

WYKORZYSTANIE ERYTROCYTÓW SSAKÓW JAKO PRZENOŚNIKÓW LEKÓW I INNYCH SUBSTANCJI BIOLOGICZNYCH

AGNIESZKA MARCZAK

Katedra Termobiologii, Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska

In order to minimize the side toxic effects of drugs the new delivery systems such as nanospheres, liposomes or monoclonal antibodies are used. Recently, a number of investigators have been focusing their attention on the encapsulation of drugs and other substances within erythrocytes. Erythrocytes appear to be very convenient carriers. They are naturally occurring biodegradable and non-immunogenic potential biocompatible vectors for different bioactive substances, including drugs.

WSTĘP

W chemioterapii poważnym problemem są skutki uboczne stosowanych leków. Niejednokrotnie, zwłaszcza u osób cierpiących na choroby serca lub nerek leki nie mogą być stosowane z uwagi na duże ryzyko śmierci. Leki przeciwnowotworowe skierowane są wprawdzie przeciwko komórkom nowotworowym, ale podawane są głównie w postaci wlewów dożylnych i dopiero z krwią rozprowadzane są po organizmie. Duże ich stężenie występuje więc w osoczu. Podczas przepływu krwi leki działają nie tylko na komórki nowotworowe ale również na wszystkie inne komórki, które spotkają na swej drodze. Stąd wynikają skutki uboczne działania leków.

Aby przeciwdziałać tym niepożądanym działaniom chemioterapii prowadzone są badania, w których poszukuje się nowych analogów leków, które charakteryzowałyby się większą skutecznością w zwalczaniu nowotworów przy jednoczesnym zminimalizowaniu szkodliwych działań dla organizmu. Drugi kierunek badań obejmuje stosowanie różnego rodzaju przenośników leków. Ich zadaniem jest dostarczanie leku do miejsc zmienionych nowotworowo, gdzie następuje stopniowe uwalnianie leku przy jednoczesnym ograniczeniu jego kontaktu z komórkami zdrowymi.

Takiego idealnego przenośnika jeszcze nie ma, ale badania ciągle trwają i skupiają się wokół kilku grup przenośników. Zaliczyć można do nich: niewielkie polimery (Duncan, 2003), przeciwciała monoklonalne, dendrymery (Patri, Majoros & Baker, 2002) oraz najczęściej stosowane liposomy. (Marcucci & Lefoulon, 2004). Liposomy są sztucznie otrzymanymi, mikroskopijnymi pęcherzykami lipidowymi, zbudowanymi z jednej lub wielu koncentrycznie ułożonych dwuwarstw

lipidowych. (Marcucci & Lefoulon, 2004). Mają one jednak pewne wady. Jako czynniki syntetyczne wprowadzane do organizmu są dla niego ciałami obcymi. Są immunogenne oraz szybko wychwytywane z organizmu przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego. Mają ograniczone możliwości w docieraniu do tkanek nie zawierających tego układu. Ponadto krótki okres półtrwania również ogranicza ich stosowanie. Dlatego też w poszukiwaniu bardziej selektywnego przenośnika uwagę skupiono na krwince czerwonej. (Schrijvers, 2003).

ERYTROCYTY – INFORMACJE PODSTAWOWE

Erytrocyty tworzą największą populację komórek krwi i są głównymi przenośnikami tlenu do tkanek i narządów. Zawierają one w dużych ilościach bogatą w jony żelaza hemoglobinę i dzięki temu mogą być łatwo izolowane poprzez wirowanie. Dojrzałe erytrocyty człowieka są pozbawione jądra i mają dwuwklęsły kształt.

Liczba erytrocytów u mężczyzn i kobiet wynosi odpowiednio $5,4 \times 10^6$ i $4,8 \times 10^6$ na μl . Rozwijają się one z macierzystych komórek szpiku (*stem cells*). W procesie dojrzewania tracą jądro, przybierają dwuwklęsły kształt i rozpoczynają produkcję hemoglobiny. U człowieka żyją około 120 ± 20 dni, a następnie ulegają rozpadowi w śledzionie. W ciągu tych 120 dni zachodzą w nich liczne przemiany głównie kataboliczne, które prowadzą do utraty elastyczności komórek. Zmiany te utrudniają poruszanie się krwinek w naczyniach włosowatych co może prowadzić zarówno do lizy w krwioobiegu jak i fagocytozy w układzie siateczkowo-śródbłonkowym (*RES*). W zasadzie potencjalnie wszystkie

komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego mogą niszczyć erytrocyty, ale śledziona najlepiej wykrywa nieprawidłowe erytrocyty i je usuwa. W układzie siateczkowo-śródbłonkowym erytrocyty są atakowane przez enzymy lizosomalne, które powodują uszkodzenia błony komórkowej i degradację hemoglobiny. Choć większa część starych krwinek czerwonych jest usuwana w układzie siateczkowo-śródbłonkowym to około 10% komórek zanika w układzie krążenia a procent ten wyraźnie się zwiększa w niektórych stanach patologicznych (Dąbrowski, 1998; Klinken, 2002).

Erytrocyty stanowią potencjał biokompatybilnych przenośników dla różnych substancji w tym leków i białek. Pierwszy krok do wykorzystania erytrocytów jako przenośników został poczyniony już w latach 70-tych, kiedy to rozpoczęto próby umieszczania leków w tych komórkach, a następnie również enzymów i peptydów. (Spandel & Way, 1997). Obecnie erytrocyty służą do przenoszenia wielu substancji. Tabela 1 przedstawia zestawienie najczęściej stosowanych związków.

Tabela 1. Przykłady substancji umieszczanych w erytrocytach. (Millan, Castaneda, Marinero, & Lanao, 2004).

