

**ERITROCITI KAO SAVREMENI NOSAČI LEKOVITIH SUPSTANCI:
TRENUTNI STATUS, IZAZOVI I IZGLEDI ZA PRIMENU U MEDICINI**

**ERYTHROCYTES AS A NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEMS:
CURRENT STATUS, CHALLENGES
AND PERSPECTIVES OF MEDICAL APPLICATIONS**

Kostić T. Ivana ⁽¹⁾, Vesna Lj. Ilić ⁽²⁾, Branko M. Bugarski ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra za hemijsko inženjerstvo, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, Beograd, Srbija

⁽²⁾ Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu, Dr Subotića 4, Beograd, Srbija

Correspondence to:

Ivana Kostić, MSc in Pharmacy,
Research Assistant, Faculty of Technology and Metallurgy,
University of Belgrade, Serbia,
tel:+ 381 11 33 70 472,
faks: + 381 11 33 70 387
064/1294664
e-mail: ikostic@tmf.bg.ac.rs.

Apstrakt

Eritrociti predstavljaju najzastupljenije ćelijske komponente krvi (>99%) kod ljudi. Pored dobro poznatih fizioloških funkcija koje vrše, oni predstavljaju i prirodne kompartmane krvi koje učestvuju u biodistribuciji, metabolizmu i delovanju određenih lekovitih supstanci. S druge strane, eritrociti poseduju ogroman potencijal kao nosači za kontrolisanu i ciljanu isporuku različitih bioaktivnih jedinjenja, uključujući i peptide i genetički materijal.

Produženi životni vek u cirkulaciji, dostupnost, visoka biokompatibilnost i prirodni mehanizmi za bezbednu eliminaciju, kao i značajno smanjenje fluktuacije koncentracije lekovite supstance u plazmi, čine jedinstvene prednosti eritrocita kao nosača lekovitih supstanci u poređenju sa konvencionalnim načinima administracije lekova.

Ovaj kratki pregled ističe najznačajnije eksperimentalne rezultate i izgleda za primenu eritrocita kao savremenih nosača lekovitih supstanci u medicini.

Ključne reči: eritrociti; nosači lekovitih supstanci; intravaskularno dejstvo; ciljanje organa RES

Uvod

Do danas je pokazano da eritrociti učestvuju u raspodeli i metabolizmu više od 50 biološki aktivnih supstanci (npr. kaptopril, haloperidol, heroin, testosteron, insulin, kateholamini, penicilamin, daunorubicin) ^[1]. Eritrociti tako, mogu nenamerno poslužiti kao prirodni kompartmani krvi koji učestvuju u farmakokinetici, biodistribuciji, sporom otpuštanju, metabolizmu i delovanju različitih lekovitih supstanci. Ipak, namerna upotreba eritrocita kao nosača za isporuku biološki aktivnih supstanci je od znatno većeg interesa. Ta oblast istraživanja je nastala ranih sedamdesetih godina XX veka, kada je pretpostavljeno da se dejstvo pojedinih lekova može poboljšati inkapsulacijom u autologe ili imunološki kompatibilne donorske eritrocite, koji bi nakon bezbednog injektiranja u domaćina omogućili dejstvo lekovite supstance na tačno određenom mestu u organizmu i tokom produženog vremenskog perioda ^[2]. Činjenica da je nekoliko protokola infuzije lekova inkapsuliranih u eritrocite trenutno u ispitivanju na ljudima, govori u prilog izuzetnom biomedicinskom značaju ove oblasti istraživanja ^[3].

Eritrociti kao nosači biološki aktivnih supstanci: prednosti i mane

Prve eksperimentalne korake u inkapsulaciji neke supstance u eritrocite napravio je 1953. godine Gardos ^[4] koristeći kao model supstancu ATP. Marsden i Ostling ^[5] su 1959. godine izvršili inkapsulaciju dekstrana molekulske mase od 10 do 250 kDa u eritrocitne duhove. Četrnaest godina kasnije, prva ispitivanja inkapsulacije lekovite supstance u cilju produžene vaskularne isporuke uradili su nezavisno jedan od drugog Ihler ^[2] i Zimmerman ^[6], a termin eritrocit nosač je 1979. godine prvi put upotrebljen da označi eritrocit sa inkapsuliranom lekovitom supstancom ^[7]. Kako ideja o sistemima za produženu isporuku biološki aktivnih supstanci sa ciljanom specifičnošću već decenijama fascinira naučne krugove, za eritrocite se može reći ne samo da su izuzetno atraktivni, već posmatrano sa pojedinih aspekata čak i jedinstveni nosači za isporuku biološki aktivnih supstanci. Životni vek eritrocita, od 100 do 120 dana kod ljudi, izraženo nadmašuju druge sisteme za isporuku aktivnih supstanci, npr. "nevidljive" liposome modifikovane polietilenglikolom (PEG), čiji je prečnik <100 nm, a životni vek <10 h. Takođe, eritrociti predstavljaju atraktivne nosače za intravaskularnu isporuku lekovitih supstanci jer je u njihovom slučaju znatno ograničena neželjena ekstravazacija ^[3].

