

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Ивана Т. Костић

**ПРОЦЕСНО ОЧУВАНЕ МЕМБРАНЕ
ЕРИТРОЦИТА ДОБИЈЕНЕ ИЗ КЛАНИЧНЕ
КРВИ КАО СИСТЕМИ ЗА ПРОДУЖЕНО
ОСЛОБАЂАЊЕ АКТИВНИХ СУПСТАНЦИ**

докторска дисертација

Београд, 2015. године

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Ivana T. Kostić

**PRESERVED ERYTHROCYTE MEMBRANES
PRODUCED FROM SLAUGHTERHOUSE
BLOOD AS SYSTEMS FOR PROLONGED
DELIVERY OF ACTIVE SUBSTANCES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Ментори:

Др Бранко Бугарски, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Весна Илић, научни саветник
Универзитета у Београду, Институт за медицинска истраживања

Чланови комисије:

Др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Виктор Недовић, редовни професор
Универзитета у Београду, Пољопривредни факултет

Др Верица Ђорђевић, научни сарадник
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Датум одбране:

Ова докторска дисертација урађена је у сарадњи две институције, Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду и Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду, у оквиру истраживања предложених у пројекту интегралних и интердисциплинарних истраживања (ИИИ 46010): "Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонента хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности", који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у периоду од 2011. до 2015. године.

Експериментални део рада ове докторске дисертације је изведен у лабораторијама Института за медицинска истраживања и Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, али и другим научно-истраживачким организацијама у Србији и то у Институту за биолошка истраживања "Синиша Станковић", Универзитета у Београду (UHPLC/-HESI-MS/MS анализа), Институту за физику, Универзитета у Београду (AFM анализа), Институту техничких наука Српске академије наука и уметности (анализа ласерске дифракције) и Технолошком факултету, Универзитета у Новом Саду (сушење узорак за SEM анализу).

Захвалница

Велику захвалност дугујем ментору, Бранку Бугарском, професору Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду за позив и залагање да на почетку докторских студија пређем у његов истраживачки тим и започнем сарадњу са Институтом за медицинска истраживања, Универзитета у Београду. Без тога, не би било ни ове докторске дисертације, ни сарадње са еминентним стручњацима са Универзитета у Београду, као ни остварених пријатељстава са квалитетним особама, колегама са Технолошко-металуршког факултета и Института за медицинска истраживања.

Изузетно сам поносна и неизмерно захвална, што сам кроз започета истраживања стекла још једног ментора, др Весну Илић, научног саветника Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду Својим искуством, знањем и посвећеношћу уз изузетно поштовање и разумевање моје индивидуалности водила ме је кроз истраживачко путовање у току четири године: од почетног учења различитих експерименталних техника, сугестија, помоћи у писању и анализирању резултата, сталне доступности и спремности да саслуша, вере да ћемо успети када нико у нас није веровао, до савета којима је учествовала у мом професионалном усавршавању.

Члановима комисије, проф. Зорици Кнежевић-Југовић и др Верици Ђорђевић са Технолошко-металуршког факултета и проф. Виктору Недовићу, са Пољопривредног факултета, захваљујем се на корисним сугестијама и корекцијама, којима су утицали на коначни изглед ове докторске дисертације.

Захваљујем се Новаку Ковачевићу и Дејану Вуковићу, лекарима ветеринарске медицине и Данијели Лукић, дипломираном технологу са фарме и клинице ПКБ Имес из Београда, на великодушном обезбеђивању узорака кланичне крви. Захваљујем се др Дијани Бугарски из Института за медицинска истраживања на сталној моралној подршци и корисним саветима у анализи резултата. Захвалност дугујем колегицима из Групе за кардиоваскуларну физиологију Института за медицинска истраживања, др Невени Михајловић-Станојевић и Јелици Грујић Милановић за урађене анализе антиоксидативног капацитета узорака, и колеги Славку Мојсиловићу из Групе за хематологију за анализе проточне цитометрије. Велику захвалност дугујем и колегама др Бори Васићу, из Института за физику и др Смиљи Марковић, из Института техничких наука Српске академије наука и уметности за урађене АФМ анализе, односно анализе ласерске дифракције и несебичну помоћ у тумачењу резултата. Осећам неизмерну захвалност према др Данијели Мишић, из Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" која ми је обезбедила неопходну UHPLC/-HESI-MS/MS анализу, али и диван осећај да сам увек добродошла у њихов тим. Колеги дипл. инг. Гаврилу Шекуларцу се захваљујем на помоћи у извођењу FTIR анализе. Посебну захвалност дугујем колегици Катарини Букари, магистру фармације на вољи и помоћи да се изборимо са великим изазовима у експерименталном раду. Колегици Ани Станчић, молекуларном биологу, захваљујем се на конкретној помоћи у графичком обликовању појединих делова ове дисертације.

Хвала на подршци и пријатељству, које су ми у тешким тренуцима током израде ове тезе уз чашицу разговора пружиле колегице са Технолошко-металуршког факултета др Верица Ђорђевић, Радослава Правиловић, Бојана Баланч и Ката Трифковић и колеге са Института за медицинска истраживања, Милош Диклић и Маријана Буач. Велико хвала и другим колегама са Технолошко-металуршког факултета, проф. др Невенки Бошковић Враголовић, др Ради Пјановић и др Ђорђу Вељовићу, који су ми кроз пословну сарадњу пружали пријатељску подршку и чинили да се осећам као да сам одувек део ове институције.

Од срца се захваљујем својим пријатељима за разумевање за сва одложена и померена дружења и подршку у току свих ових година.

И на крају, огромну захвалност дугујем својој породици. Без њих сигурно не бих успела да пребродим тешке тренутке којих је било у току израде ове дисертације. Мајци Тамари за љубав, веру, подршку и снагу коју увек уноси у мој рад и живот. Сестри Катарини за ентузијазам, ведрину и енергичност коју несебично дели. Мојој новој породици, супругу Николи, за пружену љубав, осећање spokoјства и искрено разумевање у свему и увек...

ПРОЦЕСНО ОЧУВАНЕ МЕМБРАНЕ ЕРИТРОЦИТА ДОБИЈЕНЕ ИЗ КЛАНИЧНЕ КРВИ КАО СИСТЕМИ ЗА ПРОДУЖЕНО ОСЛОБАЂАЊЕ АКТИВНИХ СУПСТАНЦИ

РЕЗИМЕ

У овој докторској дисертацији развијен је процес за изоловање говеђих и свињских еритроцитних мембрана („духова“) из отпадне кланичне крви. Поред тога, развијени су и детаљно *in vitro* окарактерисани системи за продужено ослобађање активних супстанци на бази добијених еритроцитних мембрана.

У циљу пројектовања процеса којим би се добиле говеђе и свињске еритроцитне мембране које су структурно очуване, а пореклом из отпадне кланичне крви, дефинисане су специфичне осмотске карактеристике ових еритроцита. Показано је да су свињски еритроцити осмотски осетљивији и да еритроцити ниједне од испитиваних врста нису осмотски хомогени. Ова хетерогеност је детектована између еритроцита различитих узорка исте врсте, али и еритроцита једног узорка. Као оптимални пуфер за извођење хемолизе говеђих и свињских еритроцита одређен је 35 mM натријум фосфатни/NaCl пуфер чијом применом се у процесу градуалне хипотоничне хемолизе, при протоку пуфера од 300 ml/h, током 30 min, ослобађа >90% хемоглобина из велике запремине (100 ml) обе врсте еритроцита. Биохемијска анализа добијених мембрана еритроцита је показала да се садржај протеина и холестерола није битно разликовао у односу на мембране интактних еритроцита. Такође, пречник еритроцитних мембрана обе врсте био је за само 10% мањи од интактних еритроцита, а расподела величине униформна. Ови резултати су показали да духови кланичних еритроцита обе врсте животиња имају способност да „имитирају“ хемијско и структурно анизотропно окружење ћелијских мембрана *in vivo*, што је од значаја за дифузију и партициони коефицијет активних супстанци при њиховој инкапсулацији.

У следећој фази истраживања испитана је могућности примене процеса градуалне хипотоничне хемолизе за инкапсулацију модел супстанце, синтетског глукокортикоида и најшире коришћеног антиинфламаторног

лека, дексаметазон-натријум-фосфата (DexP). Оптимизовани су процесни параметри-температура инкубације, концентрација лека и присуство умреживача- за инкапсулацију DexP у духове говеђих и свињских еритроцита. Од испитиваних параметара као најоптималнији за инкапсулацију DexP, у обе врсте еритроцитних духова, одређени су концентрација лека од 0,12 mg/ml и температура инкубације од 37°C. Показано је да се коришћењем свињских еритроцитних духова, постиже већи степен инкапсулације DexP (13-14%) у поређењу са говеђим еритроцитним духовима (2-3%). Добијени системи DexP-еритроцитне мембране су окарактерисани са аспекта расподеле величине, морфолошких карактеристика мембрана еритроцита са инкапсулираним DexP и кинетике ослобађања инкапсулираног DexP из духова. Детаљна морфолошка анализа (AFM, SEM, ласерска дифракција) оба типа еритроцитних духова са инкапсулираним DexP, показала је да присуство инкапсулираног DexP нема утицаја на морфологију еритроцитних духова, али да постоје значајне разлике у морфологији између говеђих и свињских еритроцитних духова. Кинетика отпуштања инкапсулираног DexP се разликовала како између врста еритроцитних духова, тако и између узорака исте врсте у зависности од садржаја резидуалног хемоглобина. Постигнуто је продужено отпуштање DexP, у периоду од 3, односно 5 дана у случају DexP инкапсулираних свињских и говеђих еритроцитних духова, респективно.

На основу морфолошких и структурних карактеристика и карактеристика отпуштања DexP из говеђих и свињских еритроцитних духова изолованих из кланичне крви, може се закључити да они показују велики потенцијал за биомедицинску примену у циљу продужене и контролисане доставе антиинфламаторног лека DexP.

Кључне речи: *кланична крв; градуална хипотонична хемолiza; еритроцитне мембране; еритроцитни духови; дексаметазон-натријум-фосфат, системи за продужено ослобађање активних супстанци*

Научна област: Технолошко инжењерство

Ужа научна област: Биохемијско инжењерство и биотехнологија

УДК број:

PRESERVED ERYTHROCYTE MEMBRANES PRODUCED FROM SLAUGHTERHOUSE BLOOD AS SYSTEMS FOR PROLONGED DELIVERY OF ACTIVE SUBSTANCES

SUMMARY

In this doctoral dissertation, a process for production of empty erythrocyte membranes („ghosts“) originating from bovine and porcine wasted slaughterhouse blood was developed. In addition, with an aim of designing prolonged drug delivery vehicles, ghost-based drug delivery systems were formulated and *in vitro* characterized.

In order to design the process by which hemoglobin would be released from erythrocytes, leaving preserved cell membranes, the first step was to define specific osmotic properties of bovine and porcine erythrocytes derived from slaughterhouse blood. The results showed that porcine erythrocytes were more osmotically susceptible compared to bovine ones, but neither of the two examined types of erythrocytes was homogeneous regarding their osmotic properties. This heterogeneity was detected among erythrocytes from different samples of one species, as well as among erythrocytes in one sample. The hypotonic sodium-phosphate/NaCl buffer of 35 mM concentration circulating with a flow rate of 300 ml/h during 30 min was optimal for conducting gradual hypotonic hemolysis. Under these conditions the process of gradual hemolysis resulted with a high hemolysis extent (>90%). Biochemical analysis revealed that protein and cholesterol content of isolated ghosts were nearly the same as in intact erythrocytes. Compared to starting erythrocytes, average diameter of the ghosts from both type of erythrocytes decreased for only 10%. These results indicate that isolated membranes have possibility to mimic the chemical and structural anisotropic environment of *in vivo* cell membranes, and this fact is of significance for drug diffusion and partition coefficients during encapsulation procedure.

In the next step, the gradual hypotonic hemolysis was evaluated as an encapsulation procedure for a model drug into the ghosts which were obtained in the previous experimental stage. A synthetic glucocorticoid, widely used anti-inflammatory drug, dexamethasone sodium phosphate (DexP), was selected as a model compound. The processing parameters of DexP encapsulation into the

ghosts-temperature, initial drug concentration, and cross-linker addition- were optimized. Incubation at 37°C and drug concentration of 0.12 mg/ml had statistically significant effect on loaded amount of DexP, resulting in encapsulation efficiency of 13-14%, i.e. 2-3% for porcine and bovine erythrocyte ghosts, respectively. Detailed morphological characterization (by AFM, SEM, and laser diffraction technique) revealed that DexP inclusion itself had no observable additional effect on the morphology of the ghost carriers, but indicated significant morphological differences between bovine and porcine ghosts. The differences in drug release kinetics between bovine and porcine DexP loaded ghosts were observed. Besides, the content of residual hemoglobin significantly influenced the drug release kinetics of both type of DexP loaded ghosts. A sustained drug release from DexP loaded ghosts was shown over 3 days from porcine ghosts and 5 days from bovine ghosts. Hence, DexP loaded erythrocyte membranes demonstrated strong possibility for usage as cell-like bio-derived delivery systems of DexP for different biomedical applications.

Keywords: *slaughterhouse blood; gradual hypotonic hemolysis; erythrocyte membranes; erythrocyte ghosts; dexamethasone sodium phosphate; drug delivery systems*

Scientific field: Technological engineering

Scientific discipline: Biochemical engineering and biotechnology

UDC number:

САДРЖАЈ

УВОД I	1
ТЕОРИЈСКИ ДЕО II	4
2.1. Савремени системи са продуженим/контролисаним ослобађањем активних супстанци базирани на ћелијама.....	5
2.2. Еритроцити.....	8
2.3. Различити приступи у коришћењу еритроцита и еритроцитних мембрана као носача лекова.....	11
2.4. Инкапсулација биолошки активних супстанци у еритроците и еритроцитне мембране: предности и недостаци.....	15
2.5. Методе за инкапсулацију биолошки активних супстанци у еритроците и еритроцитне мембране.....	18
2.5.1. Физичке методе инкапсулације.....	19
<i>Хипотонична хемолиза</i>	19
<i>Хипотонична дилуција</i>	20
<i>Хипотонично пре-бубрење</i>	21
<i>Хипотонична дијализа</i>	22
<i>Електроинкапсулација</i>	24
2.5.2. Хемијске методе инкапсулације.....	25
2.5.3. Биолошке методе инкапсулације.....	26
<i>Инкапсулација ендоцитозом</i>	26
<i>Инкапсулација липидном фузијом</i>	26
2.6. Примери биолошки активних супстанци инкапсулираних у еритроците и еритроцитне мембране.....	27
2.6.1. Васкуларна испорука биолошки активних супстанци инкапсулираних у еритроците и еритроцитне мембране.....	27
2.6.2. Испорука биолошки активних супстанци макрофагима и другим типовима ћелија посредством еритроцита или еритроцитних мембрана.....	32
<i>Супституциона терапија ензимима инкапсулираним у еритроците</i>	32
<i>Испорука антиинфективних агенаса и антигена</i>	33
<i>Испорука антиинфламаторних агенаса</i>	35

Испорука антитуморских агенаса.....	37
Испорука генетичког материјала.....	38
2.7. Могућност примене отпадног кланичног материјала као извора еритроцитних мембрана.....	39
2.8. Антиинфламаторни агенс дексаметазон као модел супстанца за инкапсулацију еритроцитне мембране.....	41
2.9. Други системи за продужено отпуштање дексаметазона.....	44
Липозоми.....	44
Хитозанске микросфере и филмови.....	45
Поли (d,l-лактид-ко-гликолид) наночестице.....	46
Други полимерни системи за продужено ослобађање дексаметазона.....	47
ЦИЉ РАДА III.....	49
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО IV.....	52
4.1. Материјали.....	53
4.1.1. Раствори.....	53
4.1.2. Биолошки материјал.....	54
4.2. Методе.....	54
4.2.1. Одређивање основних хематолошких параметара.....	54
4.2.2. Добијање суспензије „пакованих еритроцита“.....	54
4.2.3. Испитивање механичке фрагилности еритроцита.....	55
4.2.4. Тест осмотске фрагилности.....	56
4.2.5. Одређивање степена осмотског бубрења еритроцита.....	57
4.2.5.1. Модификована микрохематокритска метода за одређивање степена осмотског бубрења еритроцита.....	58
4.2.5.2. Одређивање степена бубрења еритроцита проточном цитометријом.....	59
4.2.6. Добијање еритроцитних духова процесом градуалне хемолизе.....	60
4.2.7. Електрофореза на натријум додецил сулфат полиакриламидном гелу.....	61
4.2.8. Микроскопска анализа еритроцита и еритроцитних духова.....	62
4.2.8.1. Светлосна микроскопија.....	62
4.2.8.2. Скенирајућа електронска микроскопија.....	62
4.2.8.3. Микроскопија атомских сила.....	63

4.2.9. Одређивање величине и расподеле величине еритроцитних духова методом ласерске дифракције	63
4.2.10. Тест везивања Анексина V.....	64
4.2.11. Одређивање концентрације холестерола у изолованим еритроцитним духовима.....	64
4.2.12. Одређивање укупног антиоксидативног капацитета и продуката липидне пероксидације.....	65
4.2.13. Инкапсулација дексаметазон -натријум-фосфата (DexP) у еритроцитне духове.....	65
<i>Параметри инкапсулације.....</i>	66
<i>Утицај концентрације раствора DexP на параметре инкапсулације.....</i>	66
<i>Утицај температуре на параметре инкапсулације.....</i>	67
<i>Праћење отпуштања лека.....</i>	67
4.2.14. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом	67
4.2.15. Припрема узорака за квалитативну и квантитативну анализу DexP инкапсулираног у говеђе и свињске еритроцитне духове	68
4.2.16. Квалитативна и квантитативна анализа DexP инкапсулираног у говеђе и свињске еритроцитне духове течном хроматографијом под ултра високим притиском са масеном спектрофотометријом.....	68
4.2.17. Статистичка анализа.....	69
РЕЗУЛТАТИ V	70
5.1. Основни хематолошки параметри отпадне кланичне крви.....	71
5.1.1. Говеђи и свињски еритроцити – хематолошки параметри.....	71
5.2. Испитивање механичке фрагилности еритроцита из говеђе и свињске кланичне крви.....	72
5.3. Испитивање осмотских карактеристика еритроцита из отпадне кланичне крви	73
5.3.1. Отпорност еритроцита из отпадне кланичне крви на осмотску хемолизу	73
5.3.2. Степен осмотског бубрења еритроцита из отпадне кланичне крви	77