Leki przeciwnowotworowe	Aktynomycyna D Metotreksat Bleomycyna Adriamycyna Daunomycyna Etopozyd Karboplatyna Idarubicyna
Inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę (ACE)	Enalaprilat
Czynniki antyinfekcyjne	Gentamycyna Metronidazol Primaquine Imizol (Imidokarb dipropionianu)
Antyoksydanty	Chelatory żelaza
Kortykosteroidy	Deksametazon
Enzymy	Dehydrogenaza alkoholowa (ADH) Dehydrogenaza aldehydowa (AIDH) Oksydaza alkoholowa (AlOx) Dehydrogenaza glutamate L-asparaginaza Urykaza Urokinaza Arginaza
Peptydy i białka	Peptydy przeciw HIV Heparyna Interleukina 3

ZALETY I WADY WYKORZYSTYWANIA ERYTROCYTÓW JAKO PRZENOŚNIKÓW

Erytrocyty stosowane w terapiach, głównie przeciwnowotworowych mogą być wykorzystane jako przenośniki dla leków i innych substancji, które mogą dozować lek, powoli uwalniając go wewnątrz organizmu. Drugim celem takiego przenośnika jest skierowanie leku do układu siateczkowsródbłonkowego wątroby, śledziony i szpiku kostnego, w którym następuje rozpad erytrocytów i gdzie może być uwalniana duża ilość zmagazynowanej substancji. (Bax, Bain, Talbot, Parker-Williams & Chalmers, 1999; Millan, Castaneda, Marinero & Lanao, 2004). Właściwość ta może jednak w pewnych przypadkach stanowić także wadę. Uwalnianie bowiem zbyt dużych stężeń związków w układzie siateczkowo-śródbłonkowym może być toksyczne dla układu. Zaletami erytrocytów jest to, że nie są immunogenne. Są to autologiczne komórki – sam chory jest ich dawcą. Krew jest pobierana od pacjenta a następnie po załadowaniu leku erytrocyty ponownie wprowadzane są do krwioobiegu. Mają także długi około 120 dniowy okres półtrwania. (Gothskar, 2004). Po modyfikacjach spowodowanych stosowanymi procedurami okres ten ulega wprawdzie skróceniu ale w porównaniu z kilkugodzinnym okresem półtrwania liposomów jest to czas na tyle długi aby zapewnić powolne uwalnianie leku. Erytrocyty ulegając całkowitej biodegradacji nie są toksyczne dla organizmu. Niewątpliwą zaletą jest łatwość ich pozyskiwania oraz to, że można w nich umieścić duże stężenia potrzebnych związków, jako że objętość krwinki czerwonej wynosi około 85-91 fl (μm^3). (Guyton & Hall, 1996) Substancje zamykane w erytrocytach są chronione przed przedwczesną degradacją i unikają reakcji immunologicznych. To, że leki są zamknięte w erytrocytach znacząco obniża zasięg skutków ubocznych. Jest to szczególnie ważne w odniesieniu do niektórych leków silnie toksycznych takich jak leki przeciwnowotworowe czy antybiotyki aminoglikozydowe. Leki nie tracą swoich właściwości farmakologicznych i toksykologicznych. Dodatkowo erytrocyty mogą dzięki systemowi enzymatycznemu uaktywnić nieaktywne postaci leku zwiększając ich reaktywność a tym samym i skuteczność działania. Pozwalają także na umieszczanie peptydów o wysokiej masie cząsteczkowej (Grimaldi, Lisi, Gozzi & Santoro, 1997; Magnani, Rossi, Fraternali, Bianchi, Antonelli, Crinelli & Chiarantini, 2002; Hamidi & Tajerzadeh, 2003; Gasparini, Chiarantini, Kirch & DeLoach, 1992; Bax, Bain, Talbot, Parker-Williams & Chalmers, 1999).

Jednym z problemów ograniczających użycie erytrocytów jako przenośników związków jest szybkie wydostawanie się niektórych substancji z komórek, które mają dobrze rozwinięty system detoksykacyjny. Ponadto niektóre cząsteczki mogą zmieniać właściwości

fizjologiczne erytrocytów co może powodować skrócenie ich życia. Ze względu na to, że erytrocyty są pochodzenia biologicznego, mogą wykazywać większe zróżnicowanie osobnicze, niż sztucznie zbudowane przenośniki oraz mniejsze ujednoczenie w porównaniu z innymi systemami. Również przechowywanie takich załadowanych lekiem erytrocytów stanowi problem. (Jain & Jain, 1997; Moss, Tebbs, Farouqi, Herbst, Isaac, Brown & Elliott, 2000; Valbonesi, Bruni, Florio, Zanella & Bunkens, 2001; Ugai, Ugai & Fuse, 2001).

METODY UMIESZCZANIA SUBSTANCJI W ERYTROCYTACH

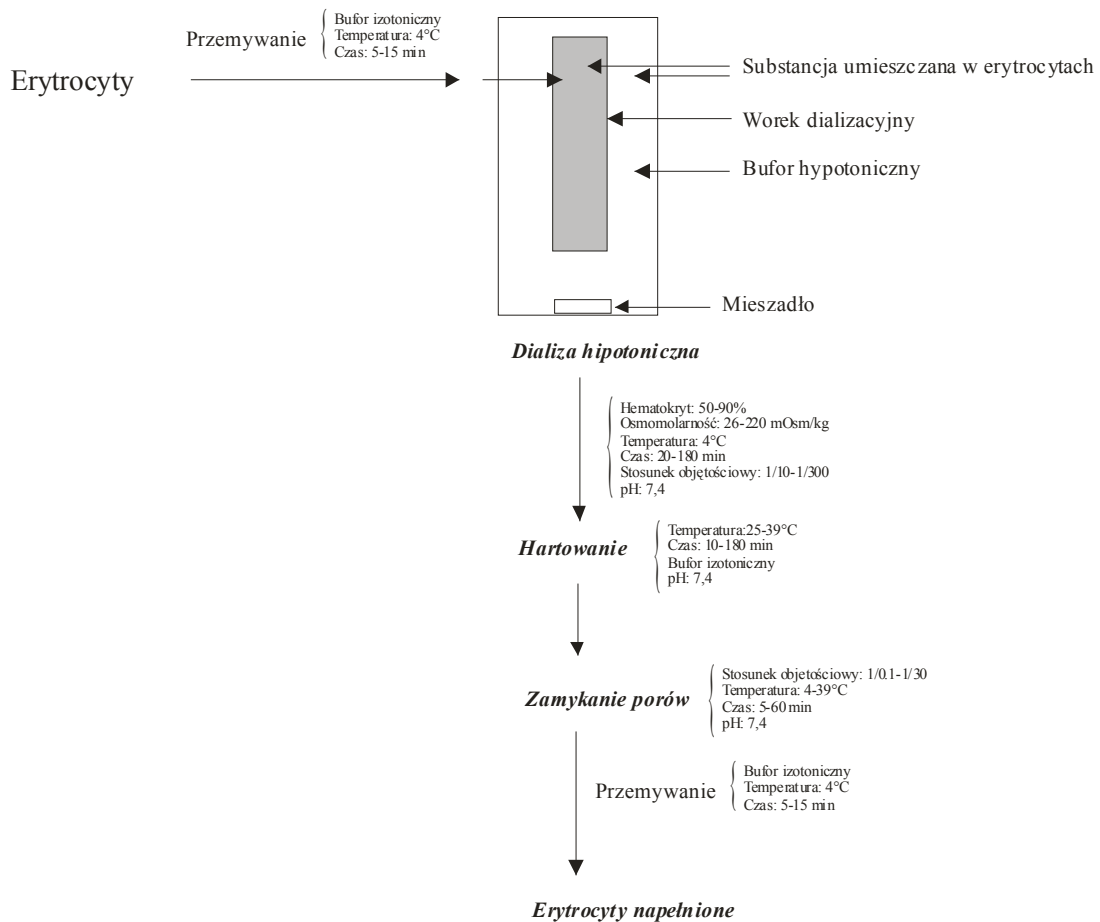
Pierwszym istotnym etapem w metodach umieszczenia związków w erytrocytach jest pozyskanie oczyszczonych komórek. Mogą być one preparowane z krwi zarówno człowieka (Magnani, Rossi, D'ascenzo, Panzani, Bigi & Zanella, 1998) jak i różnych gatunków zwierząt takich jak szczury (Mishra & Jain, 2002), myszy (Kravtsoff, Ropars, Laguerre, Muh & Chasaigne, 1990), króliki (Hamidi, Tajerzadeh, Dephour & Ejtemaee-Mehr, 2001), psy (Tonetti, Astroff, Satterfield, De Flora, Benatti & DeLoach, 1991) i inne. Krew jest pobierana na antykoagulant. Najczęściej stosuje się EDTA, który nie zaburza właściwości fizykochemicznych komórek krwi. Niektórzy autorzy stosują również heparynę (Hamidi & Tajerzadeh 2003) lub mieszaninę cytrynianu, glukozy i kwasu cytrynowego (ACD) (Szwaročka, Kowalczyk, Łubgan, & Józwiak, 2001) bądź cytrynianu, fosforanu i dekstrozy (CPD) (Bourget, Boucher & Ropars, 1992). Świeżo pobrana krew jest wirowana i kilkakrotnie przemywana w roztworze izoosmotycznym co pozwala na usunięcie pozostałych elementów morfotycznych krwi. Tak oczyszczone erytrocyty można poddawać dalszym procedurom umieszczania w nich związków chemicznych.

