)을 만들어 hemosome을 만들었으며, 한편으로는 콜레스테롤을 첨가하여(인지질 : 콜레스테롤=3 : 1) hemosome을 만들었다.

Hemosome을 만드는 과정에서 헤모그로빈의 일부는 리포솜에 싸여지지만 hemosome을 형성하지 못한 자유헤모그로빈은 그대로 주입할 경우 신독성 등을 유발하므로 이를 제거해야 한다. 지금까지 여러 연구자들이 hemosome을 제조하였지만 아직까지 자유헤모그로빈을 효과적으로 제거한 보고가 없었다. 본 실험에서는 Bio-Rad사의 Sephacryl S-500 Column을 사용하여 이를 제거할 수 있었다(제 3 도).

Hemosome의 모양을 관찰한 결과 제 4 도에서 볼 수 있는 바와같이 약 0.7  $\mu$ m의 장경을 갖는 구의 모양을 갖추고 있었으며, 화상분석기로 hemosome의 크기 및 이의 분포도를 측정하였더니 장경, 넓이, 원주 및 구상형등이 제 5 도와 같이 크기에 있어서는 적혈구의 약 1/5~1/10정도로 대부분이 구형을 갖는 전형적인 리포솜의 형태를 갖추고 있었다. 이를 대용혈액으로서의 기능을 측정하기 위하여 Djordjevich & Miller(1980) 및 Gaber 등(1983)과 같이 hemosome의 산소포화도를 측정한 결과 정상혈액과 거의 비슷하였으며  $p_{50}$ 은 약 24.0 mmHg였고, 산소포화도 곡선은 S자형(sigmoidal shape)을 유지하였다. 이것은 대용혈액으로서 산소운반 능력이 있음을 보이는 것으로서 쥐에서 혈액의 1/3을 사혈시킨 후 hemosome 용액을 투여한 후 생존율에 미치는 영향을 관찰한 결과 대조군에 비해서 현저히 생존율을 증가시켰다(표 2).

이는 Hunt등(1985)이 25% hemosome의 부유액으로 수혈했을 때 40%의 생존율을 보인 실험결과보다 양호한 것으로 판명되었다. 따라서 본 실험에서 제조된 hemosome은 인공혈액으로서의 후보물질로 사용가능성을 시사하고 있다.

그러나 이렇게 제조된 hemosome은 혈관내에 주입한 후 체내에서 쉽게 파괴되는 경향이 있으므로 이때 유리된 헤모그로빈이 신장등 각 장기에 해를 줄 우려가 있어 보다 단단한 막의 선택이 요구된다. 여

기에는 많은 종류의 지질을, 혼합비를 달리하면서 혼합지질의 리포솜을 만드는 방법이 포함될 뿐 아니라 Djordjevich & Miller(1980) 및 Hunt등(1985)과 같이 콜레스테롤의 함량을 조절하여 막의 유연도(fluidity)를 조절하는 방법이 적용될 수 있고, Arakawa & Kondo(1980) 및 Davis등(1982)과 같이 microcapsule을 만드는 방법도 가능하다.

또한 최근에는 의공학분야에서 체내에서 처리될 수 있는 (biodegradable)막의 개발을 서두르고 있기 때문에 리포솜 보다도 단단하면서 일정시간 후에 체내에서 대사가 가능한 막이 개발되면 여기에 헤모그로빈을 내장시킨 hemosome을 만들 수 있을 것으로 보아 대용혈액의 실용화가 곧 이루어지리라 본다. 제조방법에 있어서도 헤모그로빈이 쉽게 메트헤모그로빈으로 변하여 불활성화되는 것을 방지하기 위하여 octylglucoside등 detergent를 사용하는 방법(Jopski et al, 1989)이 소개되었고 조직으로 효과적인 산소이동을 위하여 헤모그로빈에 NFPLP를 crosslink시킨 HbNFPLP(Van der Plas et al, 1988)과 PLP-헤모그로빈(McGarrity et al, 1987) 등이 보고되었다. 또 한편으로는 perfluorochemicals 등과 같이 산소를 직접 운반할 수 있는 화학물질의 개발도 꾸준히 연구되고 있다(Segel & Ensunsa, 1988; Tuliani et al, 1988).