5.3.2.1. Одређивање степена осмотског бубрења говеђих еритроцита микрохематокритском методом.....	77
5.3.2.2. Одређивање степена осмотског бубрења говеђих и свињских еритроцита проточном цитометријом.....	79
5.4. Добијање еритроцитних духова из отпадне кланичне крви градуалном хемолизом.....	86
5.4.1. Динамика ослобађања хемоглобина и “превођења” говеђих и свињских еритроцита у „духове“ процесом градуалне хемоллизе.....	86
5.4.2 Морфолошка и биохемијска анализа духова добијених градуалном хипотоничном хемолизом.....	90
5.4.2.1. Скенирајућа електронска микроскопија.....	90
5.4.2.2. Мерење и расподела величине говеђих и свињских еритроцита и духова методом ласерске дифракције.....	92
5.4.2.3. Испољавање фосфатидилсерина на површини мембране свињских и говеђих еритроцита и духова добијених градуалном хемолизом.....	93
5.4.2.4. Анализа протеинског профила мембрана еритроцита из кланичне крви добијених градуалном хемолизом.....	94
5.4.2.5. Анализа садржаја холестерола у духовима говеђих и свињских еритроцита добијених градуалном хемолизом.....	96
5.4.2.6. Анализа антиоксидативног капацитета и липидне пероксидације у духовима говеђих и свињских еритроцита добијених градуалном хемолизом.....	97
5.5. Инкапсулација DexP у говеђе и свињске еритроцитне духове.....	98
5.5.1. Инфрацрвена спектрофотометрија са Фуријеовом трансформацијом.....	98
5.5.2. Квалитативна и квантитативна анализа DexP инкапулираног у говеђе и свињске еритроцитне духове.....	100
5.5.3. Испитивање утицаја процесних параметара на ефикасност инкапсулације DexP у говеђе и свињске еритроцитне духове.....	103
5.5.4. Морфолошка анализа говеђих и свињских еритроцитних духова са инкапулираним DexP.....	106
5.5.4.1. Скенирајућа електронска микроскопија (FE-SEM).....	108
5.5.4.2 Микроскопија атомских сила (AFM).....	108

5.5.5. Отпуштање инкапсулираног DехР из говеђих и свињских еритроцитних духова.....	111
ДИСКУСИЈА VI.....	115
ЗАКЉУЧЦИ VII.....	133
ЛИТЕРАТУРА VIII.....	137
Прилог.....	157

УВОД

I

Примарни циљ фармацеутско-технолошког развоја јесте проналажење начина да се активна (лековита) супстанца преведе у облик и концентрацију/количину којима се постиже одговарајући терапијски одговор, контролише место и брзина ослобађања лековите супстанце у организму и смањују нежељени ефекти. Поступци који се користе за постизање овог циља су врло сложени и захтевају развој софистицираних система за испоруку активних супстанци (енгл. *drug-delivery systems*). Данас постоји велики број различитих система за испоруку лековитих супстанци развијених у складу са потребама апликације. Њихово стално усавршавање је постало неминовно због све већег броја захтева које један систем за испоруку активних супстанци мора да испуни како би могао да има биомедицинску примену.

Тренутно доступни системи за испоруку лековитих супстанци могу бити системи који представљају једноставне, растворљиве макромолекуле (као што су моноклонска антитела, растворљиви синтетски полимери, полисахариди и биодеградабилни полимери), али и много комплексније честичне вишеккомпонентне структуре (микрокапсуле, микрочестице, липозоми, липопротеини, ћелије и ћелијски духови). Системи за испоруку активних супстанци базирани на ћелијама, генерално, имају велику предност у односу на све до сада доступне природне или синтетске носаче, у смислу истовремене природне биокомпатибилност и функционализације преко специфичних површинских молекула. Највише истраживани и примењивани ћелијски носачи активних супстанци јесу еритроцити и еритроцитне мембране пореклом из хумане крви [1].

Аутологи (сопствени) еритроцити се примењују као ефикасни системи за циљану испоруку и продужено ослобађање лековитих супстанци [2,3]. Чињеница да је неколико протокола за инфузију лековитих супстанци инкапсулираних у еритроците тренутно у фази клиничког испитивања, илуструје огроман биомедицински значај ове области истраживања. Поред тога, савремене биотехнолошке методе за модификовање ћелијске мембране омогућавају да се у ове сврхе користе и имунолошки инкопатибилни (хетерологи) хумани еритроцити, а отвара се могућност коришћења и ксеногених (животињских) еритроцита [4]. Међутим, до сада није развијена

одговарајућа технологија која би омогућила коришћење животињских еритроцита у сврху носача активних компоненти. Наиме, таква технологија била би од великог значаја, нарочито имајући у виду да је расположива количина хуманих еритроцита (пореклом из крви добровољних давалаца која се због престарелости или неког недостатка не може користити за трансфузију крви) није велика.

Еритроцити из отпадне кланичне крви доступни су у огромним количинама, те је развој технологије за њихову примену у системима за испоруку и продужено ослобађање лековитих супстанци економски оправдан. Поред тога, развој оваквих технологија би допринео већем искоришћењу главног споредног производа месне индустрије, кланичне крви. Процењује се да кланице у процесу производње меса свакодневно стварају милионе тона процесног отпада чије депоновање представља велики проблем за прерађиваче. За третман овог отпада у развијеним земљама постоји строга законска регулатива за чије поштовање се издвајају значајна материјална средства. Наиме, данас се одбацивање споредних производа као отпада више не сматра ни еколошки добрим ни економски исплативим, посебно када се зна да овај „отпад“ садржи значајне количине драгоценог сировог материјала који има снажан потенцијал у стварању нових производа и функционалних састојака са додатном вредношћу. Опште је прихваћено мишљење да је пожељно и могуће да се сви споредни производи индустрије меса прераде у производе намењене за хуману и животињску исхрану, ђубриво, биодизел, па чак и лекове [5]. Управо због тога је предмет ове докторске дисертације развој процеса за изоловање говеђих и свињских еритроцитних мембрана („духова“) из отпадне кланичне крви, и развој и *in vitro* карактеризација система за продужено/контролисано ослобађање активних супстанци на бази добијених еритроцитних мембрана.

ТЕОРИЈСКИ ДЕО

II

2.1. САВРЕМЕНИ СИСТЕМИ СА ПРОДУЖЕНИМ/КОНТРОЛИСАНИМ ОСЛОБАЂАЊЕМ АКТИВНИХ СУПСТАНЦИ БАЗИРАНИ НА ЋЕЛИЈАМА

Системи за испоруку активних супстанци базирани на ћелијама, генерално, имају велику предност у односу на све до сада доступне природне или синтетске носаче у смислу истовремене природне биокомпатибилности и функционализације. Ове карактеристике система за испоруку лековитих супстанци базираних на ћелијама омогућавају им улогу вектора способних да несметано прођу кроз све биолошке мембране (анатомске, физиолошке, фагоцитне или инфламаторне), који не стварају агломерате и не мењају морфолошке и површинске карактеристике у физиолошким условима, који су отпорни на метаболичке процесе услед чега могу мењати фармакокинетичке параметре лековите супстанце и способни су да слободно пролазе кроз крвоток до тачно дефинисаног места у организму на ком лековита супстанца треба да испољи своје дејство. Са друге стране, и поред наведених карактеристика ове врсте носача, њихова примена у хуманој медицини је изузетно ограничена. Главни проблеми који спречавају ширу употребу ћелијских носача првенствено се односе на непостојање дефинисаног система складиштења, велику подложност контаминацији микроорганизмима и одсуство валидираних индустријских процедура за њихово процесирање у виду лека [1].

Системи за испоруку лековитих супстанци засновани на ћелијама се могу поделити у више категорија (слика 1).



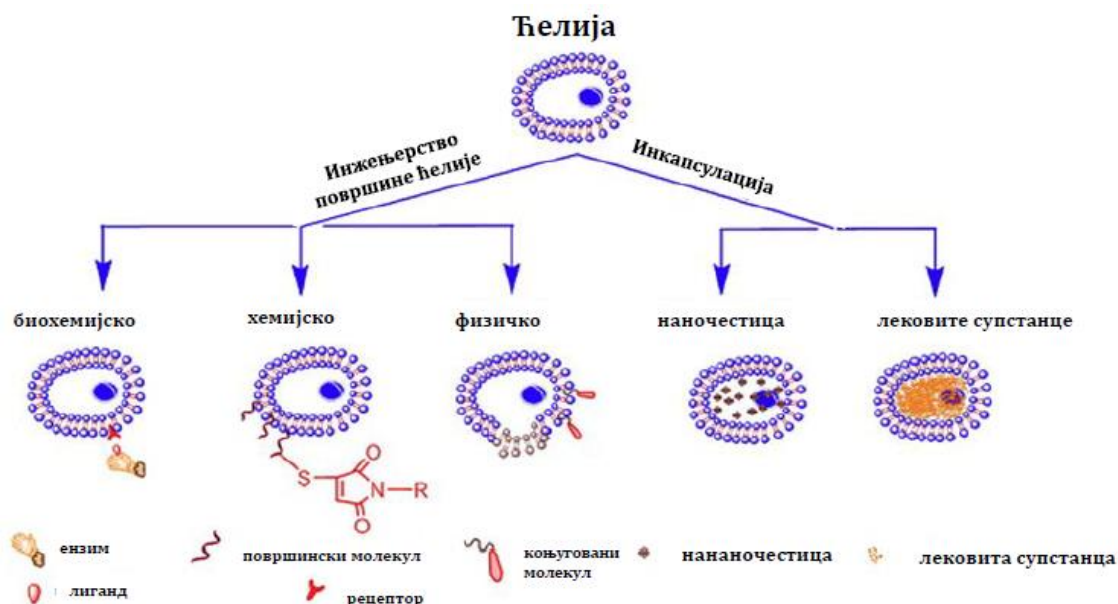
Слика 1. Схема класификације до данас коришћених система за испоруку лековитих супстанци заснованих на ћелијама

Генетички трансформисане ћелије могу бити различите врсте прокариотских и еукариотских ћелија код којих су одабрани гени интегрисани у геном ћелије домаћина уз коришћење различитих вектора, што омогућава експресију биолошки важних агенаса. Такође, циљне ћелије се увођењем гена могу учинити осетљивим на дејство одабраних лекова. Данас се трансформисане ћелије користе за продукцију цитокина и у неким случајевима за продукцију/ослобађање одређених ензима, што је од значаја код пацијената са ензимским дефицијенцијама. У табели 1 дат је кратак преглед, као илустрација примене трансформисаних ћелија за ослобађање биолошки активних супстанци [1]. Главни проблеми овог начина за испоруку биолошки активних супстанци у вези су са дужином трајања ефекта трансформисаних ћелија, безбедношћу њихове припреме због коришћења различитих вектора, и са дистрибуцијом трансформисаних ћелија у организму коју је тешко контролисати.

Табела 1. Неки примери генетички трансформисаних ћелија за испоруку биолошки активних супстанци [1]

Тип ћелије	Трансформисани ген
Мезенхимске матичне ћелије	Интерлеукин 10 (IL-10)
Неуралне прогениторске ћелије	Интерферон-бета
Епидермалне матичне ћелије	Ламинин 5
Хематопоетичне матичне ћелије	Арилсулфатаза А
Мезенхимске матичне ћелије	Интерлеукин 12 (IL-12)
Фибробласти	Супероксид дизмутаза
Хематопоетске ћелије	TNF-сродни апоптоза-индукујући лиганд (енгл: <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> - TRAIL)
Мишићне прогениторске ћелије	Фактор коагулације IX
Неуралне прогениторске ћелије	Арилсулфатаза А
Тромбоцити	VIII фактор коагулације
Неуралне матичне ћелије	Неуротрофин-3
Фибробласти	Интерферон алфа
Мишићне матичне ћелије	Коштани морфогенетски протеин 4

Ћелијски носачи не настају као резултат генетичког инжењерства ћелија, већ применом различитих физичких и хемијских метода (слика 2) које омогућавају да ћелије/ћелијски деривати добију нове терапијске функције [6]. Тако, ћелијски носачи ослобађају лековите супстанце у циркулацију или на одређено место у организму или могу циљано испоручити лековиту супстанцу другим ћелијама.



Слика 2. Схематски приказ различитих стратегија инжењерства ћелија у циљу испоруке лекова и терапије на бази ћелија [6]

До сада је испитивана могућност примене прокариотских (бактеријских) и еукариотских (углавном ћелија сисара) као носача лекова. Грам позитивне бактерије којима је уклоњена цитоплазма, а задржана морфологија и површинска антигенска структура коришћене су као препарати бактеријских мембрана, такозвани „духови“ [7]. Истраживања су показала да је употреба ових духова као адјувантних честица, тј. честица које заправо побољшавају имунски одговор на циљане антигене експримиране на духовима, могућа и успешна [7].

Међу сисарским ћелијама, макрофаги, матичне ћелије и еритроцити су се показали као посебно погодни за добијање система за контролисано/продужено отпуштање лекова. Захваљујући способности фагоцитозе макрофаги могу бити "напуњени" лековитом супстанцом

релативно једноставно, ингестијом наночестица. Макрофаги се лековитом супстанцом или контрастним средством „пуне“ *ex vivo* након чега се дају примаоцу. Највећи део таквих макрофага (74–81%) одмах се секвестрира у јетри и слезини (13–18%) [8] што чини да је систем за испоруку лекова заснован на макрофагима погоднији за циљано дејство него за системску испоруку лековите супстанце.

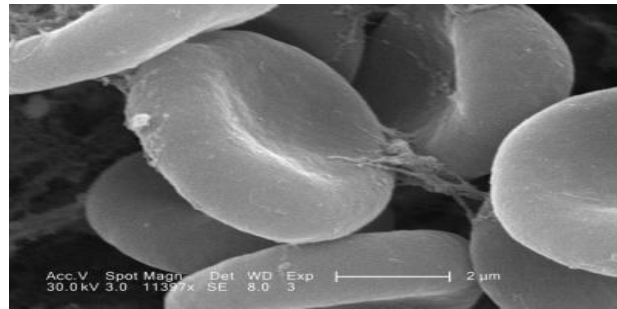
Матичне ћелије, и то примарно адултне матичне ћелије, су у литератури описане као потенцијални носачи лековитих супстанци [9]. Како нервне и мезенхимске матичне ћелије имају тропизам ка туморима, све више се испитују као могући системи за активну испоруку терапеутских и контрастних средстава у туморе [6]. Ипак, највећи број истраживања у вези са матичним ћелијама као носачима активних супстанци односи се на генетички модификоване матичне ћелије (табела 1).

Еритроцити и њихови деривати - мембране имају огроман потенцијал као носачи лекова у обезбеђивању циљане и продужене испоруке широког спектра биолошки активних супстанци, од конвенционалних лековитих супстанци до протеина [3,10,11]. Поред тога, значајна површина и запремина за инкапсулацију лековитих супстанци, висока биокомпатибилност и природни механизми за безбедну елиминацију еритроцита су атрактивне карактеристике еритроцита као система за преношење биолошки активних супстанци до циљних органа и ткива [3,10,11], што их чини до данас највише истраживаним ћелијским носачима.

2.2. ЕРИТРОЦИТИ

Еритроцити или црвена крвна зрнца, су најзаступљеније ћелијске компоненте крви (>99%) свих кичмењака. Један микролитар хумане крви садржи 5 милиона еритроцита, а једна особа у свом телу има приближно 30 хиљада милијарди еритроцита. Животни век хуманих еритроцита траје 100-120 дана, током којих они прелазе путању од ~250 km кроз кардиоваскуларни систем где функционишу као природни транспортери кисеоника захваљујући молекулу хемоглобина у њима. У једном еритроциту се просечно налази 270 милиона молекула хемоглобина. Еритроцити сисара немају једру. Хумани еритроцити имају запремину од приближно 95 μm^3 , а

површина им је $130 \mu\text{m}^2$. Имају облик биконкавног диска (слика 3), пречника $7 \mu\text{m}$ и дебљине $2 \mu\text{m}$. Овакав облик еритроцитима даје максималну еластичност и савитљивост, омогућавајући им да прођу и кроз веома уске капиларне просторе без руптуре ћелијске мембране. Осим прилагодљивости лумену капилара, овакав облик за последицу има и увећану површину што омогућава ефикасну и брзу размену гасова.