Pored dugog vremena poluživota i ograničene ekstravazacije, druge prednosti eritrocita kao sistema za isporuku biološki aktivnih supstanci bi bile sledeće ^[3,8,9]: visok nivo biokompatibilnosti, naročito ako se za inkapsulaciju koriste autologi eritrociti čime se isključuje mogućnost neželjenog aktiviranja imunskog sistema; potpuna biodegradabilnost i činjenica da njihovom razgradnjom ne nastaju toksični produkti; izbegavanje neželjenog imunskog odgovora na inkapsuliranu biološki aktivnu supstancu; poželjan opseg veličine i relativno uniformna veličina i oblik; svojstvo neometane cirkulacije kroz organizam; sprečavanje degradacije inkapsulirane aktivne supstance endogenim faktorima; modifikovanje farmakokinetičkih i farmakodinamičkih parametara lekovitih supstanci; značajno smanjenje fluktuacija koncentracije lekovite supstance u plazmi u poređenju sa

konvencionalnim načinima administracije lekova; značajno povećanje intervala između uzimanja leka jer lekovi ostaju terapijski aktivni u dužem vremenskom periodu; mogućnost smanjenja sporednih efekata lekova; zaštita organizma od toksičnih efekata lekovitih supstanci (od npr. antineoplastika); sposobnost prelaska u organe retikuloendotelnog sistema (RES) i ciljane isporuke lekovite supstance u ove organe.

Primena eritrocita kao nosača biološki aktivnih supstanci pokazuje i pojedine nedostatke [3,8,10]. Glavni problem predstavlja njihovo *in vivo* uklanjanje od strane organa RES-a usled određenih oštećenja na membrani ili u unutrašnjem sadržaju eritrocita (npr. deplecije eritrocitnih sistema za skladištenje i korišćenje energije, sistema za transport azot oksida i metabolizam) koja se javljaju tokom procesa inkapsulacije. Ta pojava, ozbiljno limitira životni vek eritrocita nosača u cirkulaciji i u nekim slučajevima može prouzrokovati toksikološke probleme. Kako makrofage RES-a i drugi profesionalni fagociti eliminišu ostarele i oštećene eritrocite, tako je izuzetno teško izbeći preuzimanje i eritrocita nosača od strane fagocita i omogućiti da inkapsulirana supstanca deluje samo unutar lumena vaskularnog sistema. U cilju izbegavanja navedenih problema, najveći naponi su uloženi u ispitivanje mehanizma biokompatibilnosti eritrocita, njihovog oštećenja pri procesu inkapsulacije i načina čuvanja [11]. S druge strane, fagocitoza eritrocita nenamerno modifikovanih tokom procesa inkapsulacije lekovite supstance, može poslužiti i kao prirodni put isporuke agenasa u makrofage RES-a, što u smislu ciljane isporuke lekova danas dobija sve veći značaj i eksperimentalne potvrde.

Inkapsulirani eritrociti, kao nosači biološkog porekla, mogu pokazivati neke inherentne varijacije u karakteristikama i u procesu inkapsulacije, u poređenju sa drugim sistemima za isporuku aktivnih supstanci. Skladištenje inkapsuliranih eritrocita predstavlja dodatni problem, u cilju čijeg prevazilaženja se danas ispituje čuvanje eritrocita nosača u izotoničnim puferima koji sadrže esencijalne nutrijente, kao i na niskoj temperaturi, uz

dodatak nukleozida ili helatora, primena liofilizacije sa glicerolom ili gel imobilizacije. Kao otežavajuće faktore u radu sa eritrocitima kao nosačima lekova, važno je istaći i uvek postojeću mogućnost kontaminacije u zavisnosti od porekla krvi, neophodnost posebne opreme i okruženja za izvođenje procesa inkapsulacije i rigorozne kontrole u procedurama prikupljanja i rukovanja sa uzorcima eritrocitima.