Obecnie istnieje szereg metod, za pomocą których dokonuje się zamykania leków, enzymów i peptydów w erytrocytach. Zalicza się do nich metody osmotyczne (Millan, Marinero, Castaneda & Lanao, 2004), endocytozę (Matovcik, Junga & Schrier, 1985), metody chemiczne (Szwaročka & Józwiak, 1999) i najnowszą – elektroporację (Lizano, Perez & Pinilla, 2001), wykorzystującą zewnętrzne pole elektryczne.

METODY BAZUJĄCE NA ZJAWISKACH OSMOTYCZNYCH

Zamykanie substancji w erytrocytach oparte na zjawiskach osmotycznych jest dość popularne. W technice tej wykorzystuje się fakt, że erytrocyty umieszczone w hipotonicznym roztworze zwiększają swoją objętość. Sprzyja temu dwuwklęsły kształt fizjologiczny tych komórek. Pęcznienie to jest odwracalne w określonym zakresie toniczności. Punkt krytyczny (bezpośrednio przed lizą komórki) ma miejsce w erytrocytach człowieka przy toniczności roztworu około 150 mosm. W tych warunkach komórka zwiększa swoją objętość o około 25% a pojawiające się pory w błonie osiągają wielkość 200-500 Å (Jain & Jain, 1997; Hamidi & Tajerzadeh, 2003). W tej grupie metod wykorzystywane jest wiele technik, z których najczęściej stosowaną jest dializa hipotoniczna. Jest to metoda która najmniej zmienia biochemiczne i fizjologiczne właściwości erytrocytów. (Dale, 1987; Alvarez, Jordan, Caleja, Lotero, Olmos, Diez & Tejedor, 1998)

Rysunek 1 pokazuje przykładowe etapy tej procedury. Substancja, która ma być zmagazynowana w erytrocytach jest umieszczona razem z zawiesiną erytrocytów w worku dializacyjnym, utworzonym z błony półprzepuszczalnej. Worek z kolei umieszczony jest w buforze hipotonicznym, zwykle o pH 7.4. Osmolarność takiego buforu waha się w granicach od 100 mosM/kg u psów do 200-220 mosM/kg dla erytrocytów owcy. Zalecana osmolarność roztworu dla komórek człowieka to 120 mosM/kg (DeLoach, Droleskey & Andrews, 1991). Stosowany jest dość wysoki hematokryt 50-90%. Czas inkubacji waha się między 20 a 180 min (Sanz, Lizano, Luque & Pinilla, 1999; Perno, Santoro, Balestra, Aquaro, Cenci, Lazzarino, Di Pierro, Tavazzi, Balzarini, Garaci, Grimaldi & Calio, 1997). Dopuszcza się również rozpuszczenie substancji w zewnętrznym buforze dializacyjnym i wtedy cząsteczki tej substancji najpierw przenikają przez błonę worka dializacyjnego a następnie dopiero wnikają do komórki. (Chiarantini, Cerasi, Fraternali, Andreoni, Scari, Giovine, Clavarino, Magnani, 2002). Stosowane worki dializacyjne zwykle mają pory pozwalające na przenikanie substancji o masie 12-14 kDa, chociaż w niektórych przypadkach mogą być mniejsze, około 10 kDa czy nawet 3,5 kDa. Niektórzy badacze używają również dwóch typów membran z otworami o różnych średnicach (Corsi, Galluzzi, Crinelli & Magnani, 1995).



Rys. 1. Schemat procesu zamykania substancji w erytrocytach metodą dializy hipotonicznej (Millan, Castaneda, Marinero & Lanao, 2004).