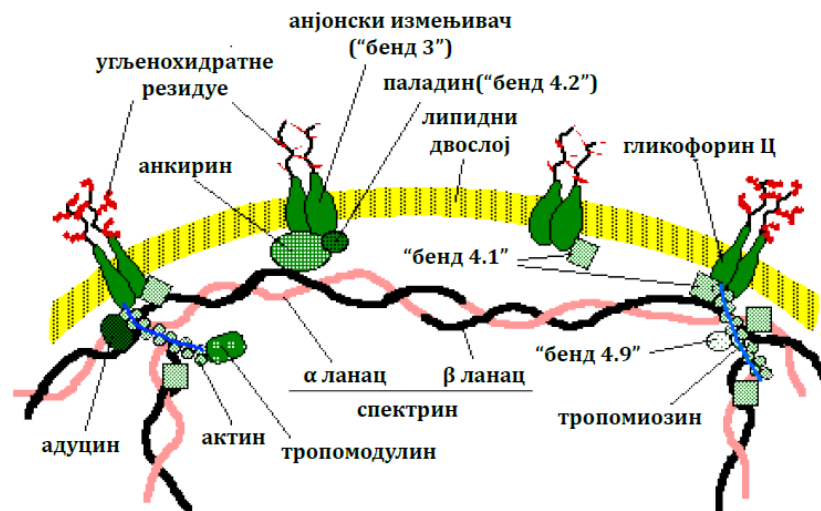


Слика 3. Електронска микрографија хуманих еритроцита

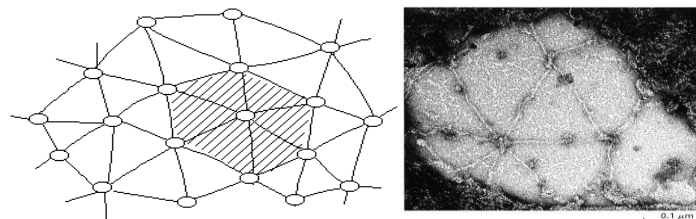
Нормално, еритроцити не подлежу екстравазацији из циркулације у ткива, осим у хепатичким синусима и интерстицијуму у фоликулима слезине, односно отворима ка циркулацији на местима стварања и елиминације еритроцита, која су део ретикулоендотелног система (РЕС). Макрофаге ретикулоендотелног система у слезини и јетри брзо и ефикасно фагоцитозом преузимају старе и оштећене еритроците и затим их разграђују лизозомалним ензимима.

Мембрана еритроцита изграђена је од 40% липида (фосфолипиди, холестерол, гликолипиди), 50% протеина и 10% угљених хидрата. Испод мембране се налази цитоскелет грађен од филамената протеина спектрина који градећи спектринску мрежу дају облик еритроциту (слика 4). Спектрински филаменти су преко протеина анкирина и трансмембранског протеина бенд 3 (енгл. *band 3*) повезани са мембраном. Оваквим повезивањем мембране и цитоскелета одржава се облик еритроцита. Динамичка регулација и адаптација цитоскелета одржавају морфолошку стабилност, пластичност и деформабилност еритроцита који су неопходни за милионе понављаних пролажења кроз уске капиларе [12].

А



Б



Слика 4. Структура мембране еритроцита А) Поједностављен схематски приказ пресека мембране еритроцита. Б) Изглед цитоскелета. Схематски приказ и електронска микрографија. Молекули спектрина формирају мрежу која се налази испод липидног двослоја и која се за мембрану еритроцита везују преко анкирина (елипсе). Основни облик ове мреже је шестоугао (осенчено) [12,13]

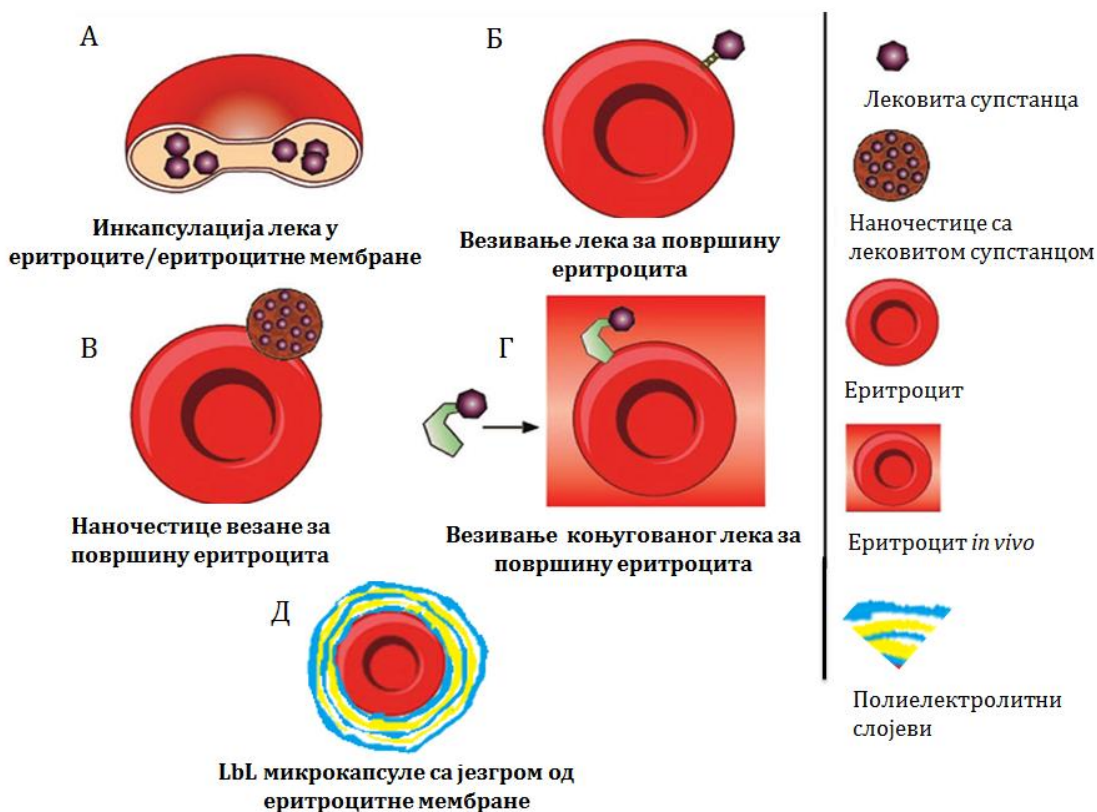
Као и код других врста ћелија, мембрана еритроцита представља асиметрични липидни двослој грађен од холестерола и фосфолипида. У овај липидни двослој интегрисани су трансмембрански протеини и протеини који су саставни део мембране, али не пролазе кроз липидни двослој. Спољашња површина мембране је благо негативно наелектрисана, углавном због анјонских компоненти интегралних и површинских гликопротеина удружених са плазмалемом еритроцита. Ова негативно наелектрисана спољна површина штити ћелијску мембрану од оштећења, прима сигнале из околне средине и успоставља комуникације између ћелија. Гликофорин А и бенд 3 су главни интегрални гликопротеини, али се у мембрани еритроцита налази више од 300 различитих протеина. Гликопротеини мембране на себи носе антигене детерминате, различитих система крвних група. Неки од ових

протеина имају кључне функције заштите еритроцита од оштећења и елиминације из крвотока имунским системом.

Еритроцити учествују у расподели и метаболизму више од 50 биолошки активних супстанци (нпр. каптоприл, халоперидол, хероин, тестостерон, инсулин, катехоламини, пенициламин, даунорубицин) [14]. Еритроцити тако „ненамерно“ служе као природне честице крви (компартамани) које учествују у фармакокинетици, биодистрибуцији, спором отпуштању, метаболизму и деловању различитих лековитих супстанци. Ипак „намерна“/циљана употреба еритроцита као носача за испоруку биолошки активних супстанци је од знатно већег интереса. Та област истраживања настала је раних седамдесетих година XX века, када је претпостављено да се дејство појединих лекова може побољшати инкапсулацијом у аутологе или имунолошки компатибилне донорске еритроците, који би након безбедног ињектирања у домаћина омогућили дејство лековите супстанце на тачно одређеном месту у организму и током продуженог временског периода [15]. Чињеница да је неколико протокола инфузије лекова инкапсулираних у еритроците тренутно у испитивању на људима, говори у прилог изузетном биомедицинском значају ове области истраживања [3].

2.3. РАЗЛИЧИТИ ПРИСТУПИ У КОРИШЋЕЊУ ЕРИТРОЦИТА И ЕРИТРОЦИТНИХ МЕМБРАНА КАО НОСАЧА ЛЕКОВА

На слици 5. приказане су главне стратегије за примену еритроцита и еритроцитних мембрана за испоруку лекова и других биолошки активних супстанци. Оне обухватају инкапсулацију активних супстанци у еритроците и празне еритроцитне мембране (А), везивање активне супстанце за површину еритроцитне мембране (Б), везивање наночестица са инкапсулираним леком на површину еритроцитне мембране (В), везивање коњугованог лека преко специфичних молекула на површини еритроцитне мембране *in vivo* (Г) и коришћење еритроцитних духова са инкапсулираним леком као језгра за формирање микрокапсула (модификовано према [16]).



Слика 5. Различити приступи у коришћењу еритроцита и еритроцитних мембрана као носача лекова (модификовано према [16])

Раних седамдесетих година XX века ова област истраживања добила је значајну пажњу и омогућила прва клиничка испитивања система за васкуларну испоруку активних супстанци инкапсулираних у еритроците. Овај приступ у коришћењу еритроцита (слика 5А) као носача лекова ограничен је на оне лекове који имају адекватну растворљивост у води и метаболичку стабилност према ензимима еритроцита, у случају да се користе интактни еритроцити [16]. Наведени приступ обухвата и инкапсулацију носача са леком у еритроците, што је показано на примеру хитозанских наночестица са леком натријум-валпроатом инкапсулираним у хумане еритроците [17]. Иако најстарији, приступ инкапсулације активних супстанци у еритроците/еритроцитне мембране има највећу примену и данас, и биће детаљно описан у поглављима 2.4., 2.5. и 2.6.

Посебан приступ у примени еритроцита као носача за интраваскуларну испоруку представља и коњугација фармаколошки активних супстанци на површину еритроцита преко молекула експримираних на њиховој површини (слике 5 Б, В, Г). Тако се за еритроците

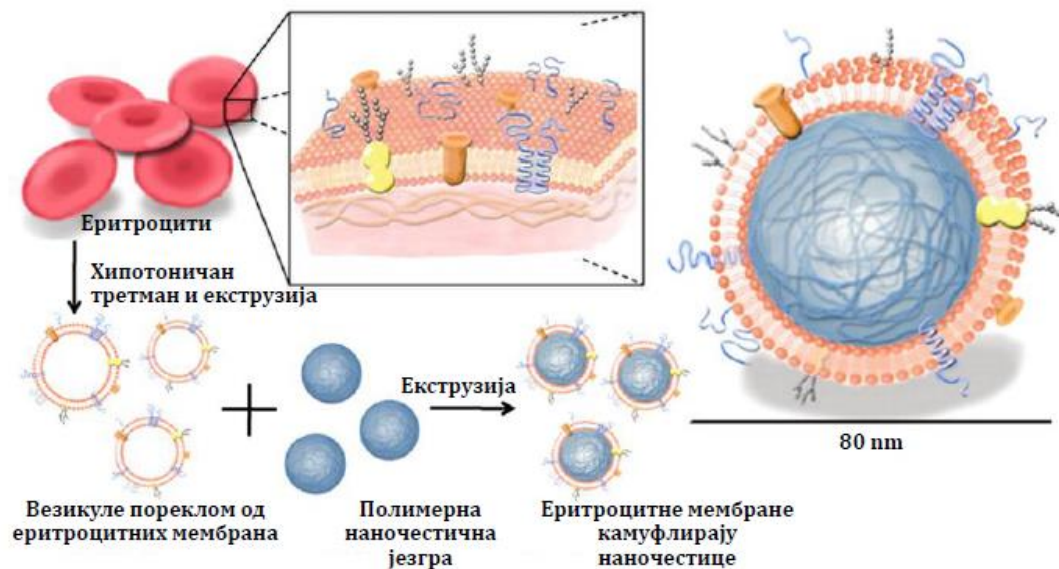
може рећи да су идеални носачи за тромболитичке агенсе [18] као што су клинички примењиви ткивни тип активатора плазминогена (tPA) и урокиназе (UPA). Молекули tPA коњуговани са еритроцитима задржавају се у циркулацији десет пута дуже него слободни tPA [19] и на моделу мишева показују знатно ефикасније ублажавање симптома исхемије мозга након можданог удара [20]. Протеински антигени везани за еритроците показали су се као ефикасни у окидању имунског одговора, указујући на потенцијал у развоју пептидних вакцина [21]. Поред тога, полимерне наночестице са леком успешно су коњуговане *ex vivo* за еритроците (слика 5B), што представља нову стратегија која комбинује предност дугог полуживота еритроцита и робустности полимерних наночестица [22]. Најновији приступи примене еритроцита као носача лекова подразумевају *in vivo* везивање лека за еритроците, тако што се прво лек коњугује за молекуле који имају специфичан афинитет везивања за еритроците (слика 5Г). Тако су активатори плазминогена коњуговани са полипептидом који по аминокиселинској секвенци одговара варијабилном фрагменту моноклонског антитела на гликофорин А, који се везује за трансмембрански протеин гликофорин А на површини хуманих еритроцита [23]. Такође, још један протеин ERY1 који је добијен помоћу бактериофага везује се за површину еритроцита са великом специфичношћу и уведен је као стратегија за побољшање фармакокинетичког профила протеина који се користе у терапијске сврхе [24]. Овај приступ везивања коњугованог лека за еритроците *in vivo* не захтева процедуру изоловања еритроцита и *ex vivo* манипулације, чиме се елиминише ризик од контаминације, али знатно повећавају трошкови, јер улазе у област персонализоване медицине.

Поред тога, релативно новија истраживања показала су успешну примену еритроцитних духова као језгра за формулацију вишеслојних полиелектролитних (енгл. *Layer by layer, LbL*) микрокапсула (слика 5Д) којима се обезбеђује продужено и контролисано отпуштање супстанце инкапсулиране у еритроцитне духове [25,26].

У савременој литератури описују се и системи названи *еритрозоми* и *нанозоми*: *Еритрозоми* представљају специфично пројектоване везикуларне системе који се састоје од умрежених еритроцитних цитоскелетона

обложених фосфатидилхолином. Овакве везикуле предложене су као системи за инкапсулацију макромолекула [27]. *Наноеритрозоми* су направљени екструзијом духова еритроцита при чему настају везикуле пречника од око 100 nm. За наноеритрозоме је, примера ради, помоћу глутаралдехида ковалентно везан даунорубицин, који је и *in vitro* и *in vivo* показивао већу активност него када је примењиван као неинкапсулирана супстанца [28,29].

Биомиметске особине аутологих еритроцитних мембрана успешно су искоришћене и за облагање наночестица поли(лактид-ко-гликолид) (PLGA) чиме је постигнуто њихово "маскирање" и дуже задржавање *in vivo*, избегавањем преузимања од стране макрофага и системског уклањања из организма (слика 6) [30].



Слика 6. Схематски приказ облагања наночестица поли(лактид-ко-гликолид) (PLGA) еритроцитним мембранама [30]

2.4. ИНКАПСУЛАЦИЈА БИОЛОШКИ АКТИВНИХ СУПСТАНЦИ У ЕРИТРОЦИТЕ И ЕРИТРОЦИТНЕ МЕМБРАНЕ: ПРЕДНОСТИ И НЕДОСТАЦИ

Прве експерименталне кораке у инкапсулацији неке супстанце у еритроците направио је Gardos 1953. године користећи аденозин-трифосфат (АТР) као модел супстанцу [31]. Marsden и Ostling су 1959. године инкапсулирали декстран молекулске масе од 10 до 250 kDa у еритроцитне духове [32]. Четрнаест година касније, прва испитивања инкапсулације лековите супстанце у циљу продужене васкуларне испоруке урадили су независно један од другог Ihler [15] и Zimmerman [33] и термин еритроцит носач (енгл. *erythrocyte carrier*) је 1979. године први пут употребљен да означи еритроцит са инкапсулираном лековитом супстанцом [2]. Како идеја о системима за продужену испоруку биолошки активних супстанци са циљаном специфичношћу већ деценијама задивљује научне кругове, за еритроците се може рећи не само да су изузетно атрактивни већ, посматрано са појединих аспеката, чак и јединствени носачи за испоруку биолошки активних супстанци. Поређење еритроцита носача са другим савременим системима за испоруку биолошки активних супстанци дато је у табели 2 [3]. Животни век еритроцита, од 100 до 120 дана код људи, превазилази друге системе за испоруку активних супстанци, нпр. "невидљиве" липозоме модификоване полиетиленгликолом (PEG), чији је пречник мањи од 100 nm, а животни век краћи од 10h. Такође, аутолози еритроцити представљају атрактивне носаче за интраваскуларну испоруку лековитих супстанци, јер је у њиховом случају знатно ограничена нежељена екстравазација [3].

Поред дугог полуживота и ограничене екстравазације, друге предности еритроцита као система за испоруку биолошки активних супстанци биле би следеће [3,10,11]: висок ниво биокомпатибилности, нарочито ако се за инкапсулацију користе аутолози еритроцити чиме се искључује могућност нежељеног активирања имунског система антигенима хетерологих еритроцита; потпуна биодеградабилност и чињеница да њиховом разградњом не настају токсични продукти; избегавање нежељеног имунског одговора на инкапсулирану биолошки активну супстанцу; пожељан опсег величине и релативно униформна величина и облик; својство

неометане циркулације кроз организам; спречавање деградације инкапсулиране активне супстанце ендогеним факторима; модификовање фармакокинетичких и фармакодинамичких параметара лековитих супстанци; значајно смањење флукуација концентрације лековите супстанце у плазми у поређењу са конвенционалним начинима администрације лекова; значајно повећање интервала између узимања лека јер лекови остају терапеутски активни у дужем временском периоду; могућност смањења споредних ефеката лекова; заштита организма од токсичних ефеката лековитих супстанци (од нпр. антинеопластика); способност преласка у органе ретикулоендотелног система (РЕС) и циљане испоруке лековите супстанце у ове органе.