Uzimajući u obzir sve navedene prednosti i mane, eritrociti mogu da služe kao optimalna vrsta nosača za lekovite supstance koje treba da ispolje farmakološko dejstvo u vaskularnom sistemu ili koje treba da budu isporučene u ćelije koje uklanjaju prestarele eritrocite iz cirkulacije. U poslednje tri decenije, značajni istraživački napor se ulažu kako bi se dokazala ispravnost ove paradigme i uspostavila klinički primenjiva strategija za isporuku lekovitih supstanci korišćenjem eritrocita kao nosača.

Eritrocitima posredovana isporuka biološki aktivnih supstanci: intravaskularno dejstvo i ciljanje makrofaga i drugih tipova ćelija

Iz krajnje pojednostavljene praktične tačke gledišta, za eritrocite se može reći da liče na trajne putne torbe od elastičnog materijala koje je stvorila majka priroda ^[3]. Ovakvim slikovitim prikazom može se objasniti zašto su prvi koraci u ispitivanju eritrocita kao nosača biološki aktivnih supstanci, napravljeni upravo u cilju obezbeđivanja produženog oslobađanja ovih supstanci u vaskularnom sistemu.

Primeri farmakološki aktivnih supstanci i agenasa za vizuelizaciju, koji se pomoću eritrocita isporučuju u vaskularni sistem, uključuju različite enzime i fluorescentne boje ^[12], eritropoetin za produženu stimulaciju hematopoeze ^[13], hemoglobinski kofaktor inozitol heksafosfat za poboljšanje kapaciteta prenosa kiseonika ^[14], anti-trombocitni heparin ^[15], amikacin za anti-parazitsku terapiju ^[16, 17], insulin ^[18], fluoro-AMP ^[19] i metotreksat za hemoterapiju kancera ^[20], izotope za praćenje rezervi krvi korišćenjem gama-scintigrafije i

magnetne rezonance ^[21], antisens oligonukleotide ^[22], plazmidnu DNK za gensku terapiju ^[23] i nedavno magnetne nanočestice ^[24].

Kako teoretski, minimalno promjenjeni eritrociti mogu imati produženo vreme cirkulacije, prvi koraci u *in vivo* ispitivanju aktivnih supstanci inkapsuliranih u eritrocite izvršeni su na modelima supstanci koje imaju sposobnost degradacije toksičnih jedinjenja. Usled ograničenog kapaciteta inkapsulacije eritrocita, potentni i specifični enzimi su se pokazali kao mnogo efektivniji "teret" za eritrocite od neenzimskih antidota kao što je glutation ^[25]. Tako je, više od deset različitih enzima za detoksikaciju do danas inkapsulirano u eritrocite nosače sa ciljem ispitivanja te hipoteze, uključujući urikazu za eliminaciju mokraćne kiseline ^[26], tiosulfat-cijanid sulfotransferazu (AKA rodanazu) koja prevodi cijanide u manje toksične tiocijanate ^[27], fosfotioesteraze koje antagonizuju organofosfatna jedinjenja, poput otrova paraoksiona ^[28], alkoholnu oksidazu i alkoholnu dehidrogenazu za eliminaciju metanola i drugih toksičnih alkohola ^[29, 30] i L-asparaginazu ^[31]. Derivati pojedinih enzima dobijeni modifikacijom sa polietilenglikolom (PEG-enzimi, delimično maskirani od imunskog sistema) su takođe inkapsulirani u humane, mišje i ovčije eritrocite ^[32].

Drugi pristup primeni eritrocita kao nosača je konjugacija farmakološki aktivnih supstanci na površinu eritrocita preko specifičnih površinskih vezujućih molekula. Tako se za eritrocite može reći da su idealni nosači za trombolitičke agense ^[33] kao što su klinički primenjivi tkivni tip aktivatora plazminogena (tPA) i urokinaze (UPA). Molekuli tPA konjugovani sa eritrocitima zadržavali su se u cirkulaciji deset puta duže nego slobodni tPA ^[34] i kod miševa su pokazali znatno efikasnije ublažavanje simptoma ishemije mozga i moždanog udara ^[35].

Normalne funkcije makrofaga koriste se za ciljanu isporuku raznih supstanci u ove ćelije. Makrofage RES-a fagocitiraju eritrocite koji su nenamerno ili namerno modifikovani

tokom inkapsulacije i to se koristi kao prirodni put isporuke agenasa kojima se eliminišu mikroorganizmi koji se nalaze unutar makrofaga ^[36]. Primer je antivirusni azidotimidin, koji je, ovako isporučen, pokazao jači antivirusni efekat u odnosu na slobodnu lekovitu supstancu kako u ćelijskoj kulturi ^[37] tako i na modelu miša sa HIV infekcijom ^[38]. Slični rezultati dobijeni su i sa drugim antiviruscima inkapsuliranim u eritrocite ^[39, 40], kao i sa antisens agensima koji inhibiraju replikaciju virusa HIV-1 u inficiranim ćelijama ^[41].