최근에는 인체혈액의 헤모그로빈 대신 소의 혈액에서 정제한 헤모그로빈을 사용하여 인공혈액을 제조하는 방법이 미국의 바이오퓨어사에 의하여 개발되고 있음으로(의학신문, 1990. 3. 1)이 방법을 이용하여 소의 헤모그로빈으로 hemosome을 만들면 대용혈액의 장래는 대단히 밝다고 볼 수 있다.

## 결 론

인체혈액으로부터 정제한 혈색소와 달걀노른자로부터 추출한 인지질로 인공혈구 즉, Hemosome을 만들고 형태와 기능을 조사하였다. Hemosome의 형태를 위상차 현미경으로 관찰하고 그 사진을 영상분석기(image analyzer)로 분석하였으며, 산소포화도를 측정하기 위하여 각 산소분압하에서 평형시킨 후 혈액기체 분석기(blood gas analyzer)로 분석하여 산소포화도 곡선을 제도하였다.

Hemosome의 혈액대용효과를 보기 위하여 쥐로부터 전혈액의 1/3을 사혈시킨 후 동량의 hemosome을 주입한 후 생존율에 미치는 효과를 측정하였다.

실험결과를 요약하면 다음과 같다.

1) Hemosome의 크기는 평균직경이  $0.749 \pm 0.491 \mu\text{m}$ 이었고 여러형태의 hemosome이 혼재해 있었으나, 97.5%는  $2 \mu\text{m}$  범위내에 속하였다. 면적은  $0.412 \pm 1.072 \mu\text{m}^2$ 였고, 둘레는  $2.219 \pm 1.579 \mu\text{m}$ 였으며, 구형(shape)의 크기는  $1.336 \pm 0.185 \mu\text{m}$ 였다.

2) Hemosome의 산소포화도 곡선은 정상혈액의 적혈구와 같이 S자형을 보였으며  $P_{50}$ 은 약 24 mmHg였다.

3) 쥐의 혈액의 1/3을 사혈시키고 생리적 식염수만 투여한 군비에 비하여 hemosome을 투여한 군에서는 생존율이 현저히 증가되었다.

이상의 실험결과로 보아 hemosome은 혈액대용효과가 있는 것으로 보이며, 고찰에서 논한 몇가지 문제점만 보완하면 실용이 가능할 것으로 보인다.