Табела 2. Поређење еритроцита са другим системима за испоруку биолошки активних супстанци [3]

	Величина (nm)	Облик	Време полуживота у крви*	Прелазак у ткива
Еритроцити	5000–7000	Биконкавни диск	10–15 дана	Само у отворима РЕС-а
РЕГ-Липозоми	50–500	Сфере	3–6 сати	Тумори, друга патолошка ткива услед повећане пермеабилности, ендоцитоза
Полимерзоми	50–500	Сфере	10–20 сати	Тумори, друга патолошка ткива услед повећане пермеабилности, ендоцитоза
Филомицеле	40×20000	Филаменти	1–3 дана	Патолошка ткива услед повећане пермеабилности
Полимерне мицеле	20–300	Сфере	0,1–6 сати	Тумори, друга патолошка ткива услед повећане пермеабилности, ендоцитоза
Протеини и коњугати	5–5000	Неправилне сфере	10 минута – 6 сати	Дифузија и ендоцитоза

* Ради поређења дати су подаци о времену полуживота и преласку у ткива који су добијени на мишјем експерименталном моделу, јер за људе нису доступни сви подаци о наведеним носачима лекова приказаним у табели.

Примена еритроцита као носача биолошки активних супстанци има и недостатке [3,10,34]. Главни проблем представља њихово *in vivo* уклањање од стране органа РЕС-а услед оштећења на нивоу мембране или у унутрашњем садржају еритроцита (нпр. деплеције еритроцитних система за

складиштење и коришћење енергије, система за транспорт азот оксида и метаболизам) која настају током процеса инкапсулације. Та појава знатно скраћује животни век еритроцита носача у циркулацији, а у неким случајевима може проузроковати токсиколошке проблеме. Како је физиолошка улога макрофага РЕС-а и других фагоцита, елиминација остарелих и оштећених еритроцита, изузетно је тешко избећи преузимање и еритроцита носача од стране фагоцита и омогућити да инкапсулирана супстанца делује само унутар лумена васкуларног система. У циљу избегавања наведених проблема, највећи напори уложени су у испитивање механизма биокомпатибилности еритроцита, њиховог оштећења при процесу инкапсулације и начина чувања [35]. С друге стране, фагоцитоза еритроцита који су „ненамерно“ модификовани током процеса инкапсулације лековите супстанце од стране макрофага РЕС-а може послужити и као природни пут испоруке агенаса у те ћелије, што у смислу циљане испоруке лекова данас добија све већи значај и експерименталне потврде.

Инкапсулирани еритроцити су, за разлику од већине других системима за испоруку активних супстанци, носачи биолошког порекла, па стога могу показивати неке инхерентне варијације у својим карактеристикама. Под овим варијацијама подразумевају се разлике у величини, садржају хемоглобина, степену оксидативног оштећења, осмотској и механичкој фрагилности, а свака од њих може утицати на финалне карактеристике еритроцита као носача активне супстанце.

Складиштење инкапсулираних еритроцита представља додатни проблем, у циљу чијег превазилажења се данас испитују начини чувања еритроцита носача у изотоничним пуферима који садрже есенцијалне нутријенте (Mg^{2+} и Ca^{2+} јони из $MgCl_2$ и $CaCl_2$, АТФ, глукоза...), као и на ниској температури, уз додатак нуклеозида или хелатора, примена лиофилизације са глицеролом или гел имобилизације. Као отежавајуће факторе у раду са еритроцитима као носачима лекова, важно је истаћи и увек постојећу могућност контаминације у свакој фази процеса инкапсулације, да је неопходна посебна високоспецијализована опрема и окружење за извођење

процеса инкапсулације и да је неопходно спровођење ригорозне контроле у процедурама прикупљања и руковања са еритроцитима.

Узимајући у обзир све наведене предности и недостатке, еритроцити могу да служе као погодна врста носача за лековите супстанце које треба да испоље фармаколошко дејство у васкуларном систему или које треба да буду испоручене у ћелије које уклањају престареле еритроците из циркулације. У последње три деценије, значајни истраживачки напори улажу се како би се доказала исправност ове парадигме и успоставила клинички примењива стратегија за испоруку лековитих супстанци коришћењем еритроцита/еритроцитних мембрана као носача.

2.5. МЕТОДЕ ЗА ИНКАПСУЛАЦИЈУ БИОЛОШКИ АКТИВНИХ СУПСТАНЦИ У ЕРИТРОЦИТЕ И ЕРИТРОЦИТНЕ МЕМБРАНЕ

За инкапсулацију биоактивних супстанци у еритроците и еритроцитне мембране користе се три групе метода: хемијске, физичке и биолошке методе (слика 7). Хемијске методе омогућавају инкапсулацију активних супстанци услед промена у мембрани еритроцита под утицајем хемијских агенаса (уреа, етиленгликол, амонијум хлорид, халотан). У оквиру физичких метода, у литератури су до сада описане методе које се заснивају на примени електричног поља (нпр. електропулсација) и методе засноване на осмози које су и најшире коришћене методе. Биолошке методе подразумевају активацију неког од познатих биолошких феномена (ендоцитоза, липидна фузија) како би се извршила инкапсулација биоактивних супстанци у еритроците. Независно од тога која се метода користи, за ефикасну инкапсулацију потребно је да лековита супстанца буде растворна у води, отпорна на разградњу унутар еритроцита, да не ступа у физичке и хемијске интеракције са мембраном еритроцита и да има добро дефинисане фармакокинетичке и фармакодинамичке особине [2].



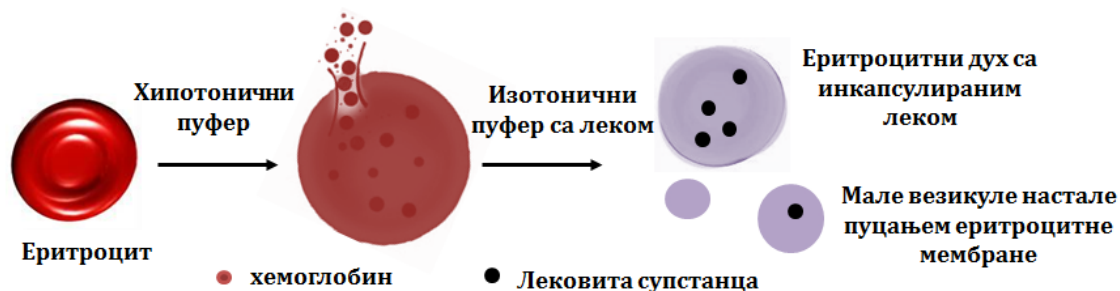
Слика 7. Преглед метода које се користе за инкапсулацију биоактивних супстанци у еритроците и еритроцитне мембране

2.5.1. ФИЗИЧКЕ МЕТОДЕ ИНКАПСУЛАЦИЈЕ

Хипотонична хемолиза

Метод хипотоничне хемолизе базира се на способности еритроцита да реверзибилно бубре у хипотоничним растворима. У хипотоничним растворима еритроцити бубре, облик им се мења од биконкавног ка сферном, при чему се ћелијама повећава запремина, али површина остаје константна [10, 36]. Пораст запремине еритроцита може бити од 25 до 50%. Хумани еритроцити у стању су да повећањем волумена компензују разлике у осмотском притиску између унутрашњости ћелије и спољашње средине све док осмоларитет околног раствора не падне на 150 mosM/kg када мембране еритроцита пуцају и ослобађа се ћелијски садржај. Непосредно пре него што ћелија лизира, на мембрани се формира тразниторни хемолитички отвор пречника 20-50 nm [36] и кроз њега излази хемолитички садржај. После хемолизе ћелије, заостају празне мембране еритроцита или “духови” еритроцита [2,37,38] (слика 8). Коришћење празних еритроцитних мембрана као носача биоактивних супстанци је могуће јер се након пребацавања у изотоничне услове хемолитички отвори затварају, делимично се враћа оригиналан биконкаван облик, а мембране поново постају непропусне. Главни недостатак хипотоничне хемолизе јесте неконтролисаност процеса због наглог излагања еритроцита хипотоничним пуферима, при чему долази

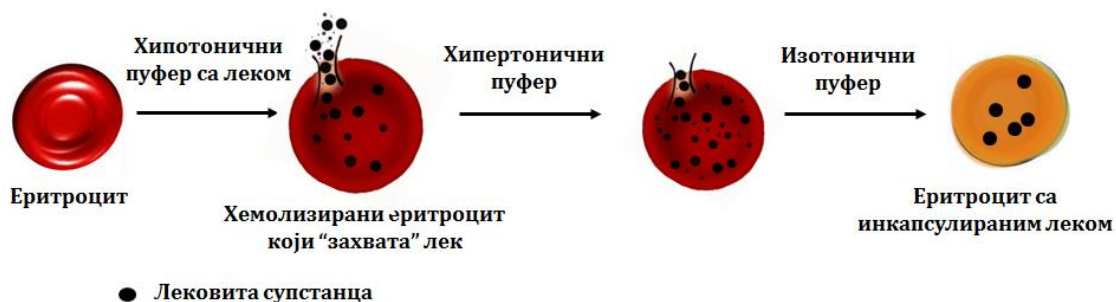
до неизбежног пуцања мембране еритроцита и формирања малих везикула (слика 8). Везикуле настале од мембране еритроцита могу се формирати и у супротној структурној организацији липидног двослоја мембране од полазног еритроцита, стварајући тзв. "извнуте" везикуле (енгл. *inside-out*). Описани недостатак може се превазићи градуалним увођењем хипотоничног пуфера у суспензију еритроцита [38-40].



Слика 8. Схематски приказ хипотоничне хемоллизе и настанка духова и малих везикула

Хипотонична дилуција

Хипотонична дилуција (слика 9) била је први испитан метод за инкапсулацију хемијских једињења унутар еритроцита, и истовремено представља и најједноставнији и најбржи метод инкапсулације [15]. Метод се изводи тако што се суспензија пакованих хуманих еритроцита разблажује са 2-20 пута већом запремином воденог раствора лековите супстанце која се инкапсулира. Након процеса "захватања" лековите супстанце из хипотоничне средине, тоничност раствора се опет успоставља додавањем хипертоничног пуфера. Добијена ћелијска смеша се центрифугира, одлива се супернатант и талог испира раствором изотоничног пуфера. Овим методом добијају се тзв. "мртви еритроцити или бели духови" [2]. Недостатак ове методе представља слаба ефикасност инкапсулације [41]. Овај метод примењен је за инкапсулацију ензима као што су β - галактозидаза и β - глюкозидаза [15] и аспарагиназа [42], као и бронходилататора салбутамола [43].



Слика 9. Схематски приказ хипотоничне дилуције као методе за инкапсулацију активне супстанце у еритроците

Хипотонично пре-бубрење

Овај метод заснива се на иницијалном контролисаном бубрењу еритроцита у раствору хипотоничног пуфера [2], након чега се они издвајају центрифугирањем на малим брзинама. Супернатант се одбацује, а фракција ћелија доводи до тачке лизирања додавањем мале порције воденог раствора лековите супстанце која би требало да буде инкапсулирана. Смеша се центрифугира између корака додавања лековите супстанце. Изотоничност ћелијске смеше успоставља се додавањем хипертоничног пуфера. Суспензија ћелија се затим инкубира на 37°C да би се затворили хемолитички отвори (слика 10). Овај метод је једноставнији и бржи него друге методе инкапсулација и узрокује минимално оштећење ћелија [44]. Супстанце које су релативно успешно инкапсулиране овом методом су инсулин [45], примакин [46] и еналаприлат [47].



Слика 10. Схематски приказ хипотоничног пре-бубрења као методе за инкапсулацију активне супстанце у еритроците

Хипотонична дијализа

Метода хипотоничне дијализе је први пут употребљена 1977. године од стране истраживача DeLoach и Ichler [41] за инкапсулацију ензима и липида. У овом процесу, суспензија еритроцита у изотоничном пуферу са вредностима хематокрита 70-80% се ставља у црево за дијализу и затим потапа у 10-20 већу запремину хипотоничног пуфера и дијализира 2 сата уз непрекидно мешање. По истеку овог времена изотоничност у цреву се поново успоставља додавањем хипертоничног пуфера у околни медијум или заменом хипотоничног медијума изотоничним. Биолошки активна супстанца која се инкапсулира може бити растворена у изотоничном пуферу унутар црева за дијализу на почетку експеримента, или дифундовати у дијализну врећу из околног хипотоничног пуфера. Инкапсулиране ћелије имају полуживот једнак полуживоту нормалних ћелија. Овај метод има високу ефикасност инкапсулације реда 30-50%, по завршеном процесу добија се 70-80% од почетног броја ћелија, а сам процес инкапсулације је погодан за аутоматско контролисање процесних променљивих [48].

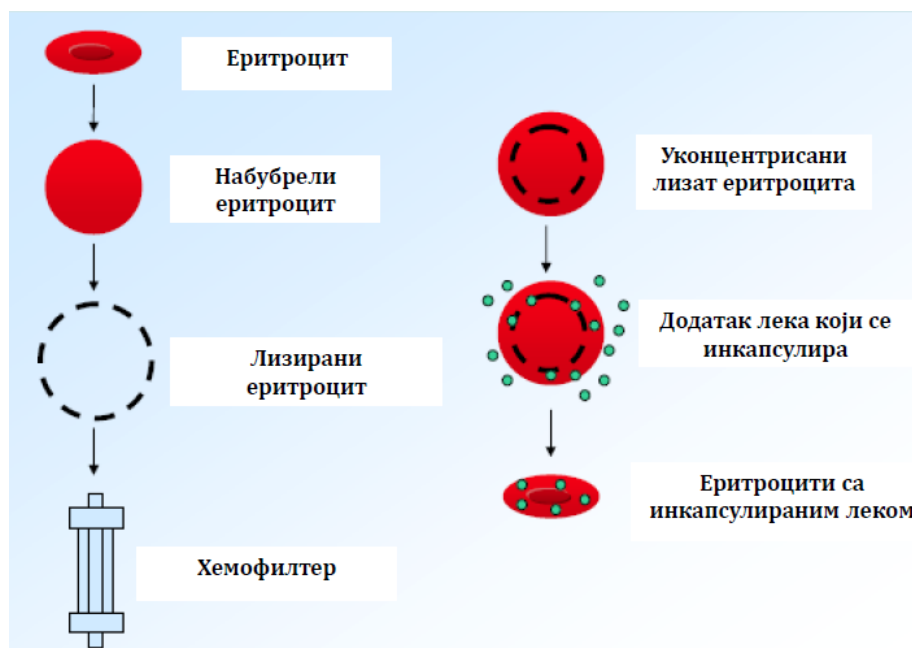
Недостаци ове методе су релативно дуго трајање и потреба за посебно конструисаном опремом (слика 11). Magnani и сарадници [36], развили су процедуру за инкапсулацију „недифузивних лекова” (поларне супстанце које по правилу не дифундују кроз интактне мембране) у хумане еритроците, која се заснива на две узастопне хипотоничне дилуције еритроцита праћене уконцентрисавањем са хемофилтерима, након чега се додаје лек и врши финално затварање еритроцита (слика 12). Метода је примењена за инкапсулацију супстанци попут ензима аспарагиназе [49], пестицида дифлуоробензорана [41], рекомбинантног хуманог еритропоетина [50], и агенаса који спречавају репликацију HIV вируса [51].

Захваљујући описаном уређају који је у Европи одобрен као медицински уређај [52], омогућена је инкапсулација лекова у аутологе еритроците под условима који се спроводе у трансфузиолошким центрима. Тако је дексаметазон-натријум-фосфат инкапсулиран у аутологе еритроците одобрен за клиничка испитивања у третману неколико инфламаторних болести: хроничне опструктивне болести плућа [53], цистичне фиброзе [54], инфламаторне болести црева [55-58]. Власник ове иновације данас

представља компанија Ery Del из Урбина у Италији [59] у којој се налази новији модел уређаја "Red Cell Loader" (слика 13).



Слика 11. Посебно конструисани уређај "Red cell loader" за извођење хипотоничне дијализе [36]



Слика 12. Схематски приказ методе хипотоничне дијализе која се изводи применом "Red cell loader" [36]

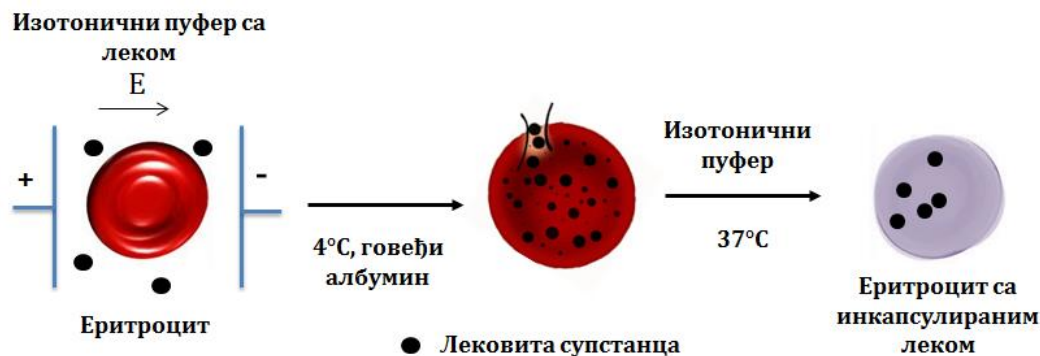


Слика 13. Тренутна медицинска опрема са „СЕ“ ознаком којом се врши инкапсулација лекова у аутологе еритроците на репродукцибилан и поуздан начин у компанију EryDel S.p.A. А) уређај "Red Cell Loader", Б) стерилни и апиروجени комплет материјала за једнократну употребу [52]

Електроинкапсулација

Електропорација је поступак заснован на чињеници да електрични шок изазива иреверзибилне промене у еритроцитној мембрани, што је употребљено за инкапсулацију лековитих супстанци. У овом поступку суспензија еритроцита (припремљена у изотоничном пуферу у коме је растворена лековита супстанца која ће се инкапсулирати) се поставља у комору са електричним пражњењем (слика 14). Кондензатор у спољашњем електричном колу се пуни до дефинисаног напона и онда празни, у оквиру дефинисаног времена, у суспензију преко капиларне млазнице. Оптимални интензитет електричног поља је између 1-10 kW/cm и оптимално време пражњења износи 20-160 μ s. Између интензитета електричног поља и времена пражњења постоји реципрочан однос. Карактеристичан пречник пора створених на мембрани зависи од интензитета електричног поља, времена пражњења и јонске јачине медијума у коме су еритроцити суспендовани [10]. Проблем који се јавља при извођењу овог поступка је лизирање ћелија од стране колоидног макромолекулског садржаја ћелија до кога долази због повећања осмотског притиска. У циљу спречавања нежељеног лизирања, у суспензију еритроцита додају се молекули веће

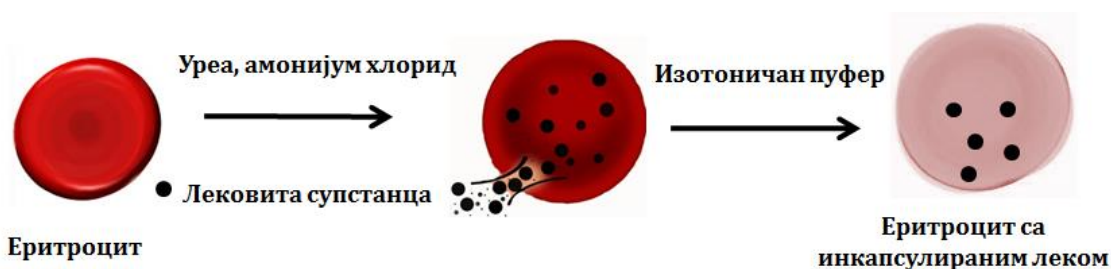
молекулске масе (нпр. тетрасахарид стахиоза и албумин из говеђег серума). Након завршеног поступка, поре се затварају инкубацијом еритроцита на 37°C у изотоничном раствору. У односу на осмотске поступке, дистрибуција инкапсулираних ћелија добијених овом методом је униформнија. Главни недостаци који онемогућавају широку примену ове методе су потреба за посебном инструментацијом и софистицираност процеса [10].