Szok osmotyczny na który są narażone erytrocyty powoduje ich pęcznienie i tworzenie porów, bez widocznych oznak lizy komórki. Przez te pory lek wnika do komórki na drodze dyfuzji. Kiedy następnie komórki znajdują się ponownie w warunkach fizjologicznego ciśnienia osmotycznego pory się zamykają i substancja pozostaje w komórce. W końcowej fazie procedury erytrocyty są przemywane kilka razy w buforze izotonicznym w temperaturze 4°C i zawieszane w autologicznym osoczu (Sanz, Lizano, Luque & Pinilla, 1999). Niektórzy autorzy zalecają dodatkowe przemywanie erytrocytów w roztworze hipotonicznym. Pozwala to na usunięcie najbardziej nietrwałych komórek. W ten sposób uzyskujemy bardziej homogeną zawiesinę i zwiększamy szanse przeżycia komórek po wprowadzeniu do krwioobiegu. Omawiana procedura pozwala na umieszczenie w komórkach około 40-50% substancji z worka dializacyjnego. Przenośniki preparowane tą metodą wykazują stosunkowo małe modyfikacje właściwości biofizycznych i immunologicznych błony w porównaniu z przenośnikami uzyskanymi innymi metodami (Zolla, Lupidi, Marcheggiani, Falcioni & Brunori, 1990; Millan, Castaneda, Marinero & Lanao,

2004) Erytrocyty wypełnione substancją mają zbliżony czas półtrwania w krwioobiegu do komórek kontrolnych. Zachowują również funkcje metaboliczne i status energetyczny (Fazi, Mancini, Piatti, Accorsi & Magnani, 1991). Są jednak bardziej kruche, wykazują większy stopień hemolizy w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Zastosowanie mikroskopu skaningowego pozwoliło stwierdzić, że erytrocyty w procesie dializy hipotonicznej początkowo przybierają postać echinocytów a ostatecznie tworzą heterogenną zawiesinę komórek prawidłowych i o zmienionym kształcie. Transport leku do komórek zachodzi tu głównie poprzez transport pasywny. Około 20% erytrocytów tworzy wakuole, co powoduje, że częściowo substancje mogą dostawać się do erytrocytów również na drodze endocytozy (DeLoach, Droleskey & Andrews, 1991). Dodatkową zaletą tej metody jest to, że dializa hipotoniczna pozwala na umieszczanie w erytrocytach wszystkich rodzajów cząstek, w tym leków oraz enzymów i peptydów o masie cząsteczkowej nawet do 50 000 Da. (Zolla, Lupidi, Marcheggiani, Falcioni & Brunori, 1991).

Istotne znaczenie dla uzyskania zadowalającego efektu końcowego mają czynniki takie jak skład i osmomolarność buforu hipotonicznego, czas dializy, stężenie substancji umieszczanej. Nieprawidłowo dobrane mogą spowodować zmiany w zachowaniu erytrocytów ponownie umieszczonych w krwioobiegu. Należy podkreślić, że nie tylko sole, ale także inne składniki takie jak glukoza, zredukowany glutation (GSH) i ATP powinny znaleźć się w środowisku w którym zawieszono są erytrocyty. Dostarczają one bowiem energii i pozwalają na zachowanie właściwego środowiska wewnątrz erytrocytów. (Franchetti, Sheikha, Cappellacci, Marchetti, Grifantini, Balestra, Perno, Benatti, Brandi, Rossi & Magnani, 2000).

Aby zwiększyć wydajność procesu umieszczania substancji w erytrocytach stosuje się różne modyfikacje. Magnani, Rossi, D'ascenzo, Panzani, Bigi & Zanella (1998) dokonali zmian procedury w celu wykorzystania jej do umieszczenia w erytrocytach leków niedyfundujących do komórki. Metoda ta polega na stosowaniu przemywania erytrocytów w dwóch następujących po sobie hipotonicznych roztworach o różnej osmomolarności.

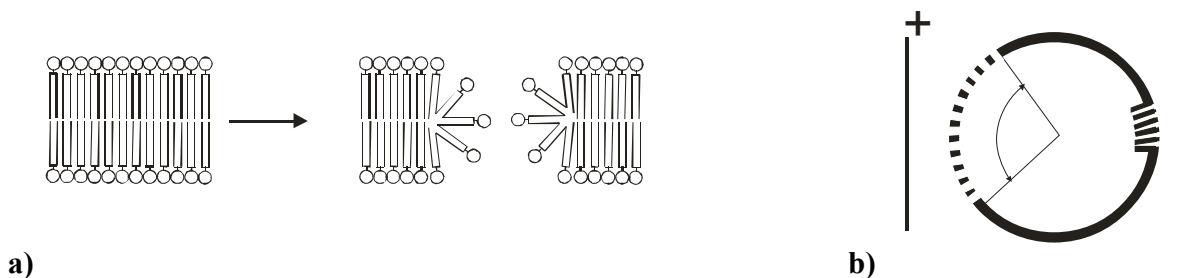
Dializa hipotoniczna jest ulepszoną wersją stosowanej na początku lat 70-tych metody przemywania hipotonicznego (hypotonic dilution). Procedura ta polegała na umieszczeniu upakowanych erytrocytów w wodnym roztworze leku (2-20 objętości). Toniczność zawiesiny regulowano następnie poprzez dodanie buforu hipertonicznego. Po kilkakrotnym przemyciu w buforze izotonicznym w celu zamknięcia powstałych porów, otrzymano komórki wypełnione lekiem (Iher, Glew & Schnure, 1973; Ihler & Tsang, 1987). W rzeczywistości jak się okazało w późniejszych badaniach, uzyskiwane tą metodą komórki były pozbawionymi hemoglobiny pęcherzykami nazywanymi „white ghost” (Lewis, 1984). Cechały się one bardzo krótkim czasem życia po wprowadzeniu do organizmu i

niskim współczynnikiem wychwytywania leków. (Jaitely, Kanaujia, Venkatesan, Jain & Yyas, 1996).

ELEKTROPORACJA

Metoda ta polega na tworzeniu porów w błonie plazmatycznej przez działanie silnym zewnętrznym polem elektrycznym. (Lizano, Sanz, Luque, Pinilla, 1998; Lizano, Perez & Pinilla, 2001; Dong & Jin, 2001). Tworzące się pory pozwalają na przechodzenie cząsteczek o różnej wielkości. Metodę tę stosuje się głównie do umieszczania w erytrocytach enzymów takich jak dehydrogenaza alkoholowa i aldehydowa (Lizano, Perez & Piniola, 2001) oraz leków takich jak np. diklofenak (Dong & Jin, 2001).

Elektroporacja ma miejsce gdy aplikowane zewnętrzne pole elektryczne przekracza pojemność elektryczną błony komórkowej. Woda zaczyna wówczas wnikać do komórki poprzez dielektryczne przerwy i dochodzi do tworzenia się hydrofilowych porów. (Neumann, Kakorin & Toensing, 1999; Gehl, 2003) (Rysunek 2a) Ponieważ potencjał spoczynkowy błony jest bardziej ujemny na zewnątrz komórki niż wewnątrz pory będą tworzyły się po stronie gdzie działa elektroda dodatnia (Rysunek 2b). Ta pierwsza faza elektroporacji nazywana jest fazą wzrostową. Trwa w zależności od oczekiwanej wielkości porów od μs do ms. Druga faza polega na zamykaniu porów po ustaniu działania pola elektrycznego. Proces ten można podzielić na 3 fazy: szybką (μs), wolną (min) i fazę całkowitego zamknięcia porów, która trwa ponad 10 min. (Neamtu, Morariu, Turcu, Popescu & Copaeacu, 1999). Po elektroporacji a przed ponownym uszczelnieniem erytrocyty tracą swój dwuwklęsły kształt i stają się sfero-stomatocytami oraz sferocytami. Obserwowane są również pewne wpuklenia i wypustki. Po uszczelnieniu, błony nie wykazują już żadnych porów ani wpukleń. Komórki wracają do postaci dyskocytów.