## REFERENCES

- Arakawa M & Kondo T (1980). Preparation and properties of poly ( $N^{\alpha}$ ,  $N^{\epsilon}$ -L-lysinediylterephthaloyl) microcapsules containing hemolysate in the nanometer range. *Can J Physiol Pharmacol* 58, 183-187
- Bartlett GR (1959). Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 234, 466-468
- Bligh EG & Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad J Biochem Physiol* 37, 911-917
- Davis TA, Asher WJ & Wallace HW (1982). Artificial red cells with polyhemoglobin membranes prepared by liquid membrane techniques. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 28, 404-407
- De Venuto F, Zuck TF, LTC, MC, Zegna AI & Moores WY, MAJ, MC (1977). Characteristics of stroma-free hemoglobin prepared by crystallization. *J Lab Clin Invest* 89(3), 509-516
- Djordjevich L & Miller IF (1980). Synthetic erythrocytes from lipid encapsulated hemoglobin. *Exp Hemat* 8, 584-592
- Farmer MC & Gaber BP (1987). Liposome-encapsulated hemoglobin as an artificial oxygen carrying system. *Methods Enzymol* 149, 185-200
- Gaber BP, Yager P, Sheridan JP & Chang EL (1983). Encapsulation of hemoglobin in phospholipid vesicles. *FEBS Lett* 153(2), 285-288
- Hah JS, Hui SW & Jung CY (1983). Effects of physical states of phospholipids on the incorporation and cytochalasin B binding activity of human erythrocyte membrane proteins in reconstituted vesicles. *Biochemistry* 22, 4763-4769
- Hamilton PB, Farr LE & Hiller A (1947). Preparation of hemoglobin solutions for intravenous infusion. *J Exp Med* 86, 455-463
- Hamilton AG, Parkins W & Walzer F (1947). A comparison of ten infusion fluids in the treatment of moderate and severe hemorrhage in animals. *Am J Physiol* 150, 641-653
- Hui SW (1989). Preparation and purification of egg yolk phospholipid. Personal communication. See appendix
- Hunt CA, Burnette RR, MacGregor RD, Strubbe AE, Lau DT, Taylor N & Kawada H (1985). Synthesis and evaluation of a prototypal artificial red cell. *Science* 230, 1165-1168
- Jopski B, Pirkl V, Jarone H-W, Schubert R & Schmidt K-H (1989). Preparation of hemoglobin-containing liposomes using octyl glucoside and octyltetraoxyethylene. *Biochem Biophys Acta* 978, 79-84
- Krone W, Hutner WB, Kampf SC, Rittich B, Seitz HJ & Tarnowski W (1974). Long-term perfusion of the isolated rat liver. Maintenance of its functional state by use of a fluorocarbon emulsion. *Biochem Biophys Acta* 372, 55-71
- Lowe KC (1987). Perfluorocarbon as oxygen-transport fluids. *Comp Biochem Physiol* 87(4), 825-838
- McGarrity MJ, Er SS & Hsia JC (1987). Hemoglobin based blood substitutes: Characterization of five pyridoxal 5'-phosphate derivatives of hemoglobin. *J Chromat* 419, 37-50
- Miller IF (1978). Synthetic blood substitutes: Where are we and where do we go from here? *CRC Crit Rev Bioengr* 3, 149-179
- Naito R & Yokoyama K (1978). An improved perfluorodecalin emulsion. In: Jamieson GA & Greenwalt TJ

- (eds) *Blood substitutes and plasma expanders*. Liss, New York, p 81-84
- Rabiner SF, Helbert JR, Lopes H & Friedman LH (1967). Evaluation of a stroma-free hemoglobin solution for use as a plasma expander. *J Exp Med* 126, 1127-1142
- Rabiner SF, O'Brien K, Peskin GW & Friedman LH (1970). Further studies with stroma-free hemoglobin solution. *Ann Surg* 171, 615-622
- Savitsky JP, Doczi J, Black J & Arnold JD (1978). A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. *Clin Pharmacol Ther* 23, 73-80
- Segel LD & Ensunsa JL (1988). Albumin improves stability and longevity of perfluorochemical-perfused hearts. *Am J Physiol* 254, H1105-H1112
- Skipiski VP, Peterson RF & Barclay M (1964). Quantitative analysis of phospholipids by thin layer chromatography. *Biochem J* 90, 374-378
- Sloviter HA (1975). Perfluoro compounds as artificial erythrocytes. *Fed Proc* 34, 1484-1487
- Szebeni J, Winterbourn CC & Carrell RW (1984). Oxidative interactions between hemoglobin and membrane lipid: A liposome model. *Biochem J* 220, 685-692
- Szebeni J, Di Iorio EE, Hauser H & Winterhalter KH (1985). Encapsulation of hemoglobin in phospholipid liposomes: Characterization and stability. *Biochemistry* 24, 2827-2832
- Szoka F & Papahadjopoulos D (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 75, 4194-4198
- Tuliani VV, O'Rea EA, Jung BM & Sierra BD (1988). Interaction between erythrocytes and a perfluorochemical blood substitute. *J Biomed Mater Res* 22, 45-61
- Van der Plas J, Rossen V-V, Koorevaar JJ, Zijlstra WG & Bakker JC (1988). Purification and physical characteristics of a hemoglobin solution modified by coupling to 2-nor-2-formylpyridoxal 5'-phosphate (NFPLP). *Transfusion* 28, 525-530
- Ways P & Hanahan DJ (1964). Characterization and quantification of red cell lipids in normal man. *J Lipid Res* 5, 318-328
- 김기홍(1978). 각국의 혈액공급체제와 우리나라의 현황. *대한의학협회지* 21, 257-262
- 하종식(1988). 혈구수와 혈액소 농도 측정. *생리학실습*, 신광출판사 pp 94-98

