

# Hemosome 과 PFC 유화액을 이용한 기체교환효율의 향상

## Increase of Gas Exchange Using Hemosome and PFC Emulsion

\*#김기범<sup>1,6,7</sup>, 정우석<sup>2,7</sup>, 이문영<sup>1,6</sup>, 전선희<sup>1,6,7</sup>, 미자누르라만<sup>1,6</sup>, 박혜민<sup>1,6</sup>, 강형섭<sup>1,6,7</sup>, 김진상<sup>1,6</sup>  
김성중<sup>3</sup>, 김민호<sup>4</sup>, 홍철운<sup>5,7</sup>

\*#G. B. Kim(kgb70@chonbuk.ac.kr)<sup>1,6,7</sup>, W. S. Chong<sup>2</sup>, H. S. Kang<sup>1,6,7</sup>, J. S. Kim<sup>1,6</sup>, S. J. Kim<sup>3</sup>, M. H. Kim<sup>4</sup>, C. U. Hong<sup>5,7</sup>  
<sup>1</sup>전북대학교 수의학과, <sup>2</sup>전북대학교 의용생체공학과, <sup>3</sup>전북대학교 화학공학부, <sup>4</sup>전북대학교 의학전문대학원  
<sup>5</sup>전북대학교 바이오메디컬공학부, <sup>6</sup>전북대학교 BK21 질환동물모델사업팀, <sup>7</sup>전북대학교 헬스케어사업단

Key words : Healthcare Indoor Bicycle, limbs training, Respiration gas

### 1. 서론

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 문제의 폐에 부분적인 호흡보조장치로 유용한 연구 연구대상이다[1,2]. 그러나 혈관 내 폐 보조장치는 혈액의 흐름을 제한하지 않고 정맥에서 적절한 교환면적을 제공해야하는데 이를 위해서는 긴 길이(50-60 cm)와 작은 내경(200-250 μm)의 중공사가 사용되며, 삽입개수(1,000 개 이하)의 한계를 갖는다. 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.

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[3,4]. 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 요법을 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 microencapsulation 한 hemosome 을 제조하여 그 특성을 평가하였다.

### 2. 실험방법

Perfluorocarbon(PFC) 유화액을 제조하기 위하여 perfluorodecalin 은 ICI chemical 의 pletec-pp5 를 사용하였고 perfluorotripropylamine 은 Dainippon Ink and Chemical 의 1 급 시약을 그대로 사용하여 7:3 의 비율로 혼합한 혼합액을 사용하였다. 또한 polyoxyethylene- polyoxypropylene 유화제로 미국 Wyandotte Chemical 사의 pluronic F-68 을 사용하였다. 글리세롤은 유화 보조제로 사용되며, Showa Chemical 사의 1 급 시약을 15 mmHg 로 감압 증류하여 사용하였다. PFC 화합물을 유화시키기 위하여 우선 고속 멸균기(IKA Works, Malaysia)를 사용하여 9500 rpm 으로 30 분간 강하게 교반하여 굵은 입자의 유화액을 만들었다. 제조된 유화액은 30 분 이상 방치하여 층 분리가 일어나지 않을 때까지 수회 반복하여 안정된 유화조건을 형성하였다. 이후 ultrasonicator 의 출력력을 변화시키면서 입자를 미립화 하였으며 입도분석기(Shimadzu SALD-2001)를 사용하여 유화된 PFC 의 평균 입자의 크기와 입도분포를 분석하였다.

헤모글로빈 0.5 g 을 증류수 100 ml 에 녹이고 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) cardodimide (EDC)를 Hb:EDC(1:10, mol/mol)의 비율로 첨가하여 교반하여 용해시켰다. 헤모글로빈이 완전히 용해되면 용액에 적정량의 아세트산을 첨가하여 가교된 헤모글로빈을 석출하였다. 잔류된 우레아기와 EDC 는 증류수로 수회 세척하여 제거하였다. 세척된 헤모글로빈은 냉동 건조하여 순수한 가교 헤모글로빈을 얻었다.

Hemosome 의 제조는 Szebeni[12,13]의 방법을 이용하였다. 달걀에서 추출한 인지질에 α-tocopherol 을 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°C 에서 10 분간 회전시키면서 hemosome vesicle 이 형성된다. 이렇게 형성된 hemosome vesicle 을 인지질 박막이 형성된 다른 둥근 플라스크에 옮겨서 같은 방법으로 남아있는 자유 헤모글로빈을 encapsulating 시켰다. 이렇게 제조된 hemosome 은 생리적 식염수로 수회 세척하여 직경 1 μm 의 여과지로 여과한 후 실험에 사용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

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

의하여 200 nm 에서 600 nm 사이의 입도 분포를 유지해야 한다[5]. 본 실험의 결과는 250 ~ 550 nm 의 입도분포를 나타내었으며 평균입자크기는 475 nm 를 나타내었다. 이와 같은 분포는 일반적으로 대용 혈액으로 사용이 인정된 입도 범위이고 고른 입도와 점도를 유지하며, 안정된 유화특성을 보였으므로 혈관 내 폐 보조장치에 대용 혈액으로 적용이 가능하였다.