Rys. 2. Procesy zachodzące w błonie komórkowej podczas elektroporacji (Gehl, 2003).

Nieliczne pozostają sferostomatocytami i sferocytami. Zaletą tej metody jest łatwa procedura i fakt, że zjawisko to może dokonywać się w roztworach izotonicznych. (Lizano, Perez, Pinio-la, 2001) W tradycyjnym procesie elektroporacji cała populacja

komórek w postaci zawiesiny jest poddawana działaniu jednorodnego pola elektrycznego. Pole to wytwarzane jest między dużymi elektrodami odległymi od siebie o milimetry lub centymetry. Przyłożone napięcie jest rzędu setek lub tysięcy voltów. Ostatnio skonstruowano

mikroelektrody z włókien węglowych, które pozwalają na elektroporację nawet pojedynczych komórek, co otwiera nowe możliwości. Pozwala na umieszczenie substancji w pojedynczych komórkach (Olofsson, Nolkranz, Ryttsen, Lambie, Weber & Orwar, 2003). Zaletą metody elektroporacji jest również fakt, że hemoglobina nie traci swojej zdolności do przenoszenia tlenu. (Lizano, Sanz, Luque & Pinilla, 1998). Proces elektroporacji nie pozostaje jednak bez wpływu na błonę komórkową. Po ekspozycji erytrocytów na działanie pola elektrycznego dochodzi do wzrostu ruchliwości fosfolipidów. Wprawdzie w ciągu kilku minut (przy 4°C) następuje zmniejszenie tej ruchliwości do określonego stabilnego poziomu, jednak nawet podczas przedłużonego okresu zamykania porów (24-27h) ruchliwość ta nie wraca do poziomu kontrolnego (Haest, Kamp & Deuticke, 1997). Ponadto Haest, Kamp & Deuticke, 1997 postulują, że wbrew wcześniejszym doniesieniom (Serpensu, Kinoshita & Tsong, 1985; Rols & Teissie, 1990) zamykanie porów w temperaturze 37°C nie jest kompletne. Nawet przy elektroporacji polem o umiarkowanej sile (4-8 KV cm⁻¹, τ = 8-80μs) błona komórkowa pozostawała przepuszczalna dla małych jonów hydrofilowych (K⁺) i dla większych jonów hydrofobowych (metylenotrifenylofosforanowych). Nie obserwowano przenikania większych hydrofilowych substancji takich jak mono czy disacharydów. (Haest, Kamp & Deuticke., 1997).

ENDOCYTOZA

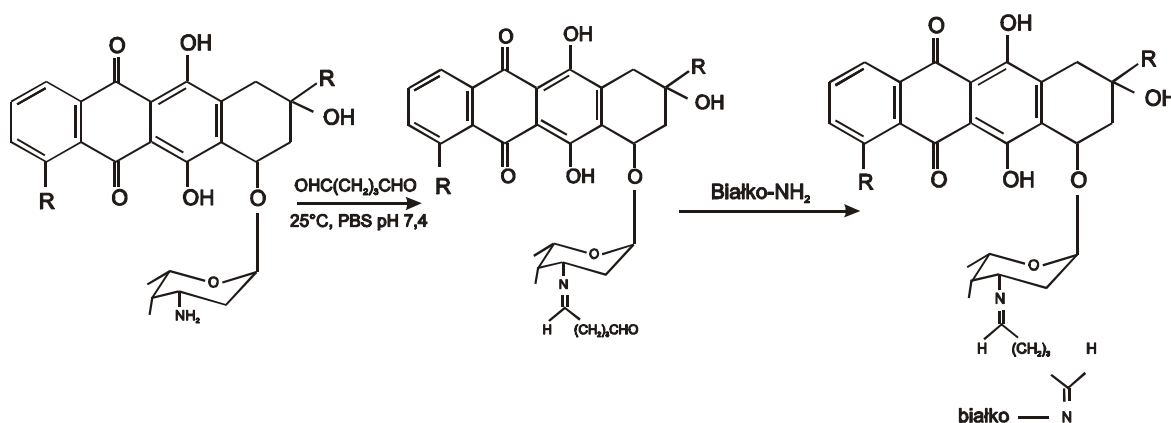
Substancje, które zdolne są do przekształcania erytrocytów w stomatocyty mogą dostawać się do komórki na drodze endocytozy. Do związków takich zaliczamy: primaquine, hydrokortyzon, vinblastynę, chlorpromazynę. (Matovcik, Junga & Schrier, 1985; Tonetti, Astroff, Satterfield, De Flora, Benatti & DeLoach., 1991). Efektywność tej metody jest bardzo różna, waha się w granicach 3.8%-80%. Ze względu na

małą specyficzność metoda ta jest mało popularna. Pojawia się raczej jako „skutek uboczny” działania innych metod.

MODYFIKACJE CHEMICZNE BŁONY KOMÓRKOWEJ W CELU WIĄZANIA SUBSTANCJI W ERYTROCYTACH

Wiele leków po umieszczeniu w erytrocytach bardzo szybko z nich wypływa. Zastosowanie związków sieciujących pomaga ograniczyć ten problem. Spośród takich związków najczęściej stosowane są: aldehyd glutarowy, dimetylosuberimidate, tolueno 2,4-diizocyjanian i inne (Jordan, Alvarez, Lotero, Olmos, Calleja, Tejedor & Diez, 1998; Szwarocka & Józwiak, 1999). Związki te tworzą wiązania krzyżowe między białkami błony komórkowej i stabilizują ją. Poza tym zmiany w błonie komórkowej powodują, że komórki te są łatwiej rozpoznawane przez makrofagi. Około 40% komórek więcej było wychwytywane przez makrofagi po inkubacji z takimi czynnikami sieciującymi jak bis(sulfosukcyni-midylo)suberan (BS(3)) czy 3,3'-ditiobis(sulfosukcyni-midylo propionianu) DTSSP. (Jordan, Alvarez, Lotero, Herraez, Diez & Tejedor, 2001)

Aldehyd glutarowy jest najpowszechniej stosowanym czynnikiem sieciującym. (Chwirot, 1997) Jeden z modeli unieruchamiania leku wewnątrz erytrocytu zakłada, że aldehyd glutarowy tworzy wiązania chemiczne między związkami zawierającymi grupy aminowe. W ten sposób mogą być wiązane do komórki na przykład antybiotyki antracyklinowe. Mogą one wiązać się poprzez aldehyd glutarowy z innymi składnikami komórki zawierającymi takie grupy np. z białkami błonowymi czy fosfolipidami (Lejeune, Moorjani, Gicquard, Lacroix, Poyet & Gaudreault, 1994). Rysunek 3 przedstawia schemat wiązania cząsteczki antracykliny do białek.