## Appendix I

### Preparation of Crude egg yolk phospholipids

by Dr. S.W. Hui (RPMI, Buffalo, NY, USA)

1. Separate egg yolks from whites.
2. 12 egg yolks + 600 ml acetone.
3. Homogenize in Waring Blender medium speed, 30 seconds and leave at room temperature for 10 min.
4. Centrifuge at top speed (2~3000 rpm) for 10 min., 5°C. Discard supernatant. (Don't expose the precipitate to air. Follow next step immediately.)
5. Extract precipitate with 1000 ml chloroform/methanol (1/1) mixture. Stir at room temp. for 15 min. Filter through fast coarse filter paper. (Paper is c/m extracted) Don't let precipitate on paper to dry. Extract the whole precipitate again by transferring paper and precipitate to c/m (1/1). (1000 ml in 2 liter beaker). Filter again as above. Save filtrates.
6. Weigh an empty 2000 ml round bottom flask + stopper. Combine extracts (filtrates) and evaporate to a damp mass in the round bottom flask.

7. Add approx. 50~100 ml petroleum ether (60°~80° boiling point) until it dissolves. Then add 500 ml acetone slowly with stirring, while precipitate forms. Leave on ice for 2 hours.
8. Decant supernatant. Wash precipitate with the aid of stirring rod three times with ice-cold acetone, approx. 200 ml each time. (Let precipitate settle between washes).
9. Dry the washed precipitate in evaporator and weigh flask + stopper + precipitate (under nitrogen). Dissolve in chloroform 100~200 ml.
10. Transfer to a volumetric flask. Take sample for phosphate determination (1 ml in 10 ml flask + chloroform) and keep the rest under nitrogen in deep freezer. Usual yield: 18 g dry weight or 0.7 g of phosphorus. Contains mainly; lecithin (phosphatidylcholine-PC) cephalin (phosphatidylethanolamine-PE).

## Appendix II

### Purification of both PE and PC from crude egg-yolk phospholipids

by Dr. S.W. Hui (RPMI, Buffalo, NY, USA)

1. Activate silicic acid (S.A.) at 110°C for 3~4 hours. Cool in dessicator.
2. Suspend 400 g of S.A. in 2 liter of c/m (2/1). Decant or suck-off the fine particles. Resuspend and repeat two times with 1 liter of c/m (6/1). Washed S.A. is resuspended in 1 liter of c/m (6/1) and the column packed as described for alumina\*.
3. Crude egg yolk phospholipid is applied on the column in small volume of c/m (6/1), details as for alumina. Elution is continued with c/m (6/1). Loading factor 1 mg of phosphorus/gram of S.A. (25 mg phospholipid/g) or 400 mg of phosphate extracted from 12 eggs on 400 g of S.A.
4. The elution of phospholipids is followed by spotting on thin layer plates, and charring with sulfuric acid. If the flow rate is too slow apply nitrogen pressure. Flow rate should be 2~3 ml/min. Collect approx 20 ml/tube.
5. The main PE fraction appears between 900 ml and 1250 ml. The PE tail continues for another 1000 ml.
6. Collect fraction containing PE, (mix in two lots, main peak and tail), evaporate to dryness on rotary evaporator (30 C). Dissolve dry PE in chloroform and transfer in volumetric flask with ground glass stopper. Keep under nitrogen in deep freezer (in 100 ml chloroform).
7. When the main PE peak is eluted (after approx. 1250 ml), change solvent to c/m (3/2) and wait for the appearance of PC (Lecithin) peak. Follow peak as before by spotting on thin layer plates.
8. The main peak of PC (free of ninhydrin reacting material) appeared at 3200 ml and continued for another 1000 ml.
9. Collect fractions containing PC, evaporate to dryness and dissolve in 100 ml of chloroform.

\*All solvents are equilibrated with Nitrogen by bubbling immediately before use.