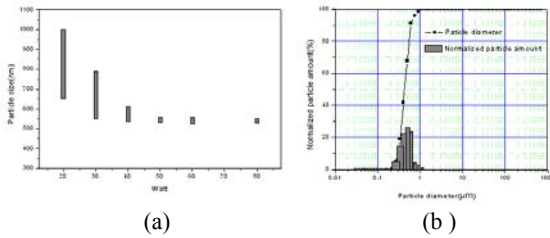


Fig. 1 Ultrasonification for particle size at variable watt  
(a) Ultrasonification for particle size of Fluosol-DA 20% at variable watt (b) Normalized particle amount(%) and particle size( $\mu$  m) of PFC emulsion at 50 watt

Fig. 2 는 헤모글로빈의 안정성 측정을 위하여 Hb(Sigma) 을 PBS 로 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 nm 에서 특성피크를 보이는데 이중 산소를 운반할 수 있는 상태인  $Fe^{2+}$  이온의 피크는 535 nm 와 573 nm 의 피크이고, 이미 산소에 의하여 산화된 met-Hb 의  $Fe^{3+}$  이온의 피크는 626 nm 의 피크이다. 또한 그림은 헤모글로빈을 정상인의 체온인 36.5°C 에서 방치한 후 시간에 경과에 따른 헤모글로빈의 변화 특성을 나타내기도 한다. 그림은 6 시간 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 산소 전달 능력을 향상시킬 수 없다고 판단된다. 이와 같은 문제를 해결하기 위하여 헤모글로빈을 EDC 로 가교결합을 시켜 산소전능력을 갖도록 하였다.

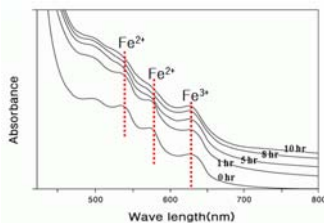


Fig. 2 Oxidation of heme iron(Fe) with time

Fig. 3 은 산소 이동능력을 알 수 있는 산소 포화도를 나타낸 그림이다. 그림에서 정상 적혈구의 포화곡선은 S 자 형태를 나타내고 있다. 그 이유는 혈액의 경우 헤모글로빈의 Fe 원자의 배위결합 되어있어 산소포화곡선은 S 자 형태를 유지하며  $P_{50}$  은 24.0 mmHg 이었다. 제조한 hemosome 의 경우 정상 혈액과 유사한 S 자 형태의 포화도를 보여주기 때문에 정상혈액과 유사한 산소 이동능력을 보여준다고 판단된다. Hemosome 과 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. 그러나 PFC 유화액의 산소 포화도는 1 차 함수형태를 유지하였다. 실험결과 PFC

유화액의 산소 포화도는 hemosome 의 산소 포화도보다 낮게 나타났다. 그러나 혼합액에서의 산소포화도는 유사한 경향을 보였으나, 혈액에 hemosome 을 혼합한 혼합액의 산소 포화도는 PFC 유화액을 혼합한 혼합액보다 더 높은 산소 포화도를 보였다. 그 이유는 hemosome 의 산소포화도가 PFC 유화액보다 더 높기 때문에 이와 같은 결과를 얻게 되었다.

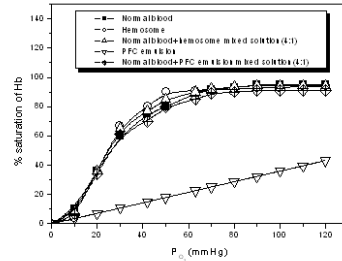


Fig. 3 Oxygen dissociation curve of various solutions.

4. 결론

본 연구는 PFC 유화액과 높은 산소 전달능력이 있으며 혈액과 유사한 산소 포화도를 갖는 헤모글로빈을 계란의 인지질로 microencapsulation 한 hemosome 을 제조하여 그 특성을 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. Fluosol-DA 를 sonication 하여(출력 50 watt) 평균입자크기가 437 nm 인 안정성 있는 유화액을 제조할 수 있었으며, glycerol 의 농도를 어느 정도 증가시킴으로써 유화시간 시간을 줄이고 안정도를 높일 수 있었다. Hemosome 의 산소 포화도 곡선은 정상혈액의 적혈구와 같이 S 자형을 보였으며  $P_{50}$  은 24 mmHg 이었다. 그러나 PFC 유화액의 산소 포화도는 1 차 함수형태를 유지하였다. Hemosome 과 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 hemosome 과 PFC 유화액을 혈액과 혼합하여 사용한다면 대용혈액으로 사용 가능하다고 판단된다.

후기

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

참고문헌

- 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.
- Kim, G. B., Hong, C. U., and Kwon, T. K., "Design of an intravenous oxygenstor", J. Artif. Organs, **9**, 34-41, 2006.
- Winslow, R. M. "Hemoglobin-Basac Red Cell Substitutes", The Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA, 1992.
- Ivanitsky, G. R., and Vorobyev, S. I., "Perftoran Blood Substitute with Gas-Transporting Function", Product Monograph; Perftoran Co., Pushchino, Russia, 1997.
- 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.