Rys. 3. Kowalencyjne wiązanie daunorubicyny do białka błony erytrocytu przez aldehyd glutarowy (Lejeune, Moorjani, Gicquard, Lacroix, Poyet & Gaudreault, 1994).

Wykazano, że zastosowanie aldehydu glutarowego powoduje akumulowanie większej ilości leków w komórce (Szwarcoka & Józwiak, 1999; Szwarcoka, Kowalczyk, Łubgan & Józwiak, 2001). Obserwowano także znaczne zmniejszenie tempa wyciekania antybiotyków antracyklinowych z wnętrza erytrocytów. Ponadto stwierdzono, że dokсорubicyna podana w erytrocytach inkubowanych z aldehydem znacznie zmniejsza efekty uboczne związane z działaniem leku oraz zwiększa znacząco akumulację leku w zmienionej nowotworowo wątrobie myszy (Ataullakhanov, Kulikova & Vitvitsky, 1996).

Traktowanie krwinek aldehydem glutarowym ma właśnie między innymi na celu skierowanie leku do wątroby i śledziony. Po związaniu aldehydu z błoną komórkową ma miejsce obniżenie płynności błony oraz zachodzą zmiany konformacyjne białek błonowych. Wzrasta wówczas antygenowość erytrocytów i są one szybko eliminowane przez organy bogate w komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego. Użycie niższego stężenia aldehydu powoduje gromadzenie się erytrocytów w śledzionie, natomiast przy wyższym stężeniu gromadzą się one w wątrobie (Lejeune, Moorjani, Gicquard, Lacroix, Poyet & Gaudreault, 1994).

Badania wykazały, że aldehyd glutarowy wiąże lek z erytrocytami niezależnie od początkowego stężenia antybiotyku zarówno w niskich jak i wysokich w temperaturach. Ponadto lek, który znajduje się w erytrocytach zachowuje aktywność rzeciwnowotworową po zamrożeniu i ponownym rozmrożeniu przenośnika z lekiem (Ataullakhanov, Kulikova & Vitvitsky, 1996).

Aldehyd glutarowy stosowany w wysokich stężeniach powoduje jednak duże zmiany strukturalne komórek, zwłaszcza w błonie komórkowej. Zastosowanie metod:

Związki tworzące wiązania w białku pasma 3 to: bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS³) oraz 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidyl)propaniate (DTSSP) (Jordan, Murciano, Lotero, Herraez & Diez, 1997; Lotero, Olmos

Elektronowego Rezonansu paramagne-tycznego i Spektroskopii Fluorescencyjnej pozwoliło dokonać kompleksowych badań dotyczących zmian w obrębie dwuwarstwy lipidowej (w różnych jej obszarach), konformacji białek błonowych oraz mikrolepkości wnętrza erytrocytu i potencjału błonowego.

Uzyskane wyniki wskazują, że dochodzi do istotnego statystycznie zmniejszenia płynności dwuwarstwy lipidowej, zarówno w powierzchniowych jak i hydrofobowych jej obszarach. Ma miejsce obniżenie parametru W/S świadczącego o zmianach konformacyjnych białek błonowych. Dochodzi również do wzrostu mikrolepkości wnętrza erytrocytu oraz zaburzeń potencjału błonowego.

Duże zmiany wykazane dla stężeń aldehydu glutarowego (0,025-0,035%) pozwalają wykluczyć możliwość zastosowania go w tych stężeniach do wiązania leku w komórkach. Zaobserwowano trudności z uwalnianiem leku z erytrocytów przygotowywanych w tych warunkach. Niezwykle ważne więc przy stosowaniu tej procedury jest dobranie odpowiedniego stężenia aldehydu.

Przeprowadzone dodatkowo badania wpływu aldehydu glutarowego na hemoglobinę potwierdziły silne jego oddziaływanie z tym białkiem (Szwarcoka, Kowalczyk, Łubgan, Józwiak, 2001; Szwarcoka & Józwiak, 1999)

Często stosowanymi modyfikatorami błony są związki tworzące wiązania krzyżowe z białkiem pasma 3. W wyniku ich stosowania komórki takie są szybko rozpoznawane przez makrofagi i dzięki temu wzrasta stopień fagocytozy umieszczonych w erytrocytach związków (Jordan, Alvarez, Lotero, Olmos, Calleja, Tejedor & Diez, 1998; Alvarez, Jordan, Calleja, Lotero, Olmos, Diez & Tejedor, 1998).

& Diez, 2003). Za pomocą tej metody przenoszone są enzymy takie jak anhidraza węglanowa (Jordan, Alvarez, Lotero, Olmos, Calleja, Tejedor & Diez, 1998; Alvarez, Jordan, Calleja, Lotero, Olmos, Diez &

Tejedor, 1998), cytokininy w tym interleukina 3 (IL-3) (Olmos, Lotero, Tejedor & Diez, 2000), antiretroviral leki (Magnani, Casablanca, Fraternali, Brandi, Wessani, Williams, Giovine, Damonte, De Flora & Benatti 1996), glukokortykoidy przeciwzapalne i immunosupresyjne (Magnani, Rossi, D'ascenzo, Panzani, Bigi & Zanella, 1998; Crinelli, Antonelli, Bianchi, Gentilini, Scaramucci & Magnani, 2000; Rossi, Serafini, Cenerini, Picardi, Bigi, Panzani & Magnani, 2000), leki przeciwnowotworowe np. etopozyd – inhibitor topoizomerazy II (Lotero, Olmos & Diez, 2003). Inne zachęcające metody modyfikacji chemicznych erytrocytów to przyłączanie specyficznych przeciwciał monoklonalnych do komórki erytrocytarnej. Te przeciwciała zdolne są do rozpoznawania antygenowych determinant na powierzchni komórek rakowych i w ten sposób mogą selektywnie gromadzić się w rejonie guza.