Antigen prezentujuća funkcija makrofaga i drugih ćelija imunskog sistema koristi se za isporuku raznih antigena u cilju pojačavanja imunskog odgovora ^[42]. Pri tome eritrociti igraju važnu ulogu i kao adjuvansi, prezentujući višestruke kopije antigena i stimulišući nespecifični imunski odgovor ^[43]. Pomoću eritrocita se u makrofage mogu isporučiti i citokini, interleukini i interferoni i doprineti efikasnijoj stimulaciji imunskog odgovora ^[44].

Posebno važna ispitivanja odnose se na isporučivanje anti-tumorskih lekova pomoću eritrocita. Inkapsulacija ovih lekova u nosače ograničava ispoljavanje njihovog toksičnog efekta u organizmu i poboljšava njihovu isporuku u tumore, preko nekoliko mehanizama, kako specifičnih (npr. preko ciljnih antitela) tako i manje specifičnih (npr. usled efekta povećanja propustljivosti i zadržavanja tipičnog za solidne tumore). Iako lipozomi, linearni polimeri i polimerne micide danas predstavljaju najpopularnije nosače za anti-tumorske lekove, eritrociti kao nosači anti-tumorskih lekova takođe mogu naći primenu u terapiji tumora, obezbeđujući produženu cirkulaciju lekovite supstance. U prilog tome, govore rezultati koji su pokazali da se inkapsulacijom hidrofobnog dekalinijuma u mišje eritrocite obezbeđuje znatno duže vreme poluživota (5-6 dana) u cirkulaciji u poređenju sa PEG-lipozomskom formulacijom (4 sata) ^[45]. Formulacija humanih autologih eritrocita sa inkapsuliranim srodnim antraciklinskim antibiotikom daunorubicinom, pripremljena korišćenjem metodologije koja izbegava umrežavanje membrana eritrocita, je ubrizgana pacijentima sa akutnom leukemijom i pokazano je produženo prisustvo daunorubicina u

plazmi i manji neželjeni efekti nego pri davanju slobodne forme leka ^[46]. Slično je nađeno i kod primene autologih eritrocita sa inkapsuliranim doksorubicinom kod pacijenata sa limfomom ^[47].

Eritrociti su dugo vremena ispitivani kao sredstvo za intracelularnu isporuku genetičkog materijala. Najveći napori u ovoj oblasti su usmereni na isporuku malih oligonukleotida u citoplazmu u cilju interferencije u procesu sinteze proteina. Prvi eksperimenti rađeni su na ćelijskoj kulturi i obezbedili su prva poređenja sa lipozomalnim antisens sistemima ^[48]. Novija ispitivanja su pokazala da peptidna nukleinska kiselina ("peptide nucleic acid", PNA) inkapsulirana u eritrocite može inaktivirati replikaciju virusne RNK u kulturi humanih makrofaga inficiranih virusom HIV ^[41,49]. Ispitivanja na životinjskom modelu, sa eritrocitima koji su nosili DNK plazmida, pokazala su produženu ekspresiju transgena, čak do 3 dana, u mononuklearnim leukocitima krvi ^[22], ali do ekspresije transgena nije dolazilo u organima RES-a. U nedavnim ispitivanjima, eritrociti sa inkapsuliranim antisens nukleotidima su bili opsonizovani u plazmi i vršili isporuku "tereta" u jetru ^[23].

Klinička primena lekovitih supstanci inkapsuliranih u eritrocite

Prva klinička primena eritrocita kao nosača izvršena je u supstitucionoj terapiji enzimima. Beutler i saradnici su prvi ispitali placentarnu glukocerebrozidazu inkapsuliranu u eritrocite za selektivnu isporuku u makrofage ^[50]. Terapija je bila uspešna, ali je pristup kasnije izmenjen primenom modifikovanog rekombinantnog enzima koji je prepoznat od strane receptora za manozu na makrofagima, a eritrociti kao nosači više nisu korišćeni ^[51]. Nasuprot tome, eritrociti se kao pogodni nosači i dalje klinički ispituju u slučaju adenozin deaminaze (ADA) koju je prvi inkapsulirao Bah ^[52]. Ispitivanja na ljudima pokazala su da PEG-ADA inkapsulirana u eritrocite ima duže vreme cirkulacije od native ADA inkapsulirane u eritrocite, ali da obe formulacije ipak imaju relativno kratko vreme poluživota (20 dana u poređenju sa 12 dana respektivno, što je duže od vremena poluživota slobodne