Слика 14. Схематски приказ методе електроинкапсулације као методе за инкапсулацију активне супстанце у еритроците

2.5.2. ХЕМИЈСКЕ МЕТОДЕ ИНКАПСУЛАЦИЈЕ

Овај метод је познат и као метод осмотске пулсације или хемијске пертурбације, а подразумева изоосмотску хемолизу, тј. хемолизу у изотоничним условима која се постиже различитим хемијским средствима. Ако су еритроцити инкубирани у раствору са супстанцом која има способност пермеабилитације мембране (као што су уреа, PEG, амонијум хлорид...) растворена супстанца ће дифундовати у ћелије због концентрационог градијента (слика 15). Овај процес праћен је инфлуксом воде да би се одржала осмотска равнотежа. Велики недостатак ове методе је то што супстанце за пермеабилитацију доводе до промена мембране еритроцита. Овај поступак је примењен за инкапсулацију антинеопластичног лека дауномицина у хумане и мишје еритроците [60].



Слика 15. Схематски приказ хемијске методе за инкапсулацију активне супстанце у еритроците

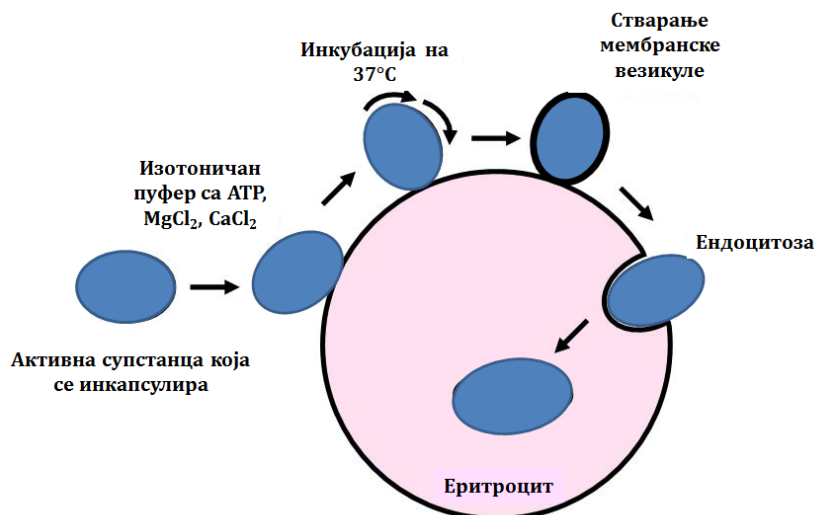
2.5.3. БИОЛОШКЕ МЕТОДЕ ИНКАПСУЛАЦИЈЕ

Инкапсулација ендоцитозом

Да би се биолошки активне супстанце "убациле" унутар еритроцита ендоцитозом једна запремина пакованих еритроцита се инкубира у девет запремина пуфера који садржи 2,5 mM ATP, 2,5 mM MgCl₂ и 1 mM CaCl₂, два минута на собној температури [48]. Створене поре се затим затварају у 154 mM NaCl, инкубацијом на 37°C, два минута. На овај начин, биолошки активне супстанце бивају инкапсулиране унутар еритроцита у мембранским везикулама (слика 16). Мембрана везикуле раздваја материјал унет ендоцитозом од цитоплазме и на тај начин га штити од литичког дејства унутарћелијских компоненти еритроцита [48].

Инкапсулација липидном фузијом

У литератури је показано да липидне везикуле које садрже лековиту супстанцу могу бити директно спојене са хуманим еритроцитима. Ова техника је коришћена за инкапсулацију инозитол-монофосфата у циљу побољшања капацитета еритроцита за пренос кисеоника. Међутим, ефикасност инкапсулације је веома мала, приближно 1% [2].



Слика 16. Схематски приказ ендцитозе као методе за инкапсулацију активне супстанце у еритроците

2.6. ПРИМЕРИ БИОЛОШКИ АКТИВНИХ СУПСТАНЦИ ИНКАПСУЛИРАНИХ У ЕРИТРОЦИТЕ И ЕРИТРОЦИТНЕ МЕМБРАНЕ

Из крајње поједностављене, практичне тачке гледишта, за еритроците се каже да личе на трајне путне торбе од еластичног материјала које је створила мајка природа [3]. Оваквим сликовитим приказом може се објаснити зашто су први кораци у испитивању карактеристика еритроцита као носача биолошки активних супстанци, направљени управо инкапсулацијом активне супстанце у циљу обезбеђивања продуженог ослобађања у васкуларном систему.

2.6.1. ВАСКУЛАРНА ИСПОРУКА БИОЛОШКИ АКТИВНИХ СУПСТАНЦИ ИНКАПСУЛИРАНИХ У ЕРИТРОЦИТЕ И ЕРИТРОЦИТНЕ МЕМБРАНЕ

Циљ продуженог ослобађања активних супстанци у циркулацији јесте смањење учесталости дозирања, чиме се смањују флукуације концентрације лека у плазми, повећа ефикасност лека и смањују дозно-зависни нежељени ефекти. До данас је велики број фармаколошки активних супстанци и агенаса за визуелизацију инкапсулиран у еритроците у циљу њиховог продуженог ослобађања у циркулацији. На пример, испитана је инкапсулација различитих ензима и флуоресцентних боја [61], еритропоетина за продужену

стимулацију хематопоезе [50], инозитол-хексафосфата који као кофактор хемоглобина побољшава капацитет преноса кисеоника [62], антикоагуланса хепарина [63], антибиотика амикацина који се користи у терапији менингитиса, пијелонефритиса и ендокардитиса [64,65], инсулина као хипогликемика [66], флуоро-аденозин-монофосфата [67] и метотрексата у хемотерапији канцера [68], гадолинијума који се користи као контрастно средство за магнетну резонанцу [69], антисенс олигонуклеотида [70] и плаزمида ДНК за генску терапију [71], чак и магнетних наночестица [72].

Ове студије нису увек дале очекиване резултате, углавном због нежељеног, ненамерног оштећења носача еритроцита које се дешава при самој инкапсулацији, што је за последицу имало компромитовану/смањену/измењену биокомпатибилност и доводило до варијабилности у степену инкапсулације [61]. На пример, слободан еритропоетин и еритропоетин инкапсулиран у еритроците показали су сличне фармаколошке ефекте након давања мишевима. Иако је деловање еритропоетина инкапсулираног у еритроците престало у плазми након мање од једног дана после ињектирања, показана је релативно продужена циркулација еритроцита са инкапсулираним еритропоетином, са временом полуживота у крви од ~ 6 дана [50]. Слични резултати добијени су и у испитивању еритроцита са инкапсулираним магнетним наночестицама, чија циркулација је детектована и након недељу дана од интраперитонеалног ињектирања у мишеве [72].

Сматра се да само минимално промењени еритроцити са инкапсулираном активном супстанцом, могу имати продужено време циркулације [3], и да такви непромењени еритроцити могу избећи брзу фагоцитозу од стране макрофага РЕС. Пројектовањем тзв. "нетрауматских процеса" за инкапсулацију еритроцита и коришћењем додатних мера опреза (нпр. уклањање субпопулације остарелих еритроцита из суспензије) омогућено је да се добију формулације инкапсулираних еритроцита који показују висок степен биокомпатибилности и фармакокинетику сличну интактним еритроцитима. Успешност оваквог приступа показана је у испитивањима на животињским моделима [50]. На овај начин се остварује значајно продужење полувремена живота у циркулацији супстанци

инкапсулираних у еритроците, у поређењу са неинкапсулираним супстанцама које су примењене на истоветан начин.

Како теоретски, минимално промењени еритроцити могу имати продужено време циркулације, први кораци у *in vivo* испитивању активних супстанци инкапсулираних у еритроците извршени су на моделима супстанци које имају способност деградације токсичних једињења присутних у циркулацији. Услед ограниченог капацитета инкапсулације еритроцита, потентни и специфични ензими за детоксикацију су се показали као много ефективнији „терет“ за инкапсулацију у еритроците од неензимских антидота као што је нпр. глутатион [73]. Тако је до данас, са циљем испитивања те хипотезе, више од десет различитих ензима за детоксикацију инкапсулирано у еритроците носаче, укључујући уриказу за елиминацију мокраћне киселине [74], тиосулфат-цијанид сулфотрансферазу која преводи цијаниде у мање токсичне тиоцијанате [75], фосфотиоестеразе које антагонизују органофосфатна једињења, попут отрова параоксона [76], алкохолну оксидазу и алкохолну дехидрогеназу за елиминацију метанола и других токсичних алкохола [77,78], L-аспарагиназу [79] и друге ензиме. Деривати појединих ензима добијени модификацијом са полиетиленгликолом (PEG-ензими, делимично маскирани од имунског система), такође су инкапсулирани у хумане, мишје и овчије еритроците [80]. Примери најважнијих ензима за детоксикацију који су успешно инкапсулирани у еритроците, дати су у табели 3.

Главни недостатак примене еритроцита као носача активних супстанци које своје дејство треба да испоље унутар лумена васкуларног система, представља то што процес инкапсулације неизбежно проузрукује одређена оштећења на мембрани или у унутрашњем садржају еритроцита (нпр. деплецију еритроцитних система за складиштење и коришћење енергије, система за транспорт азот оксида и метаболизам). Макрофаги PЕС-а и други професионални фагоцити који уклањају остареле и оштећене еритроците представљају природну мету за еритроците са инкапсулираном активном супстанцом, тако да је изузетно тешко избећи преузимање носача еритроцита од стране фагоцита и омогућити да инкапсулирана супстанца делује само унутар лумена васкуларног система. У циљу избегавања

наведених проблема, највећи напори су уложени у испитивање механизма биокомпатибилности еритроцита, њиховог оштећења при процесу инкапсулације и начина чувања [35].

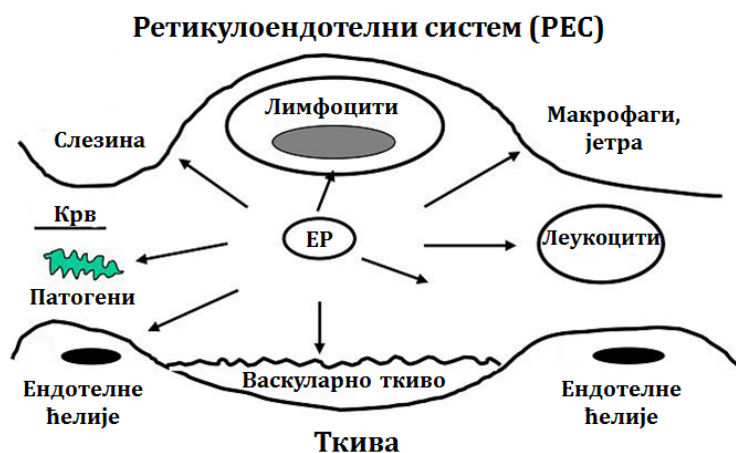
Табела 3. Ензими за детоксикацију инкапсулирани у еритроците [3]

Ензим	Величина	Функција	Терапијска примена	Ниво развоја	Реф.
Карбоанхидраза	30 kDa	Преводи CO ₂ у бикарбонат	Детоксикација CO ₂	<i>In vitro</i> испитивања	[61]
Уриказа	33 kDa	Оксидација мокраћне киселине	Детоксикација мокраћне киселине	Испитивања на мишевима	[74]
Тиосулфат-цијанид сулфо-трансфераза	37 kDa	Преводи цијаниде у тиоцијанате	Детоксикација цијанида	Испитивања на животињама	[75]
Алкохолна оксидаза	140–600 kDa	Преводи алкоhole у алдехиде	Детоксикација алкоhole	Испитивања на мишевима	[77]
Алкохолна дехидрогеназа	80 kDa	Преводи алкоhole у алдехиде и кетоне	Детоксикација алкоhole	Испитивања на мишевима	[78]
Глутамин синтаза	Није униформна	Формира глутамин из глутамата и амонијака	Детоксикација амонијака	Испитивања на животињама	[81]

Промене мембране еритроцита које настају током процеса инкапсулације активних супстанци сличне су нормалним физиолошким променама мембране које настају током животног века еритроцита. Те промене подразумевају конформационе промене и груписање главних мембранских гликопротеина гликофорина А и бенда 3, што доводи до дисфункције цитоскелета, губитка пластичности и механичке стабилности еритроцита. Поред тога повећава се осетљивост еритроцита на лизирање дејством оксиданата и „откривају“ места (епитопи) за које се везују „природна“ антиеритроцитна антитела нормално присутна у циркулацији, а која делују као опсонини који олакшавају фагоцитозу оштећених еритроцита у ћелијама RES-а. Излагање фосфатидилсерина из унутрашњег слоја мембране еритроцита и других компоненти које се нормално не налазе на површини еритроцита појачава описане процесе и представља предиспозицију за адхезију еритроцита на ендотел. Такође, ненамерна

инактивација специфичних површинских гликопротеина који инхибирају комплемент (нпр. DAF i CD59) и маскирање молекула CD47, услед чега их фагоцити не могу препознати, додатно умањује биокомпатибилност еритроцита носача [3]. Све описане промене у мембрани и цитоскелету смањују пластичност еритроцита и њихову отпорност на осмотска и механичка оштећења. Услед осмотске или механичке лизе еритроцити агрегирају, покрећу се имунске реакције, еритроцити бивају преузети од стране других ћелија, адхерирају на ендотел и улазе у микроциркулацију. Све те појаве ометају испоруку активне супстанце инкапсулиране у еритроците и могу проузроковати озбиљна оштећења типична за интраваскуларне хемолize, укључујући акутне васкуларне и реналне реакције на слободни хемоглобин, и токсичне ефекте строме еритроцита на PЕC макрофаге. Са друге стране, брза фагоцитоза промењених еритроцита представља директан и ефикасан начин за интрацелуларну испоруку инкапсулиране активне супстанце, под условом да инкапсулирани еритроцити претходно нису разорени системом комплемента у циркулацији.

Поред употребе еритроцита као носача у циљу обезбеђивања продужене циркулације и испоруке активних супстанци које би требало да делују управо унутар васкуларног лумена, данас све већи значај и експерименталне потврде добија циљана испорука активних супстанци фагоцитним ћелијама у крви или органима PЕC применом еритроцита носача (слика 17), што је детаљно описано у наредном поглављу 2.6.2.



Слика 17. Схематски приказ доступних места дејства биолошки активних супстанци инкапсулираних у еритроците, EP-еритроцит [3]

2.6.2. ИСПОРУКА БИОЛОШКИ АКТИВНИХ СУПСТАНЦИ МАКРОФАГИМА И ДРУГИМ ТИПОВИМА ЋЕЛИЈА ПОСРЕДСТВОМ ЕРИТРОЦИТА ИЛИ ЕРИТРОЦИТНИХ МЕМБРАНА

Модификација еритроцитних површинских антигена и пластичности мембрана у целини доводи до њихове брзе фагоцитозе од стране макрофага РЕС-а [82,83], чиме се обезбеђује механизам испоруке инкапсулираних биолошки активних супстанци у лизозоме макрофага и других врста ћелија са способношћу активне интернализације микрочестица. Овај приступ је на пример, омогућио да се од еритроцитних мембрана произведу микрочестице којима је олакшана испорука цитотоксичних агенаса у малигне ћелије [21,84,85].

Супституциона терапија ензимима инкапсулираним у еритроците

Прва испитивања у области примене еритроцита као носача за испоруку биолошки активних супстанци била су фокусирана на инкапсулацију ензима у еритроците у циљу детоксикације токсичних једињања присутних у циркулацији (поглавље 2.6.1), али и ензимске супституционе терапије код урођених ензимских дефицијенција. Наиме, како су ензими инкапсулирани у еритроците услед неизбежних промена на мембрани током процеса инкапсулације предодређени за брзу фагоцитозу и ефикасно преузимање и доспевање у лизозоме [86], овај приступ је искоришћен за лечење лизозомалних болести таложења (табела 4).