PIŚMIENNICTWO

- Alvarez F.J., Jordan J.A., Calleja P., Lotero L.A., Olmos G., Diez J.C. & Tejedor M.C. (1998). Cross-linking treatment of loaded erythrocytes increases delivery of encapsulated substance to macrophages. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **27**, 139-143.
- Ataullakhanov F.I., Kulikova E.V. & Vitvitsky V.M. (1996) Reversible binding of anthracycline antibiotics to erythrocytes treated with glutaraldehyde. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **24**, 241-4.
- Bax B.E., Bain M.D., Talbot P.J., Parker-Williams E.J. & Chalmers R.A. (1999). Survival of human carrier erythrocytes *in vivo*. *Clin Sci. (Lond.)* **96**, 171-178.
- Bourget G., Boucher L. & Ropars C. (1992) Density gradient separation of inositol hexaphosphate loaded red blood cells in various preparation conditions. [In:] Magnani M. & DeLoach J.R. (Eds.) *Advances in Experimental Medicine and Biology*. vol. 326 (pp. 27-33) Plenum, New York.
- Chiarantini L., Cerasi A., Fraternali A., Andreoni F., Scari S., Giovine M., Clavarino E. & Magnani M. (2002). Inhibition of macrophage iNOS by selective targeting of antisense PNA. *Biochemistry* **41**, 8471-8477.
- Chwirut B.W. (1997) Ultraweak chemiluminescence arising from glutaraldehyde-induced cross-linking reactions of biomolecules. *J Biolumin. Chemilumin.* **12**, 233-239.
- Corsi D., Galluzzi L., Crinelli R. & Magnani M. (1995). Ubiquitin is conjugated to the cytoskeletal protein α -spectrin in mature erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 8928-8935.
- Crinelli R., Antonelli A., Bianchi M., Gentilini L., Scaramucci S. & Magnani M. (2000). Selective inhibition of NF- κ B activation and TNF- α production in macrophages by red blood cell-mediated delivery of dexamethasone. *Blood Cells. Mol. Diseases* **26**, 211-222.
- Dąbrowski Z. Fizjologia Krwi. Wybrane zagadnienia. Wydawnictwo Naukowe PWN 1998.
- Dale G. (1987). High-efficiency entrapment of enzymes in resealed red cell ghosts by dialysis. [In:] Greek R. & Widder K.J. (Eds.) *Methods in enzymology*. vol. 149, (pp. 229-234) Academic Press, San Diego.
- De Loach J.R., Droleskey R.E. & Andrews K. (1991). Encapsulation by hypotonic dialysis in human erythrocytes: a diffusion or endocytosis process. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13**, 72-82.
- Dong Q. & Jin W. (2001). Monitoring diclofenac sodium in single human erythrocytes introduced by electroporation using capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Electrophoresis* **22**, 2786-2792.
- Duncan R. (2003). The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Disco.* **2**, 347-359.
- Fazi A., Mancini U., Piatti E., Accorsi A. & Magnani M. (1991). Human red blood cells as bioreactors for the inactivation of harmful xenobiotics. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **14**, 60-68.
- Franchetti P., Sheikha G.A., Cappellacci L., Marchetti S., Grifantini M., Balestra E., Perno C.F., Benatti U., Brandi G., Rossi L. & Magnani M. (2000) A new acyclic heterodinucleotide active against Human Immunodeficiency Virus and Herpes Simplex Virus. *Antiviral Res.* **47**, 149-158.
- Gasparini A., Chiarantini L., Kirch H., DeLoach J.R. (1992) The use of resealed erythrocytes as carriers and bioreactors. *Advances In Experimental Medicine and Biology*. **326**, 291-297.
- Gehl J. (2003) Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand.* **177**, 437-47.
- Gothoskar A.V. (2004). Resealed erythrocytes: a review. *Pharmaceut. Technol.* 140-158.
- Grimaldi S., Lisi A., Gozzi D. & Santoro N. (1997). Attempts to use liposomes and RBC ghosts as vectors and antisense therapy of virus infection. *Res. Virol.* **148**, 177-180.
- Guyton A.C. & Hall J.E. (1996). Red blood cells, anemia and polycythemia. In *Textbook of Medical Physiology*, 425-433. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Haest C.W.M., Kamp D. & Deuticke B. (1997). Transbilayer reorientation of phospholipid probes in the human erythrocyte membrane. Lessons from studies on electroporated and resealed cells. *Bioch. Biophys. Acta.* **1325**, 17-33.
- Hamidi M. & Tajerzadeh H. (2003). Carrier erythrocytes: an overview. *Drug Deliv.* **10**, 9-20.
- Hamidi M., Tajerzadeh H., Dehpour A.R. & Ejtemaee-Mehr S. (2001). Inhibition of serum angiotensin-converting enzyme in rabbits after intravenous administration of enalaprilat-loaded intact erythrocytes. *I. Pharm. Pharmacol.* **53**, 1281-1286.
- Jain S. & Jain N.K. (1997). Engineered erythrocytes as a drug delivery system., *Indian J.Pharm. Sci.* **59**, 275-281.
- Jordan J.A., Alvarez F.J., Lotero L.A., Herraes A., Diez J.C. & Tejedor M.C. (2001). In vitro phagocytosis of carrier mouse red blood cells is increased by Band 3 cross-linking or diamide treatment. *Biotechnol Appl Biochem.* **34**, 143-9.
- Jordan J.A., Alvarez F.J., Lotero L.A., Olmos G., Calleja P., Tejedor M.C. & Diez J.C. (1998). Differentia induction of macrophage recognition of carrier erythrocytes by treatment with band 3 cross-linkers. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **27**, 133-137.
- Jordan J.A., Murciano J.C., Lotero A., Herraes A. & Diez J.C. (1997). *In vitro* properties and organ uptake of rat band 3 cross-linked erythrocytes. *Biochemie* **79**, 53-61.
- Klinken S.P. (2002). Red blood cells. *Int. J.Biochem. Cell Biol.* **34**, 1513-1518.