PEG-ADA koje je iznosilo 3 do 6 dana) ^[52]. Kliničke studije koje je sproveda ista istraživačka grupa, a koje su uključivale veoma ograničen broj pacijenata (1 do 2 po studiji), u nedavnoj publikaciji su pokazale da kod pacijenata koji su tokom devet godina bili na terapiji PEG-ADA inkapsuliranom u eritrocite (ukupno primljenih 225 infuzija, jedna na svake 2–3 nedelje) nije zabeležena pojava neželjenih efekata, a da je zapaženo prolazno, ali značajno, poboljšanje broja limfocita, održivi nivo imunoglobulina i ADA aktivnosti u krvi, kao i kliničko poboljšanje ^[53]. Sledeći primer je asparaginaza, enzim koji iz krvi uklanja aminokiselinu asparagin koja je od suštinske važnosti za limfoblastnu proliferaciju. Asparaginaza je uspešno inkapsulirana u eritrocite i evaluirana u pilot kliničkim ispitivanjima u cilju tretmana limfoblastne leukemije ^[54]. Nedavno je i timidin-fosforilaza inkapsulirana u eritrocite i primenjena kod pacijenta sa genetskom deficijencijom ovog enzima u mitohondrijama. Tretman je doveo do poboljšanja biohemijskih rezultata, ali se kliničko stanje pacijenta ipak nije poboljšalo ^[55].

Istraživači sa Univerziteta u Urbinu u Italiji, prvi su uveli u kliničku upotrebu eritrocite kao nosače za produženo otpuštanje deksametazona, analoga glukokortikoida. Rossi i saradnici ^[56] inkapsulirali su u autologe eritrocite deksametazon-21-fosfat kao prolek koji ne difunduje, ali se u prisustvu enzima unutar eritrocita defosforiliše i sporo oslobađa u cirkulaciju kao deksametazon. Farmakokinetička ispitivanja u različitim grupama pacijenata su pokazala da jedna primena autologih eritrocita sa deksametazon-21-fosfatom (8-15mg) može osloboditi količinu deksametazona za najmanje jedan mesec održavanja terapijski relevantne koncentracije leka u plazmi dovoljne da se zasite glukokortikoidni receptori od 80-85% ^[57]. Tokom godina je ista istraživačka grupa ispitala efikasnost i bezbednost ovog tretmana kod bolesnika sa hroničnom opstruktivnom bolesti pluća (HOBP) ^[56], kod pacijenta sa cističnom fibrozom ^[57] i inflamatornim bolestima creva (IBD) ^[58]. U svim slučajevima, kod pacijenata je uočeno poboljšanje bez pojave neželjenih efekata analoga kortikosteroida.

Ovi ohrabrujući rezultati pilot kliničkih ispitivanja nagoveštavaju da će eritrocitima posredovana isporuka antiinflamatornih supstanci naći primenu u terapiji akutnih i hroničnih inflamatornih bolesti.

Zaključak

Eritrociti mogu poslužiti kao nosači brojnih biološki aktivnih supstanci, obezbeđujući kako produženo dejstvo unutar vaskularnog sistema, tako i ciljano dejstvo na organe RES-a.

Dati sažetak najvažnijih eksperimentalnih rezultata pokazuje brojne potencijalne biomedicinske primene eritrocita kao nosača, što ih svrstava u jedinstvene i obećavajuće, ali i dalje nedovoljno razvijene platforme za isporuku lekovitih supstanci i široku primenu u savremenoj terapiji.

Abstract

The erythrocytes are the most abundant cellular components (>99%) of blood in humans. Besides their well known physiological functions, they serve as a natural blood compartment participating in biodistribution, metabolism and action of certain drugs. On the other hand, the erythrocytes possess potential carrier capabilities and can be used for the controlled and targeted delivery of various bioactive compounds, including peptides and genetic materials. The erythrocytes feature some unique advantages compared to other delivery systems, such as high biocompatibility, biodegradability, long life-span, remarkable decrease in concentration fluctuations in steady state in comparison to the conventional methods of drug administration etc. This short review accentuate the most significant experimental results and perspectives of medical applications of novel drug delivery systems based on erythrocytes.