Једна од најчешћих урођених болести таложења је Гошеова болест, у чијој основи је мутација гена који кодира ензим глюкоцереброзидазу (лизозомални хидролитички ензим). Тако су први покушаји терапијске примене ензима инкапсулираних у еритроците били инкапсулација β -глюкоцереброзидазе [86], глукуронидазе [87] и галактозидазе [15] за лечење Гошеове болести. Ензими инкапсулирани у еритроците показали су стабилну активност и доспевали су у ћелије *in vitro* [86]. Испитивања на животињама показала су релативно ефикаснију испоруку ензима инкапсулираних у еритроците у поређењу са слободним ензимима, упркос веома ограниченом капацитету циркулације инкапсулираних система [87]. Ограничена клиничка испитивања касних седамдестих година нису показала токсичне ефекте

глукоцереброзидазе инкапсулиране у еритроците код одраслих пацијената са напредним типом Гошеове болести, али је терапијски ефекат био скромног и пролазног карактера [88]. Недавно је ензимска супституциона терапија применом еритроцита као носача испитана на примеру тимидин-фосфорилазе код пацијената са генетском дефицијенцијом овог ензима у митохондријама; третман је побољшао резултате биохемијских анализа, али се нажалост клиничко стање пацијента није побољшало [89].

Табела 4. Примери ензима инкапсулираних у еритроците који су коришћени за супституциону терапију ензимима код лизозомалних болести таложења

Ензим	Величина	Функција	Терапијска примена	Ниво развоја
Галактозидаза	464 kDa (тетрамер)	Разлагање галактозида (шећера, липида, протеина)	Лизозомални поремећај таложења	Испитивања на приматима
Глукуронидаза	80 kDa	Разлагање хепарина, мукополисахарида	Гошеова болест	Испитивања на глодарима
Глукоцереброзидаза	60 kDa	Разлагање бета-глукозида	Гошеова болест	Испитивања на људима
Тимидин фосфорилаза	100 kDa	Превођење тимидина и фосфата у тимин и 2-деокси-алфа-D-рибозу 1-фосфат	Генетска митохондријална дефицијенција	Испитивања на људима
L-аспарагиназа	80kD	Хидролиза аспарагина у аспартамску киселину	Ерадикација аспарагин-зависних тумора	Испитивања на мишевима, мајмунима и људима
Аденозин деаминаза	47 kD	Разградња аденозина	Код пацијената са дефицијенцијом аденозин деаминазе	Испитивања на људима

Испорука антиинфективних агенаса и антигена

Фагоцитоза еритроцита ненамерно модификованих током процеса инкапсулације лековите супстанце од стране макрофага РЕС-а може послужити и као природни пут испоруке агенаса за елиминацију интрацелуларних микроорганизама (вируса, бактерија, паразита) у тим ћелијама [21]. На пример, антивиротик азидотимидин који се користи у терапији HIV инфекције инкапсулиран је у еритроците у циљу испоруке у

макрофаге и показао је појачани антивирусни ефекат у односу на слободну лековиту супстанцу. Овај резултат добијен је у *in vitro* експериментима на културама ћелија [85] и потврђен *in vivo* на моделу миша са HIV инфекцијом [90]. Охрабрујући резултати добијени су и у случају других антивиrotика инкапсулираних у еритроците [51,91] укључујући и антисенс агенсе који инхибирају репликацију вируса HIV-1 у инфицираним ћелијама [92]. Ова испитивања обезбедила су широку основу за стратегију лечења вирусних инфекција, постављену на системском испитивању код животиња и људи. Треба истаћи да инкапсулација неких антимикробних агенаса у еритроците (нпр. антималярика клотримазола) предиспонира еритроците ка оксидативном оштећењу [93] и оксидовани еритроцити бивају брзо фагоцитовани хепатичким макрофагима (нпр. Купферовим ћелијама) преко рецептора хватача слободних радикала [93].

Антиген презентујућа функција макрофага и других ћелија имунског система које "елиминишу" измењене еритроците такође нуди атрактиван природан механизам за испоруку антигена у циљу појачавања имунског одговора [94]. Поред оптимизовања испоруке антигена, еритроцити играју важну улогу као адјуванси, презентујући вишеструке копије антигена и стимулишући неспецифични имунски одговор [95]. Такође, инкапсулација цитокина, интерлеукина и интерферона, у еритроците додатно олакшава испоруку ових биолошки активних супстанци у макрофаге што резултује у стимулацији имунског одговора, како је потврђено у експериментима на животињским моделима [96].

Еритроцити у које су инкапсулирани токсични агенси, као што је рицин, доводе до смрти циљних ћелија, пре свега фагоцита [97]. Убризгавање еритроцита са инкапсулираним токсином доводи до смањења броја макрофага, обезбеђујући тако антиинфламаторни ефекат и ублажавање акутног оштећења калема (трансплатираног ткива или органа) након трансплатације [98,99]. Теоријски, испорука токсичних агенаса ћелијама имунског система применом еритроцита као носача може бити коришћена код антиинфламаторних терапија као и за индуковања толеранције на антиген код третмана алергијских реакција.

Испорука антиинфламаторних агенаса

Испорука антиинфламаторних супстанци, као што је синтетски глукокортикоид дексаметазон, применом еритроцита носача, у проинфламаторне ћелије попут макрофага, представља наставак претходно описаног терапијског приступа испоруке актиинфективних агенаса. Применом еритроцита носача могла би бити побољшана биолошка расположивост и селективност ових слабо растворних лекова захваљујући њиховој циљаној испоруци у фагоците PEC-а и друге ћелије имунског система. Испитивања започета *in vitro* довела су до развоја процедуре инкапсулације дексаметазон-натријум-фосфата (деривата дексаметазона који је више растворан у воденим растворима) у еритроците. Ова процедура је омогућавала опсонизацију инкапсулираних еритроцита (тј. везивање антиеритроцитних антитела и комплемента), чиме је била олакшана њихова фагоцитоза од стране макрофага, што је резултирало успешном инхибицијом проинфламаторног одговора макрофага изазваног липополисахаридом [100].

Серијом истраживања Magnani и сарадника [36,53-55,101] овај приступ се континуирано испитује на пацијентима оболелим од неколико болести које су у вези са инфламацијом или су услед инфламације погоршане. На пример, терапија дексаметазоном инкапсулираним у еритроците је код десет пацијената који болују од хроничне опструктивне болести плућа била видно добро поднета и резултирала у одрживом повећању концентрације дексаметазона у крви након само једног убризгавања [53]. Код друге болести плућа, цистичне фиброзе, која је такође праћена јаком инфламацијом, реинфузија аутологих еритроцита са инкапсулираним дексаметазоном у месечним интервалима, тачније на 28 дана, била је добро поднета и довела је до значајног смањења инфламаторних реакција [54]. Сличан третман испитан је код пацијената оболелих од инфламаторне болести црева, Кронове болести. У тој студији су три понављајуће реинфузије аутологих еритроцита са инкапсулираним дексаметазоном (сваке четири недеље) такође обезбедиле повишену концентрацију дексаметазона у крви, и омогућиле пацијентима да прекину са претходно преписаном терапијом стероида коју су тешко подносили [55]. Инкапсулацијом у еритроците,

омогућено је значајно смањење дозе лека, тако што су кроз инфузију инкапсулираних еритроцита, пацијенти добијали просечну дозу $5,5 \pm 2,4$ mg дексаметазон-натријум-фосфата једном месечно [55], а стандардна доза у третману Кронове болести износи 0,75 до 9 mg дексаметазон-натријум-фосфата дневно распоређена у две дозе [102].

Слични позитивни резултати показани су у студији која је укључивала осамнаест педијатријских пацијента оболелих од Кронове болести, који су једном месечно примали инфузију аутологих еритроцита са инкапсулираним дексаметазоном током две године [58]. Како је циљ терапије у педијатријској популацији и спречавање повратка болести и гарантовање нормалног раста и пубертетског развоја, примена иако ефикасних кортикостероида, је неприхватљива јер деминерализација костију и успоравање раста представљају озбиљне недостатке неизбежне понављане администрације. Према наведеној студији, смањена учесталост примене кортикостероида захваљујући инкапсулацији у аутологе еритроците, допринела је елиминацији ових нежељених ефеката [58].

У терапији инфламаторних болести код деце, недавно је извршена случајна контролисана студија овог третмана код четрдесет пацијената оболелих од инфламаторне болести црева, који нису реаговали на терапију конвенционалним стероидима. Показано је да током осам недеља терапије код 15 (75%) од 20 анализираних пацијената који су примили дексаметазон инкапсулиран у еритроците дошло до повлачења клиничких симптома, док је код групе пацијената који су били на терапији преднизолоном код 80% дошло до клиничке ремисије. Међутим, док у групи пацијената под терапијом дексаметазоном инкапсулираним у еритроците нису запажени никакви нежељени ефекти, чак 80% пацијената под терапијом преднизолоном показивало је изражене споредне ефекте [56]. Општи закључци о ефикасности ове терапије се не могу донети јер је број пацијената који су учествовали у овим испитивањима (10–15) мали у односу на критеријуме стандардних клиничких студија.

Од 2013. године се са успехом на исти начин лечи стероид-зависни улцеративни колитис. Студија која је рађена на 37 пацијената показала је да инфузија која садржи $9,8 \pm 4,6$ mg дексаметазона обезбеђује равнотежну

плазма концентрацију дексаметазона од 8 ng/ml у трајању од 28 дана. Шестомесечна терапија ниским дозама дексаметазона омогућила је обуставу примене оралних глукокортикоида и смањење споредних ефеката [101]. Сви ови охрабрујући пилот резултати наговештавају да ће испорука антиинфламаторних супстанци посредована еритроцитима наћи примену у терапији акутних и хроничних инфламаторних болести.

Испорука антитуморских агенаса

Инкапсулација антитуморских лекова у носаче ограничава испољавање њихове токсичности у организму и побољшава њихову испоруку у туморе преко неколико механизма, како специфичних (нпр. преко циљних антитела) тако и мање специфичних (нпр. услед ефекта повећање пропустљивости и задржавања типичног за солидне туморе). Липозоми, линеарни полимери и полимерне мицеле данас представљају најпопуларније носаче за антитуморске лекове. Ипак, еритроцити као носачи антитуморских лекова такође могу наћи примену у терапији тумора, обезбеђујући продужену циркулацију лековите супстанце. У прилог томе, говоре резултати који су показали да се инкапсулацијом хидрофобног декалинијума у мишје еритроците обезбеђује знатно дуже полувреме живота (5-6 дана) у циркулацији у поређењу са PEG-липозомском формулацијом (4 сата) [103].

Антитуморски агенс, антибиотик доксорубицин, инкапсулиран је у носаче еритроците, коришћењем неколико различитих процедура укључујући умрежавање мембрана еритроцита глутаралдехидом [104]. Та модификација значајно повећава преузимање еритроцита од стране макрофага и других ћелија које имају способност активне фагоцитозе [82]. Тако је доксорубицин инкапсулиран у еритроците успешно испоручен у макрофаге у ћелијској култури и показана је његова акумулација у јетри након интравенске ињекције код паса [105,106]. Наведени третман показао је охрабрујућу ефикасност у терапији лимфоидних тумора код паса, без појаве изражене кардиотоксичности што је иначе карактеристичан нежељени ефекат доксорубицина, али је ипак довео до супстанцијалне хроничне супресије мијелоидних ћелија [107].

Формулација хуманих аутологих еритроцита са инкапсулираним даунорубицином, припремљена коришћењем методологије која избегава умрежавање мембрана еритроцита, је убризгана пацијентима са акутном леукемијом након чега је показано продужено присуство даунорубицина у плазми и испољени су мањи нежељени ефекти него при давању слободне форме лека [108]. Слично, примена аутологих еритроцита са инкапсулираним доксорубицином код пацијената са лимфомом обезбеђује смањење максималног пика концентрације и продужено присуство доксорубицина у плазми, што резултује у значајном повећању укупне количине лека у организму и смањење нежељених ефеката у поређењу са конвенционалном формом лека доксорубицина [109].

Испорука генетичког материјала

Еритроцитни духови се већ дуже време испитују као средство за интрацелуларну испоруку генетичког материјала. Највећи напори у овој области усмерени су на цитоплазматску испоруку малих олигонуклеотида (антисенс) који интерферирају у процесу синтезе протеина. Први експерименти изведени *in vitro* на културама ћелија потврдили су да је овај начин испоруке малих нуклеотида могућ и обезбедили прва поређења наведеног система са липозомима у које су инкапсулирани антисенс нуклеотиди [110]. Новија испитивања додатно су потврдила могућност интрацелуларне испоруке олигонуклеотида инкапсулираних у еритроците [100] и показала и други начин генетичке интерференције. Нпр. показана је инактивација вирусне РНК репликације у култури хуманих макрофага инфицираних вирусом HIV комплексом пептида и нуклеинске киселине инкапсулираних у еритроците [92].

Неколико студија урађено је и на животињским моделима. Тако је убризгавање еритроцита са инкапсулираним ДНК плазмидом довело до продужене експресије (чак 3 дана након ињекције) трансгена у мононуклеарним леукоцитима у крви [71]. Треба поменути да у овим експериментима експресија трансгена није била детектована у другим органима и ткивима, па чак ни у хепатичким Купферовим ћелијама које преузимају највећи део убризганих еритроцита. Природа циљаног деловања

на моноклеарне леукоците, уместо на макрофаге PЕC-а, што је индиректно закључено на основу присуства трансгена, није објашњена. Насупрот резултатима ове студије, једна каснија [70] студија показала је да еритроцити са инкапсулираним антисенс нуклеотидима бивају опсонизовани у плазми и испоручени у јетру, као добро познатој „дестинацији“ еритроцита.

2.7. МОГУЋНОСТ ПРИМЕНЕ ОТПАДНОГ КЛАНИЧНОГ МАТЕРИЈАЛА КАО ИЗВОРА ЕРИТРОЦИТНИХ МЕМБРАНА

Процењује се да кланице у процесу производње меса свакодневно стварају милионе тона процесног отпада чије депоновање представља велики проблем за прерађиваче. За третман овог отпада у развијеним земљама постоји строга законска регулатива за чије поштовање се издвајају значајна материјална средства. Упркос чињеници да у развијеном свету постоје системи за третман и уклањање ових споредних производа, све више се развија свест о могућностима њихове примене. Наиме, данас се одбацивање споредних производа као отпада више не сматра ни еколошки добрим ни економски исплативим, посебно када се зна да овај „отпад“ садржи значајне количине драгоценог сировог материјала који има снажан потенцијал у стварању нових производа и функционалних састојака са додатном вредношћу. Опште је прихваћено мишљење да је пожељно и могуће да се сви споредни производи индустрије меса прераде у производе намењене за хуману и животињску исхрану, биодизел, ђубриво, па чак и лекове (слика 18) [5].

Кланична крв представља најобилнији споредни производ месне индустрије и озбиљан биохазард. При сваком клању може се добити приближно од 3 до 5 l крви на 100 kg масе свиња тј. говеда [111,112]. Највећи део кланичне крви третира се као отпад и одбацује, иако она представља непресушан извор биолошки активних молекула (хемоглобина и других биоактивних пептида), који би се могли применити као додаци храни људи или сточној храни [112,113]. Протеини кланичне крви, посебно они из плазме, имају важна технолошка својства, као што су гелирање, пењење и емулгација, што их чини састојцима са додатном вредношћу у индустрији

хране и примени као дијететских суплемената [114]. На пример, протеини из плазме кланичне крви као што су имуноглобулини, фибриноген и албумин, могу се додати у производе за исхрану људи и животиња, због јако добрих гелирајућих и емулзификационих својстава [115].



Слика 18. Схематски приказ могућности примене споредних продуката месне индустрије (модификовано према [5])

Ћелијска фракција кланичне крви може бити искоришћена у месној индустрији као појачивач боје за кобасице [114]. Алтернатива у циљу избегавања нежељеног сензорног ефекта (јаке црвене боје која потиче од хемоглобина) представља уклањање хемоглобина и изоловање глобина, што је познато као обезбојавање крви. На овај начин могу се остварити важне технолошке функције у прехранбеним производима, као што је нпр. замењивање масти у месним производима [114, 116]. Пречишћени хемоглобин из кланичне крви и ензимски добијени пептиди обогаћени хемских гвожђем могу бити одличан стартни материјал у производњи замена за крв, адитива за храну у циљу превенције и третмана анемије или као дијагностички реагенс [38,117].

У сарадњи Института за медицинска истраживања и Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду развијени су поступци за изоловање ултрапречишћеног хемоглобина из престарелих хуманих еритроцита и говеђих еритроцита из кланичне крви процесом контролисане градуалне хемоллизе у оригинално дизајнираном мембранском реактору [38,40]. Та истраживања су показала да након процеса контролисане хемоллизе у мембранском реактору заостају мембране еритроцита, тзв. „духови“. Тако кланична говеђа и свињска крв могу бити и јефтин почетни материјал у производњи еритроцитних мембрана односно духова као потенцијалних система за испоруку активних супстанци или њихов саставни део (нпр. језгра LbL микрокапула [26]).

Данас, захваљујући савременим биотехнолошким методама за покривање антигена на еритроцитним мембранама и другим површинским модификацијама, могуће је ублажити имунски одговор на инкомпатибилне хумане еритроците [4]. Ови резултати дају наду да би се еритроцитне мембране пореклом из различитих сисарских врста могле користити као носачи конвенционалних и биотехнолошких лекова код људи или домаћих животиња. Поред доступности у великим количинама, битно је нагласити да животиње пре клања обавезно пролазе све неопходне здравствене прегледе, након чега се проглашавају (не)безбедном полазном сировином за добијање производа који се могу користити за људску исхрану. Још једна велика предност коришћења говеђих и свињских еритроцита лежи у чињеници, да они као и еритроцити свих сисара, за разлику од живинских еритроцита, немају једру ни друге органеле, па је изоловање мембране из њих много мање компликовано.