- Kravtsoff R., Ropars C., Laguerre M., Muh J.P. & Chasaigne M. (1990). Erythrocytes as carriers for L-asparaginase. Methodological and mouse *in vivo* studies. *J. Pharm. Pharmacol.* **42**, 473-476.
- Lejeune A., Moorjani M., Gicquard C., Lacroix J., Poyet P. & Gaudreault R.C. (1994). Nanoerythrocyte – a new derivative of erythrocyte ghost: preparation and antineoplastic potential as drug carrier for daunorubicin. *Anticancer. Res.* **14**, 915-920.
- Lizano C., Perez M.T. & Pinilla M. (2001). Mouse erythrocytes as carriers for coencapsulated alcohol and aldehyde dehydrogenase obtained by electroporation *In vivo* survival rate *In circulation*, organ distribution and ethanol degradation. *Life Sci.* **68**, 2001-2016.
- Lizano C., Sanz S., Luque J. & Pinilla M. (1998). *In vitro* study of alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase encapsulated into human erythrocytes by an electroporation procedure. *Biochim. Biophys. Acta.* **1425**, 328-336.
- Lotero L.A., Olmos G. & Diez J.C. (2003). Delivery to macrophages and toxic action of etoposide carried in mouse red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1620**, 160-166.
- Magnani M., Casablanca A., Fraternali A., Brandi G., Wessani S., Williams R., Giovine M., Damonte G., De Flora A. & Benatti U. (1996). Synthesis and target delivery of a fan azidothymidine homodinucleotide conferring protection to macrophages against retroviral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 4403-4408.
- Magnani M., Rossi L., D'ascenzo M., Panzani I., Bigi L. & Zanella A. (1998). Erythrocyte engineering for drug delivery and targeting. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28**, 1-6.
- Magnani M., Rossi L., Fraternali A., Bianchi M., Antonelli A., Crinelli R. & Chiarantini L. (2002). Erythrocyte-mediated delivery of drugs, peptides and modified oligonucleotides. *Gene Ther.* **9**; 749-751.
- Marcucci F. & Lefoulon F. (2004). Active targeting with particulate drug carriers *In tumor therapy: Fundamentals and recent Progress.* *DDT* **9**, 219-228.
- Matovcik L.M., Junga I.G. & Schrier S.L. (1985). Drug – induced endocytosis of neonatal erythrocytes. *Blood* **65**, 1056-1063.
- Millan C.G., Castaneda A.Z., Marinero L.S. & Lanao J.M. (2004). Factors associated with the performance of carrier erythrocytes obtained by hypotonic dialysis. *Blood Cells Mol. Disease.* **33**, 132-140.
- Millan C.G., Marinero M.L.S., Castaneda A.Z. & Lanao J.M. (2004). Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. *J. Control. Release.*, **95**, 27-49.
- Mishra P.R. & Jain N.K. (2002). Biotinylated methotrexate loaded erythrocytes for enhanced liver uptake. A study on the rat. *Int. J. Pharm.*, **231**, 145-153.
- Moss H.A., Tebbs S.E., Farouqi M.H., Herbst T., Isaac J.L., Brown J., Elliott T.S. (2000). A central venous catheter coated with benzalkonium chloride for the prevention of catheter-related microbial colonization. *Eur. J. Anaesthesiol.* **17**, 680-687.
- Neamtu S., Morariu V.V., Turcu I., Popescu A.H. & Copaescu L.I. (1999). Pore resealing inactivation *In* electroporated erythrocyte membrane irradiated with electrons. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **48**, 441-445.
- Neumann E., Kakorin S. & Toensing K. (1999) Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **48**, 3-16.
- Olmos G., Lotero L.A., Tejedor M.C. & Diez J.C. (2000). Delivery to macrophages of interleukin 3 loaded *In* Mouse erythrocytes. *Biosci. Rep.* **20**, 399-410.
- Olofsson J., Nolkranz K., Ryttsen F., Lambie B.A., Weber S.G. & Orwar O. (2003). Single-cell electroporation. *Curr. Opin. Biotech.* **14**, 29-34.
- Patri A.K., Majoros I.J., Baker J.R. (2002). Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 466-471.
- Perno C.F., Santoro N., Balestra E., Aquaro S., Cenci A., Lazzarino G., Di Pierro D., Tavazzi B., Balzarini J., Garaci E., Grimaldi S. & Calio R. (1997). Red blood cells mediated delivery of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine to primary macrophages: efficiency metabolism and activity against human immunodeficiency virus or herpes simplex virus. *Antiviral Res.* **33**, 153-164.
- Rols M.P. & Teissie J. (1990). Electroporation of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys. J.* **58**, 1089-1098.
- Rossi L., Serafini S., Cenerini L., Picardi F., Bigi L., Panzani I. & Magnani M. (2000). Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **33**, 85-89.
- Sanz S., Lizano C., Luque J. & Pinilla M. (1999). *In vitro* and *in vivo* study of glutamate dehydrogenase encapsulated into mouse erythrocytes by hypotonic dialysis procedure. *Life Sci.*, **65**, 2781-2789.
- Schrijvers D. (2003). Role of red blood cells in pharmacokinetics of chemotherapeutic agents. *Clin. Pharmacokinet.* **42**, 779-791.
- Serpensu E.H., Kinoshita K. Jr & Tsong T.Y. (1985). Reversible and irreversible modification of erythrocyte membrane permeability by electric field. *Biochim. Biophys. Acta* **812**, 779-785.
- Spandel U. & Way L. (Eds) Erythrocytes as drug carriers in medicine. *Plenum Press*, New York and London, 1997.
- Szwarocka A. & Józwiak Z. (1999). The effect of daunorubicin and glutaraldehyde treatment on the structure of erythrocyte membrane. *Int. J. Pharmaceut.* **181**, 117-123.
- Szwarocka A., Kowalczyk A., Lubgan D. & Józwiak Z. (2001). The combined effect of IDA and glutaraldehyde on the properties of human erythrocytes. *Int. J. Pharmaceut.* **220**, 43-51.
- Tonetti M., Astroff A.B., Satterfield W., De Flora A., Benatti U. & DeLoach J.R. (1991). Pharmacokinetic properties of doxorubicin encapsulated *In* glutaraldehyde-treated canine erythrocytes. *Am. J. Vet. Res.*, **52**-1630-1635.
- Ugai Y., Ugai K. & Fuse A. (2001). Current status of bacterial contamination of autologous blood for transfusion. *Transfus. Apher. Sci.*, **24**, 255-259.
- Valbonesi M., Bruni R., Florio G., Zanella A. & Bunkens H. (2001). Cellular contamination of plasma collected with various apheresis systems. *Transfus. Apher. Sci.*, **24**, 91-94.
- Zolla L., Lupidi G., Marcheggiani M., Falcioni G. & Brunori M. (1990). Encapsulation of proteins into human erythrocytes: a kinetic investigation. *Biochim. Biophys. Acta* **1024**, 5-9.

Zolla L., Lupidi G., Marcheggiani M., Falcioni G. & Brunori M. (1991). Red blood cells as carriers for delivering of proteins. *Ann. Ist. Super. Sanita.* **27**, 97-103.