Key words: erythrocytes; carrier; intravascular drug delivery; targeting RES organs

Literatura

1. Hinderling PH: Red Blood Cells : A Neglected Compartment in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Pharmacology*. 1997; 49, 3: 279-295.
2. Ihler GM, Glew RH, Schnure FW: Enzyme loading of erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1973; 70, 9: 2663-2666.
3. Muzykantov VR: Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by Mother Nature. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010; 7, 4: 403-427.
4. Gardos G: Akkumulation de kalium onen durch menschliche Blutkörperchen. *Acta Physiol Acad Sci Hung*. 1953; 6: 191-196.
5. Marsden NVB, Ostling SG; Accumulation of dextran in human red blood cells after hemolysis. *Nature*. 1959; 184: 723-724.
6. Zimmermann U; Jahresbericht der kernforschungsanlage. *Julich GmbH*, 1973, 55–58.
7. Hamidi M, Tajerzadeh H: Carrier erythrocytes: an overview. *Drug Deliv*. 2003; 10, 1: 19–20.
8. Millán CG, Marinero ML, Castañeda AZ, Lanao JM: Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. *J Control Release*. 2004; 95, 1: 27-49.
9. Rossi L, Serafini S, Pierigé F, Antonelli A, Cerasi A, Fraternali A, Chiarantini L, Magnani M: Erythrocyte-based drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2005; 2, 2: 311–322.
10. Hamidi, M, Zarrin, A, Foroozehs M, Mohammadi-Samani S: Applications of carrier erythrocytes in delivery of biopharmaceuticals. *J Control Release*. 2007; 118, 2: 145-160.
11. Jordán JA, Alvarez FJ, Lotero LA, Olmos G, Calleja P, Tejedor MC, Díez JC: Differential induction of macrophage recognition of carrier erythrocytes by treatment with band 3 cross-linkers. *Biotechnol Appl Biochem*. 1998; 27, Pt2: 133–137.
12. Alvarez FJ, Herraes A, Murciano JC, Jordan JA, Diez JC, Tejedor MC: In vivo survival and organ uptake of loaded carrier rat erythrocytes. *J Biochem. (Tokyo)* 1996; 120, 2: 286–291.
13. Garin MI, Lopez RM, Luque J: Pharmacokinetic properties and in-vivo biological activity of recombinant human erythropoietin encapsulated in red blood cells. *Cytokine* 1997; 9, 1: 66–71.
14. Boucher L, Chassaigne M, Ropars C: Internalization and distribution of inositol hexakisphosphate in red blood cells. *Biotechnol Appl Biochem*. 1996; 24, Pt1: 73–78.

15. Eichler HG, Schneider W, Raberger G, Bacher S, Pabinger I: Erythrocytes as carriers for heparin. Preliminary in vitro and animal studies. *Res Exp Med. (Berl)*. 1986; 186, 6: 407–412.
16. Millan CG, Castaneda AZ, Lopez FG, Marinero ML, Lanao JM, Arevalo M: Encapsulation and in vitro evaluation of amikacin-loaded erythrocytes. *Drug Deliv*. 2005; 12, 6: 409–416.
17. Millan GC, Bax BE, Castaneda AZ, Marinero ML, Lanao JM: In vitro studies of amikacin-loaded human carrier erythrocytes. *Transl Res*. 2008; 152, 2: 59–66.
18. Al-Achi A, Greenwood R: Erythrocytes as oral delivery systems for human insulin. *Drug Dev Ind Pharm*. 1998; 24, 1: 67–72.
19. Fraternali A, Rossi L, Magnani M: Encapsulation, metabolism and release of 2-fluoro-ara-AMP from human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1291, 2: 149–154.
20. Flynn G, McHale L, McHale AP: Methotrexate-loaded, photosensitized erythrocytes: a photo-activatable carrier/delivery system for use in cancer therapy. *Cancer Lett*. 1994; 82, 2: 225–229.
21. Johnson KM, Tao JZ, Kennan RP, Gore JC: Gadolinium-bearing red cells as blood pool MRI contrast agents. *Magn Reson Med*. 1998; 40, 1: 133–142.
22. Kim SH, Kim EJ, Hou JH, Kim JM, Choi HG, Shimb CK, Oh YK: Opsonized erythrocyte ghosts for liver-targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotides. *Biomaterials*. 2009; 30, 5: 959–967.
23. Byun HM, Suh D, Yoon H, Kim JM, Choi HG, Kim WK, Ko JJ, Oh YK: Erythrocyte ghost-mediated gene delivery for prolonged and blood-targeted expression. *Gene Ther*. 2004; 11, 5: 492–496.
24. Antonelli A, Sfara C, Mosca L, Manuali E, Magnani M: New biomimetic constructs for improved in vivo circulation of superparamagnetic nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2008; 8, 5: 2270–2278.
25. Fazi A, Mancini U, Piatti E, Accorsi A, Magnani M: Human red blood cells as bioreactors for the inactivation of harmful xenobiotics. *Biotechnol Appl Biochem*. 1991; 14, 1: 60–68.
26. Ihler G, Lantzy A, Purpura J, Glew RH: Enzymatic degradation of uric acid by uricase-loaded human erythrocytes. *J Clin Invest*. 1975; 56, 3: 595–602.
27. Petrikovics I, Pei L, McGuinn WD, Cannon EP, Way JL: Encapsulation of rhodanese and organic thiosulfonates by mouse erythrocytes. *Fundam Appl Toxicol*. 1994; 23, 1: 70–75.
28. Pei L, Petrikovics I, Way JL: Antagonism of the lethal effects of paraoxon by carrier erythrocytes containing phosphotriesterase. *Fundam Appl Toxicol*. 1995; 28, 2: 209–214.