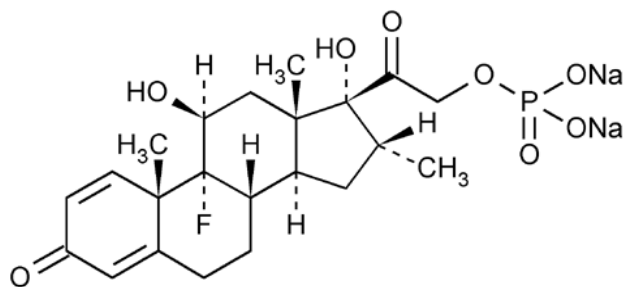
2.8. АНТИИНФЛАМАТОРНИ АГЕНС ДЕКСАМЕТАЗОН КАО МОДЕЛ СУПСТАНЦА ЗА ИНКАПСУЛАЦИЈУ У ЕРИТРОЦИТНЕ МЕМБРАНЕ

Дексаметазон је потентан, синтетски члан глукокортикоидне класе стероида са антиинфламаторним и имуносупресивним својствима. Његов глукокортикоидни ефекат је 25 пута јачи од ефекта природног хормона кортизола.

Када се дају у терапијске сврхе, глукокортикоиди имају снажна антиинфламаторна и имуносупресивна дејства. Они инхибирају и ране и касне манифестације запаљења тј. не ублажавају само почетно црвенило, температуру, бол и оток већ делују и на касније фазе зарастања рана и обнове ткива, као и пролиферативне реакције које се виде у хроничном запаљењу. Такође делују на све типове инфламаторних реакција без обзира да ли су изазване патогенима, хемијским или физичким стимулусима или неконтролисаним реакцијама имунског система које се могу уочити у реакцијама преосетљивости или аутоимуним болестима.

Данас се дексаметазон примењује за различите биомедицинске сврхе: примена у ћелијским културама (стимулише диференцијацију мезенхималних матичних ћелија) [118], у офталмологији (у терапији акутне и хроничне инфламаторне постериорне болести сегмента ока, тзв. увеитиса) [119], код пролиферативне витреоретинопатије, субретиналне неоваскуларизације и дијабетесног макуларног едема. Дексаметазон се такође примењује у алергологији, због особине да инхибира функције лимфоцита, фибробласта, макрофага и других ћелија укључених у функцију имунског система. Нашао је примену и у педијатријској хематологији у терапији фибробластне леукемије захваљујући својству да индукује апоптозу Б и Т лимфоцита [120,121].

Упркос бројним предностима, примена дексаметазона у фармацеутским формулацијама је изузетно ограничена из разлога што је овај молекул јако хидрофобан и неопходне су високе дозе да би се постигле терапијске концентрације. Проблем хидрофобности се може превазићи применом хидрофилног облика соли дексаметазона, дексаметазон-натријум-фосфата, који је у овом истраживању коришћен као модел супстанца (слика 19). Основне физичко-хемијске карактеристике дексаметазон-натријум-фосфата приказане су у табели 5. Међутим, применом ове соли, не елиминишу се изузетно значајна нежељена дејства, као што су остеопороза [122], повишен ниво шећера у крви и повишен крвни притисак [123], крварења у желуцу и интестинуму због стварања улцерација, супресија имунског одговора на инфекцију, супресија синтезе ендогених глукокортикоида и задржавање течности [124].



Слика 19. Структурна формула дексаметазон-натријум-фосфата

Табела 5. Основне физичко-хемијске карактеристике дексаметазон-натријум-фосфата

Назив	1,4-прегнадиен-9 α -флуоро-16 α -метил-11 β ,17,21-триол-3,20-дион-21-фосфат динатријумова со
Температура складиштења	2-8 $^{\circ}$ C
Растворљивост	H ₂ O : 50 mg/ml, бистар, бледо жут раствор
Боја	Бела
Тачка топљења	250-253 $^{\circ}$ C
CAS	55203-24-2
Молекулска формула	C ₂₂ H ₂₈ FNa ₂ O ₈ P
Молекулска маса	516.4

Наведени бројни нежељени ефекти дексаметазона указују на потребу да се за испоруку овог лека користе микро- и наночестични системи који омогућавају контролисано и продужено ослобађање лека. Материјали који се користе за производњу ових система за испоруку дексаметазон-натријум-фосфата су разноврсни, и обухватају липиде (за производњу липозома), бројне природне и синтетске полимерне материјале (за добијање микро- и нано- полимерних честица), али и ћелије и ћелијске мембране, попут еритроцита. Испорука антиинфламаторног агенса дексаметазона применом еритроцита носача у проинфламаторне ћелије попут макрофага, детаљно је описана у поглављу 2.6.2. Бројни охрабрујући резултати наговештавају да ће испорука антиинфламаторних супстанци посредована еритроцитима и еритроцитним мембранама наћи значајну примену у терапији акутних и хроничних све заступљенијих инфламаторних болести. У наредном поглављу

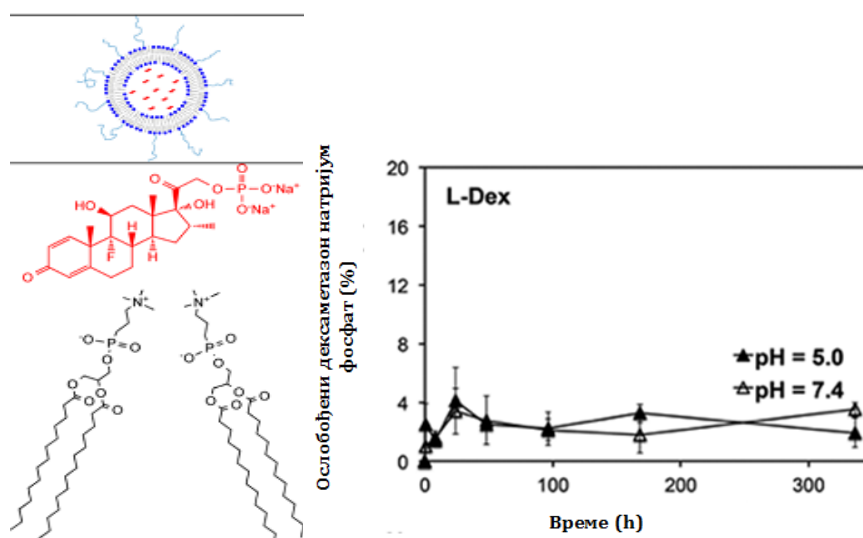
2.9. биће наведени системи за продужено ослобађање дексаметазон-натријум-фосфата различити од еритроцита и еритроцитних мембрана.

2.9. ДРУГИ СИСТЕМИ ЗА ПРОДУЖЕНО ОТПУШТАЊЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА

Поред података о примени аутологих еритроцита као система за контролисано/продужено ослобађање дексаметазона, у литератури су описани и други системи који то омогућавају. Они обухватају липозоме, различите полимерне носаче и коњугате дексаметазона са полимерима.

Липозоми

Поред бројних примена у биомедицини, формулације липозома, развијене су и за циљану испоруку глукокортикоида у оне делове организма који су под инфламацијом, посебно у случају реуматоидног артритиса. Тако су Quan и сарадници [125] методом хидратације липидног филма и накнадном екструзијом добили липозоме са инкапсулираним дексаметазон-натријум-фосфатом просечне величине од 96 nm (слика 20).



Слика 20. Схематски приказ липозома са инкапсулираним дексаметазон-натријум-фосфатом (лево) и кинетике отпуштања дексаметазон-натријум-фосфата из липозома (десно) [125]

У истој студији показано је *in vitro* контролисано ослобађање дексаметазон-натријум-фосфата током 14 дана, са приближно 5% ослобођеног лека. Иста формулација је у *in vivo* испитивањима на пацовима са индукованим артритисом обезбедила терапијски ефекат током 6 дана [125].

Успешна примена имунолипозома са инкапсулираним дексаметазон-натријум-фосфатом, чија је површина функционализована антителима на специфичан протеин који се налази на површини плућа, показана је на моделу пацова са индукованим оштећењима плућа [126]. У овом истраживању показано је циљано дејство ослобођеног дексаметазона током недељу дана и бољи терапијски ефекат у односу на конвенционалну примену дексаметазона.

Хитозанске микросфере и филмови

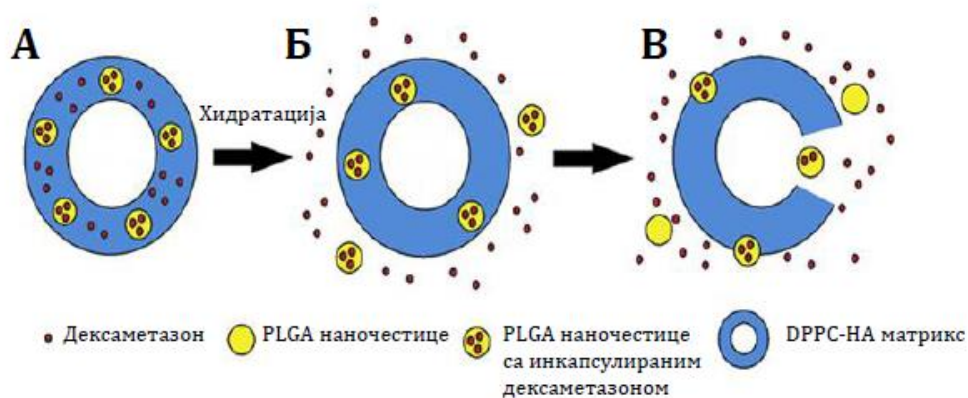
Хитозан је природни биоразградиви полимер који се широко користи у биомедицини, посебно у биоинжењерству због својих карактеристика да формира филмове, скафолде и микрочестице. Ови системи се такође могу применити за контролисано отпуштање лекова [127]. Испитивања хитозанских филмова са инкапсулираним дексаметазоном показала су да је интеракција молекула лека са полимерним ланцима много ефикаснија у случају двослоја него у случају монослоја хитозанског филма. Отпуштање лека било је брже у монослоју, где се после 8 сати само 10% од инкапсулираног лека задржало у носачу, док је у случају двослоја 16% лека и даље остало у носачу после четири недеље праћења отпуштања [128]. Недавно су хитозански филмови обогаћени холин-хлоридом и холин-дихидроген-фосфатом испитани као биодеграбилни и биокомпатибилни материјали који би омогућили електрично и рН зависно ослобађање дексаметазон-натријум-фосфата [129]. Наведена истраживања показала су контролисано ослобађање дексаметазона током осам дана. Поред хитозанских филмова, дексаметазон-натријум-фосфат је успешно инкапсулиран и у хитозанске микросфере, где је у третману едема мозга показана повећана ефикасност лека уз смањење нежељених ефеката због

оствареног продуженог ослобађања и смањене локалне концентрације лека [130].

Поли (d,l-лактид-ко-гликолид) наночестице

Поли (d,l-лактид-ко-гликолид) (PLGA) је биокompatибилан и биоразградив синтетски полимер, који спада у групу термоластичних алифатичних естара. Овај полимер припада једној од ретких група синтетских полимера који је одобрен од стране Агенције за храну и лекове за клиничку примену. PLGA наночестице се најчешће користе за окуларну испоруку дексаметазона због њихове ниске токсичности. Дексаметазон се може инкапсулирати у PLGA наночестице применом технике емулговања и упаравања растварача. Истраживања су показала да се из овако добијених наночестица дексаметазон отпушта у периоду од око 4 сата [121]. С друге стране, Јагасвекин и сарадници [131] показали су да се варирањем молекулске масе примењеног PLGA, растварача и технике припреме, могу добити честице из којих се дексаметазон-натријум-фосфат ослобађао током пет недеља. Продужено ослобађање дексаметазона из PLGA наночестица које су инкорпорирани у алгинат хидрогел, је такође испитивано. Успешна примена овог система показана је код локалне примене на неуралне електроде, тако што се дексаметазон контролисано ослобађао током 3 недеље [132]. Ефикасно истовремено продужено отпуштање дексаметазона и васкуларног ендотелног фактора раста показано је из PLGA микросфера/PVA хидрогел композита [133]. Систем PLGA микросфера са инкапсулираним дексаметазоном и фактором раста обезбедио је идеално окружење за пролиферацију трансплантираних мезенхимских матичних ћелија [134]. Још сложенији систем који се састоји од PLGA микросфера са инкапсулираним дексаметазоном које су обложене наночестицама са везаним хепарином и инкапсулираним фактором раста фибробласта (енгл. *basic fibroblast growth factor*, bFGF) био је испитан као ћелијски носач за регенерацију интервертебралног диска [135]. Обе биоактивне супстанце, дексаметазон и bFGF, континуирано су се отпуштале из овог система током 4 недеље, а систем није показао токсичност за мезенхимске матичне ћелије пацова.

PLGA се у комбинацији са другим полимерима, као што је хијалуронска киселина (HA) и липидима, као што је 1,2-дипалмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин (DPPC) може користити за добијање тзв. "тројанских честица", из којих се инкапсулирани дексаметазон ослобађа кроз три различита корака, што је показано схематски на слици 21. Ослобађање дексаметазона из таквог система знатно је спорије него из уобичајених полимерних нанокапсула [136].



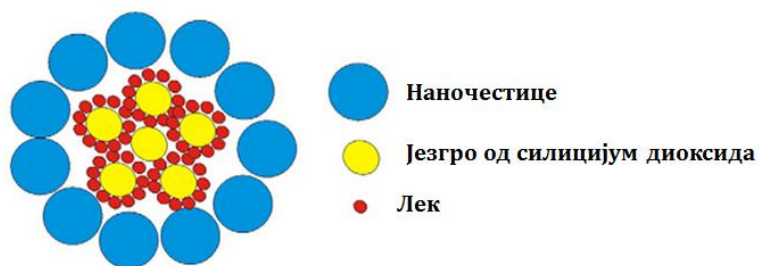
Слика 21. Схематски приказ комплексног система за продужено отпуштање дексаметазона, тзв. "тројанске" честице [136]

У 2010. години интравитреални имплант PLGA са инкапсулираним дексаметазоном [137], Ozurdex® одобрен је за коришћење у свим земаља ЕУ као систем са продуженим ослобађањем дексаметазона за лечење едема макуле, који је праћен разгранатом или централном венском оклузијом мрежњаче. На основу *in vivo* истраживања на 34 мужјака мајмуна, које су спровели Chang-Lin и сарадници [137], отпуштање дексаметазона из овог импланта детектовано је у мрежњачи и стакластом телу током 6 месеци, без потребе да се ињектира нови имплант.

Други полимерни системи за продужено ослобађање дексаметазона

У литератури постоје описи коњугата дексаметазона са разгранатим типовима PEG, који омогућавају инкапсулацију веће количине лека, а уједно су биодеграбилни и растворни у води [138,139]. Линеарни мултифункционални коњугати дексаметазона и PEG су у *in vitro* студијама

показали линеаран профил отпуштања дексаметазона (135 mg дексаметазона по 1 g коњугата) са отпуштених 9% дексаметазона након 17 дана [139]. У литератури су описани и комплексни микрочестични системи за продужено отпуштање дексаметазона, у којима је PEG коришћен као пластификатор [140]. У овим системима микројезгра која се састоје од дексаметазона адсорбованог на колоидне честице силицијум диоксида обложена су Eudragit® наночестицама техником спреј сушења са PEG. На тај начин добије су микрочестице обложене наночестицама (схематски приказане на слици 22), које су показале жељено отпуштање током 2h и транспорт лека у Сасо-2 ћелије, ћелије хуманог колоректалног аденокарцинома [140].



Слика 22. Схематски приказ микрочестица са адсорбованим дексаметазоном које су обложене наночестицама [140]

Успешна инкапсулација и продужено отпуштање дексаметазона током 28 дана постигнуто је синтезом честично фибрилних носача од поли(етиленаксидтерфталат)–поли(бутилентерфталата) методом електроспининга. Контролисаним/продуженим отпуштањем дексаметазона из ових носача омогућена је остеогена диференција хуманих мезенхимских матичних ћелија [141].

ЦИЉ РАДА

III

Ова дисертација за свој основни циљ има развој процеса за изоловање говеђих и свињских еритроцитних мембрана („духова“) из отпадне кланичне крви, и развој и морфолошку и биохемијску карактеризацију система за продужено/контролисано ослобађање активних супстанци на бази изолованих мембрана еритроцита.

У циљу пројектовања процеса који се може применити на еритроците пореклом из говеђе и свињске кланичне крви и којим би се очувала интактност изолованих мембрана, потребно је прво дефинисати специфичне осмотске карактеристике ових еритроцита, а затим испитати морфолошке карактеристике и биохемијски састав изолованих мембрана с обзиром на то да су подаци о њима слабо доступни. У оквиру ове фазе рада испитивања обухватају:

- одређивање основних хематолошких параметра говеђих и свињских еритроцита отпадне кланичне крви;
- испитивање отпорности говеђих и свињских еритроцита на осмотску хемолизу и дефинисање степена осмотског бубрења говеђих и свињских еритроцита;
- оптимизовање параметара процеса градуалне хемолизе за изоловање мембрана говеђих и свињских еритроцита: процес ће бити извођен са количинама стартног материјала које су најмање два реда величине веће од оних описаних у литератури и биће испитана динамика ослобађања хемоглобина и превођења еритроцита у "духове";
- испитивање расподеле величине свињских и говеђих еритроцита и мембрана еритроцита (еритроцитних духова) добијених градуалном хемолизом;
- испитивање утицаја процесних параметара на хемијски састав и структурно уређење добијених мембрана; Ова испитивања обухватају:
 - а) утврђивање детаљних морфолошких карактеристика интактних говеђих и свињских еритроцита и еритроцитних духова добијених градуалном хемолизом;
 - б) испитивање протеинског састава изолованих мембрана говеђих и свињских еритроцита;

- в) испитивање садржаја холестерола и реорганизације липидног двослоја изолованих мембрана говеђих и свињских еритроцита;
- г) испитивање антиоксидативног капацитета изолованих мембрана еритроцита.