29. Magnani M, Fazi A, Mangani F, Rossi L, Mancini U: Methanol detoxification by enzyme-loaded erythrocytes. *Biotechnol Appl Biochem*. 1993; 18, Pt 3: 217–226.
30. Lizano C, Sanz S, Luque J, Pinilla M: In vitro study of alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase encapsulated into human erythrocytes by an electroporation procedure. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1425, 2: 328–336.
31. Kravtsoff R, Desbois I, Lamagnere JP, Muh JP, Valat C, Chassaing M, Colombat P, Ropars C: Improved pharmacodynamics of L-asparaginase-loaded in human red blood cells. *Eur J Clin Pharmacol*. 1996; 49, 6: 465–470.
32. Hamarat Baysal S, Uslan AH: Encapsulation of PEG-urease/PEG-AlaDH enzyme system in erythrocyte. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2001; 29, 5: 405–412.
33. Yoo JW, Irvine DJ, Discher DE, Mitragotri S: Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 2011; 10, 7: 521–535.
34. Murciano JC, Medinilla S, Eslin D, Atochina E, Cines DB, Muzykantov VR: Prophylactic fibrinolysis through selective dissolution of nascent clots by tPA-carrying erythrocytes. *Nat Biotechnol*. 2003; 21, 8: 891–896.
35. Danielyan K, Ganguly K, Ding BS, Atochin D, Zaitsev S, Murciano JC, Huang PL, Kasner SE, Cines DB, Muzykantov VR: Cerebrovascular thromboprophylaxis in mice by erythrocyte-coupled tissue-type plasminogen activator. *Circulation*. 2008; 118, 14: 1442–1449.
36. Magnani M, Rossi L, Casabianca A, Fraternali A, Schiavano G, Brandi G, Mannello F, Piedimonte G: Red blood cells as advanced drug delivery systems for antiviral nucleoside analogues. *Adv Exp Med Biol*. 1992; 326, 239–245.
37. Magnani M, Casabianca A, Fraternali A, Brandi G, Gessani S, Williams R, Giovine M, Damonte G, De Flora A, Benatti U: Synthesis and targeted delivery of an azidothymidine homodinucleotide conferring protection to macrophages against retroviral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93, 9: 4403–4408.
38. Fraternali A, Casabianca A, Orlandi C, Cerasi A, Chiarantini L, Brandi G, Magnani M: Macrophage protection by addition of glutathione (GSH)-loaded erythrocytes to AZT and DDI in a murine AIDS model. *Antiviral Res*. 2002; 56, 3: 263–272.
39. Rossi L, Serafini S, Cappellacci L, Balestra E, Brandi G, Schiavano GF, Franchetti P, Grifantini M, Perno CF, Magnani M: Erythrocyte-mediated delivery of a new homodinucleotide active against human immunodeficiency virus and herpes simplex virus. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 47, 6: 819–827.
40. Franchetti P, Cappellacci L, Petrelli R, Vita P, Grifantini M, Rossi L, Pierigé F, Serafini S, Magnani M, Balestra E, Perno CF: Inhibition of HIV-1 replication in macrophages by red blood cell-mediated delivery of a heterodinucleotide of lamivudine and tenofovir. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2007; 26, 8-9: 953–957.
41. Fraternali A, Paoletti MF, Casabianca A, Orlandi C, Millo E, Balestra E, Damonte G, Perno CF, Magnani M: Erythrocytes as carriers of antisense PNA addressed against HIV-1 gag-pol transframe domain. *J Drug Target*. 2009; 17, 4: 278–285.

42. Magnani M, Chiarantini L, Vittoria E, Mancini U, Rossi L, Fazi A: Red blood cells as an antigen-delivery system. *Biotechnol Appl Biochem*. 1992; 16, 2: 188–194.
43. Murray AM, Pearson IF, Fairbanks LD, Chalmers RA, Bain MD, Bax BE: The mouse immuneresponse to carrier erythrocyte entrapped antigens. *Vaccine*. 2006; 24, 35-36: 6129–6139.
44. Olmos G, Lotero LA, Tejedor MC, Diez JC: Delivery to macrophages of interleukin 3 loaded in mouse erythrocytes. *Biosci Rep*. 2000; 20, 5: 399–410.
45. Lizano C, Weissig V, Torchilin VP, Sancho P, Garcia-Perez AI, Pinilla M: In vivo biodistribution of erythrocytes and polyethyleneglycol-phosphatidylethanolamine micelles carrying the antitumour agent dequalinium. *Eur J Pharm Biopharm*. 2003; 56, 2: 153–157.
46. Skorokhod OA, Garmeva T, Vitvitsky VM, Isaev VG, Parovichnikova EN, Savchenko VG, Ataullakhanov FI: Pharmacokinetics of erythrocyte-bound daunorubicin in patients with acute leukemia. *Med Sci Monit*. 2004; 10, 4: PI55–PI64.
47. Skorokhod O, Kulikova EV, Galkina NM, Medvedev PV, Zybunova EE, Vitvitsky VM, Pivnik AV, Ataullakhanov FI: Doxorubicin pharmacokinetics in lymphoma patients treated with doxorubicin-loaded erythrocytes. *Haematologica*. 2007; 92, 4: 570–571.
48. Grimaldi S, Lisi A, Pozzi D, Santoro N: Attempts to use liposomes and RBC ghosts as vectors in drug and antisense therapy of virus infection. *Res Virol*. 1997; 148, 2: 177–180.
49. Mangani M, Rossi L, Fraternali A, Bianchi M, Antonelli A, Crinelli R, Chiarantini L. Erythrocyte-mediated delivery of drugs, peptides and modified oligonucleotides. *Gene Ther*. 2002; 9, 11: 749-751.
50. Beutler E, Dale GL, Guinto DE, Kuhl W: Enzyme replacement therapy in Gaucher's disease: preliminary clinical trial of a new enzyme preparation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74, 10: 4620–4623.
51. Beutler E: Enzyme replacement in Gaucher disease. *PloS Med*. 2004; 1, 2: e21.
52. Bax BE, Bain MD, Fairbanks LD, Simmonds HA, Webster AD, Chalmers RA: Carrier erythrocyte entrapped adenosine deaminase therapy in adenosine deaminase deficiency. *Adv Exp Med Biol*. 2000; 486, 47–50.
53. Bax BE, Bain MD, Fairbanks LD, Webster AD, Ind PW, Hershfield MS, Chalmers RA. A 9-yr evaluation of carrier erythrocyte encapsulated adenosine deaminase (ADA) therapy in a patient with adult-type ADA deficiency. *Eur J Haematol*. 2007; 79, 4: 338–348.
54. Kravtsoff R, Colombat PH, Desbois I, Linassier C, Muh JP, Philip T, Blay JY, Gardenbas M, Poumier-Gaschard P, Lamagnere JP, Chassaing M, Ropars C: Tolerance evaluation of L-asparaginase loaded in red blood cells, *Eur J Clin Pharmacol*. 1996; 51, 3-4: 221–225.
55. Moran NF, Bain MD, Muqit MM, Bax BE: Carrier erythrocyte entrapped thymidine phosphorylase therapy for MNGIE. *Neurology*. 2008; 71, 9: 686–688.

56. Rossi L, Serafini S, Cenerini L, Picardi F, Bigi L, Panzani I, Magnani M: Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Biotechnol Appl Biochem*. 2001; 33, Pt 2: 85–89.

57. Rossi L, Castro M, D'Orio F, Damonte G, Serafini S, Bigi L, Panzani I, Novelli G, Dallapiccola B, Panunzi S, Di Carlo P, Bella S, Magnani M: Low doses of dexamethasone constantly delivered by autologous erythrocytes slow the progression of lung disease in cystic fibrosis patients. *Blood Cells Mol Dis*. 2004; 33, 1: 57–63.

58. Castro M, Rossi L, Papadatou B, Bracci F, Knafelz D, Ambrosini MI, Calce A, Serafini S, Isacchi G, D'Orio F, Mambrini G, Magnani M: Long term treatment with autologous red blood cells loaded with dexamethasone 21-phosphate in pediatric patients affected by steroid- dependent chron disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007; 44, 4: 423–426.

Rad je primljen 20.06.2012. Korigovan 29.06.2012. Prihvaćen 06.07.2012.