Након дефинисања основних морфолошких и биохемијских карактеристика мембрана еритроцита добијених процесом градуалне хемолизе, у следећој фази истраживања приступиће се испитивању могућности примене овог поступка за инкапсулацију модел супстанце, синтетског глукокортикоида, најшире коришћеног антиинфламаторног лека, дексаметазон-натријум-фосфата (DexP). Са циљем добијања новог система за продужено/контролисано отпуштање DexP заснованог на мембранама говеђих и свињских еритроцита, ова фаза рада ће обухватити:

- развој метода спектроскопије у видљивој и ултраљубичастој области (UV-VIS), инфрацрвене спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR) и течне хроматографије под ултра високим притиском комбиноване са масеном спектрофотометријом (UHPLC/-HESI-MS/MS) за квалитативну и квантитативну анализу инкапсулираног DexP;
- оптимизовање процесних параметара (температура, концентрација активне супстанце, додаток умреживача) за инкапсулацију DexP у мембране говеђих и свињских еритроцита;
- утврђивање како процесни параметри утичу на ефикасност инкапсулације DexP у говеђе, односно свињске еритроцитне духове;
- утврђивање како процесни параметри утичу на карактеристике добијених система DexP-еритроцитна мембрана и то са аспекта:
 - а) расподеле величине честица DexP-еритроцитна мембрана;
 - б) морфолошких карактеристика мембрана еритроцита са инкапсулираним DexP коришћењем различитих микроскопских техника;
 - в) кинетике ослобађања инкапсулираног DexP из добијених духова.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

IV

4.1. МАТЕРИЈАЛИ

4.1.1. РАСТВОРИ

Антикоагуланс

Као антикоагуланс коришћен је 3,8% натријум-цитрат.

Изотонични раствори

0,9% NaCl (физиолошки раствор)

Као изотоничан раствор *NaCl* коришћен је 0,9% (m/v) раствор *NaCl* у дестилованој води (физиолошки раствор). рН вредност овог раствора износи 7,0, а проводљивост под стандардним лабораторијским условима 0,6 S/m. Концентрација електролита у физиолошком раствору је 154 mEq/l Na^+ и 154 mEq/l Cl^- , а осмоларност износи 0,298 osmol/kg.

Изотонични 10 mM фосфатни пуфер (енгл. phosphat buffered saline, PBS)

У овом раду коришћен је раствор PBS без калијума, који је по саставу 0,8% (m/v) раствор *NaCl* пуферован са 10 mM NaH_2PO_4 и 10 mM Na_2HPO_4 воденим растворима у односу 1:2,5. рН вредност овог пуфера је 7,2-7,4, проводљивост на 25°C је 1,59 mS/cm, а осмоларност 0,284 osmol/kg.

Хипотонични пуферски раствори

5 mM натријум-фосфатни пуфер, рН 7,2-7,4 добијен је мешањем 5 mM воденог раствора NaH_2PO_4 и 5 mM воденог раствора Na_2HPO_4 у односу 1:2,5. Проводљивост овог раствора на 25°C износи 74 mS/cm, а осмоларност 0,013 osmol/kg.

Други коришћени хипотонични пуфери добијени су мешањем тачно одређеног односа 5 mM натријум-фосфатног/*NaCl* пуфера, као основног хипотоничног пуфера, и изотоничног 0,9% раствора *NaCl*.

Осмоларност свих пуфера мерена је применом криоскопског осмометра Osmomat 030 (Gonotec GmbH, Немачка).

4.1.2. БИОЛОШКИ МАТЕРИЈАЛ

Као материјал за изолацију еритроцита коришћена је отпадна кланична говеђа и свињска крв које су добијене из кланице Амбар у Сурчину и кланице ПКБ Имес у Падинској Скели. Крв је прикупљана у стерилне стаклене боце од 500 ml у којима је претходно асептично додат антикоагуланс (50 ml 3,8% натријум-цитрат). Крв је након узимања на амбијенталној температури транспортована до Института за медицинска истраживања у Београду. Еритроцити су из пуне крви уклањани истог дана или сутрадан, након чувања пуне крви у фрижидеру на +4⁰C.

4.2. МЕТОДЕ

4.2.1. ОДРЕЂИВАЊЕ ОСНОВНИХ ХЕМАТОЛОШКИХ ПАРАМЕТАРА

Број еритроцита у пуној говеђој и свињској крви ($\times 10^{12}/l$) и у препаратима пакованих говеђих и свињских еритроцита одређиван је стандардним поступком бројања ћелија у хемоцитометру [142]. Концентрација хемоглобина одређивана је стандардном спектрофотометријском цијанметхемоглобинском методом [143]. Хематокрит, тј. релативна заступљеност еритроцита у крви одређиван је микрохематокритском методом [144]. Вредност хематокрита изражена је као % еритроцита у крви (v/v). Вредности MCV (енгл. *Mean Corpuscular Volumen*; представља вредност просечне запремине једног еритроцита у анализираној суспензији.), MCH (енгл. *Mean Corpuscular Hemoglobin*; представља просечну количину хемоглобина по једном еритроциту у анализираној суспензији) и MCHC (енгл. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*; представља просечну концентрацију хемоглобина у једном еритроциту у анализираној суспензији) израчунате су на основу вредности броја еритроцита, концентрације хемоглобина и хематокрита [145].

4.2.2. ДОБИЈАЊЕ СУСПЕНЗИЈЕ „ПАКОВАНИХ ЕРИТРОЦИТА“

Пуна крв са антикоагулансом је пре почетка поступка таложења еритроцита и уклањања протеина плазме филтрована кроз груби филтер од

памучне газе, чиме су уклањани спонтано настали угрушци или делови везивног ткива. Еритроцити су из грубо филтроване пуне крви изоловани центрифугирањем крви 20 min на 3000 обрт/ min (центрифуга Megafuge 1.0R, Heraeus, Немачка). По завршеном центрифугирању течна фаза (плазма) и слој леукоцита изоловани су вакуумском аспирацијом и одбацивани. Да би се уклонили протеини плазме, исталожени еритроцити су, у односу 1+3, ресуспендовани у изотоничном раствору, хомогенизовани мешањем и испрани центрифугирањем 15 min на 3000 обрт/min. Центрифугирање је поновљено два пута. Суспензија пакованих еритроцита добијена је када је талог са еритроцитима испраним од протеина плазме и помешан са PBS-ом до жељене вредности хематокрита. Добијени паковани еритроцити сакупљени су у адекватно обележене пластичне фалконе и одмах коришћени за анализе или су чувани најдуже 24h на +4⁰ C.

4.2.3. ИСПИТИВАЊЕ МЕХАНИЧКЕ ФРАГИЛНОСТИ ЕРИТРОЦИТА

Суспензија пакованих еритроцита у изотоничном фосфатном пуферу (PBS) направљена је тако да хематокрит буде ~ 40%. По 5 ml суспензије пакованих еритроцита додато је у 5 обележених епрувета. У епрувете 1, 2 и 3 додати су само еритроцити, а у епрувете 4 и 5 поред еритроцита убачено је и седам стаклених куглица, пречника 2 mm. Епрувете 3 и 5 стављене су на хоризонталну мешалицу (Ika Werbe GmbH & Co, Немачка), на 320 обрт/min и еритроцити су излагани механичкој сили у трајању од 90 min. По истеку овог времена еритроцити су исталожени центрифугирањем (20 min на 3000 обрт/min) и у супернатанту епрувета 2, 3, 4 и 5 измерена је апсорбанца на 540 nm (A₅₄₀) на UltroSpec 3300pro спектрофотометру (AmershamBioscience, Шведска). На талог еритроцита из епрувете 1 додата је дестилована вода, до 5 ml, и после 5 min, након потпуне хемоллизе и поновног центрифугирања измерена је A₅₄₀ у хемолизату.

Индекс механчке фрагилности (ИМФ) тј. степен механичке осетљивости еритроцита израчунат је по формули (једначина 1):

$$\text{ИМФ} = \frac{(A_{540} \text{ епр. 5 (мех. стрес)} - A_{540} \text{ епр. 4 (без мех. стреса)})}{(A_{540} \text{ епр. 1 (хемолизат у води)} - A_{540} \text{ епр. 4 (без мех. стреса)})} \quad (1)$$

На основу A_{540} супернатанта из епрувете 2 (без мешања и без куглица) утврђено је да ли у узорку постоји група/популација еритроцита која хемолизује искључиво због излагања центрифугалној сили. На основу A_{540} из супернатанта епрувете 3 (са мешањем али без куглица) проверено је да ли у узорку постоји популација еритроцита која хемолизује само због излагања сили при мешању.

4.2.4. ТЕСТ ОСМОТСКЕ ФРАГИЛНОСТИ

Тестом осмотске фрагилности [146] дефинише се осетљивост еритроцита на осмотску хемолизу. Тестом се мери степен хемолизе еритроцита у опадајућим концентрацијама раствора NaCl. Тест је извођен тако што је по 20 μ l суспензије еритроцита додавано у епрувете са 5 ml раствора опадајућих концентрација NaCl (0,90%, 0,80%, 0,75%, 0,70%, 0,65%, 0,60%, 0,55%, 0,50%, 0,45%, 0,40%, 0,35%, 0,30%, 0,25%, 0,20%, 0,10% и дестилована вода). Добијене суспензије су хомогенизоване мешањем, и после 20 min инкубације на собној температури центрифугиране 5 min на 2000 обрт/min. Супернатанти који садрже хемоглобин из лизираних еритроцита пипетирањем су пажљиво одвојени од талога са нелизираним еритроцитима и у њима је мерена A_{540} . Апсорбанца хемолизата добијеног лизом еритроцита у дестилованој води дефинисана је као вредност 100%-тне хемолизе, а проценат хемолизе у сваком од испитиваних раствора NaCl је израчунат по једначини 2:

$$\% \text{ хемолизе} = \left(\frac{A_{540} \text{ тестираног супернатанта}}{A_{540} \text{ хемолизата у дестилованој води}} \right) \times 100 \quad (2)$$

На основу добијених података конструисане су криве осмотске фрагилности које представљају зависност % хемолизе од концентрација NaCl (%). Концентрација NaCl при којој се постиже 50% од максималне хемолизе, означена као H_{50} , добијена је на основу Болтсманове сигмоидалне нелинеарне регресионе анализе експериментално добијених података OriginPro 8 софтвером (OriginLab, САД).

4.2.5. ОДРЕЂИВАЊЕ СТЕПЕНА ОСМОТСКОГ БУБРЕЊА ЕРИТРОЦИТА

Степен осмотског бубрења, (енгл. *swelling index*) односно индекса бубрења говеђих и свињских еритроцита одређиван је коришћењем две различите експерименталне процедуре. У првој, рађеној по модификованој микрохематокритској методи коју су предложили Vitvitsky и сарадници [147], степен осмотског бубрења одређиван је мерењем хематокрита и степена хемоллизе еритроцита у растворима са опадајућим концентрацијама јона који су направљени мешањем у различитим односима изотоничног 0,9% раствора NaCl и хипотоничног 5 mM натријум-фосфатног пуфера (табела 6).

Табела 6. Хипоосмотски пуфери коришћени у тестовима одређивања степена осмотског бубрења еритроцита

Моларност (mM)	Састав		Осмоларност (osmol/kg)
	0,9% NaCl (ml)	5 mM Na-PO ₄ (ml)	
139	9	1	0,262
124	8	2	0,230
109	7	3	0,201
94	6	4	0,167
80	5	5	0,131
65	4	6	0,121
50	3	7	0,098
35	2	8	0,069
20	1	9	0,033
12	0,5	9,5	0,023
5	0	10	0,013

Другу методу за одређивање степена осмотског бубрења еритроцита представљала је проточна цитометрија. На основу добијених резултата ових мерења као и на основу микроскопске анализе еритроцита у суспензији, одређен је степен осмотског бубрења еритроцита, као и моларитет раствора при коме долази до лизе свих еритроцита и добијања неоштећених мембрана еритроцита, тзв. „духова“.

4.2.5.1. Модификована микрохематокритска метода за одређивање степена осмотског бубрења еритроцита

По 2 ml суспензија пакованих говеђих и свињских еритроцита помешане су са по 2 ml од сваког пуфера приказаног у табели 4. Добијене суспензије еритроцита хомогенизоване су мешањем и инкубиране 30 min на собној температури. Током инкубације узети су узорци за хематокрит, а тачно по истеку 30 min суспензије еритроцита су центрифугиране 15 min на 3500 обрт/min. По завршеном центрифугирању, супернатанти су пажљиво покупљени пипетом и у њима је измерена вредност A_{540} . Током центрифугирања одређен је хематокрит за сваку од ових суспензија. На основу добијених резултата израчунат је степен, тј. проценат хемоллизе у сваком од испитиваних раствора по формули (једначина 3):

$$EH = \left(\frac{H_{be}}{H_{bt}} \right) \times 100 \quad (3)$$

где вредност H_{be} представља A_{540} која је еквивалентна количини хемоглобина у супернатанту, тј. екстраћелијског, ослобођеног хемоглобина, а H_{bt} представља вредност A_{540} која је еквивалентна количини хемоглобина ослобођеног у дестилованој води, тј. при 100% хемоллизе. Степен бубрења еритроцита, који представља промену запремине еритроцита у сваком од испитиваних раствора израчунат је по формули (једначина 4):

$$\frac{V}{V_0} = \frac{H_t(100 - EH_0)}{H_{t0}(100 - EH)} \quad (4)$$

где је: V/V_0 - Промена запремине еритроцита, тј. степен бубрења

H_t - Хематокрит у испитиваном раствору

H_{t0} - Хематокрит у изотоничном раствору

EH Процент хемоллизе у испитиваном раствору

EH_0 - Степен хемоллизе у изотоничном раствору

4.2.5.2. Одређивање степена бубрења еритроцита проточном цитометријом

Као друга метода за одређивање степена бубрења еритроцита коришћена је проточна цитометрија. Метода проточне цитометрије примењена је с циљем да се на нивоу сваког појединачног анализираниог еритроцита (до 10^5 анализираних еритроцита по узорку), измери интензитет расипања светлости (током проласка ћелија у струји флуида кроз проточни цитометар), што је у директној корелацији са величином ћелије и њеном гранулираношћу. Мерења су рађена на CyFlow SL проточном цитометру (Paratec, Немачка).

Током проласка кроз проточни цитометар, сваки појединачни еритроцит бива осветљен ласерским зраком који се системима сочива фокусира на ћелију. Информације о расутој ласерској светлости дефинишу неке од особина анализираних еритроцита. Ласерска светлост која се од ћелија одбија под малим углом (0,5 до 10 степени), тј. светлост одбијена у правцу ласерског зрака (енгл. *forward light scatter*, FSC) је пропорционална величини ћелије. Ласерска светлост која се од ћелија одбија под углом од 90 степени (енгл. *side light scatter*, SSC) дефинише степен њене унутрашње гранулираност. FSC и SSC имају јединствену вредност за сваки анализирани еритроцит у узорку, па се комбинација ова два параметра користи за дефинисање различитих популација ћелија у узорку. Резултати ове анализе приказују се у виду двопараметарског FSC-SSC хистограма у коме се, за сваку анализирану ћелију, на апсциси налазе FSC вредности (дефинишу величину ћелија), док се на ординати налазе SSC вредности (дефинишу унутрашњу гранулираност ћелија). Резултати су такође приказани и у облику једнопараметарског дијаграма који приказује зависности броја (удела) ћелија (енгл. *cell count*) од величине ћелија (FSC).

Промена запремине еритроцита у растворима различите јонске јачине, тј. степен бубрења одређиван је тако што је по 10 μ l еритроцита додато у 2 ml сваког од раствора приказаних у табели 6. После 20 min инкубације на собној температури еритроцити су анализирани. С обзиром да за сваку од идентификованих група еритроцита, у сваком од испитиваних раствора, инструмент даје вредности FSC, степен бубрења за сваку од дефинисаних група еритроцита израчунат је по формули (једначина 5):

$$V/V_0 = FSC_t / FSC_0 \quad (5)$$

где је V/V_0 - Промена запремине, тј. степен бубрења еритроцита

FSC_t - Вредност FSC тј. величина еритроцита у испитиваном раствору

FSC_0 - Вредност FSC, тј. величина еритроцита у изотоничном раствору

4.2.6. ДОБИЈАЊЕ ЕРИТРОЦИТНИХ ДУХОВА ПРОЦЕСОМ ГРАДУАЛНЕХЕМОЛИЗЕ

У чашу запремине 1l стављено је 100 ml суспензије пакованих еритроцита (припремљених на начин описан у поглављу 4.2.2), помешаних са PBS-ом тако да вредност хематокрита износи 60%. Чаша са суспензијом еритроцита постављена је на лабораторијску хоризонталну ротациону мешалицу, која је обезбеђивала хомогенизовање суспензије у чаши, брзином од 320 обрт/мин. Помоћу перисталтичке пумпе (Инфузиона пумпа, ИП610, Биомедицина, Србија) протоком од 300 ml/h у чашу се уводи нискомоларни, 35 mM натријум-фосфатни/NaCl пуфер за хемолизу (слика 23). Снижавањем јонске јачине раствора ослобађао се хемоглобин из еритроцита у физиолошки раствор у реакторској чаши.



Слика 23. Апаратура за извођење градуалне хипотоничне хемолизе

Ток хемолизе праћен је мерењем апсорбанце аликвота хемолизата, узетих у интервалима од 3 min. Након центрифугирања аликвота (чиме су раздвојени нелизирани еритроцити од хемолизата), концентрација

хемоглобина у супернатанту, тј. концентрација екстарцелуларног хемоглобина (Hb_e) у одређеном временском тренутку је одређена мерењем A_{540} хемолизата. Степен хемолизе (ЕН) у одређеном временском тренутку израчунат је по формули (једначина 6):

$$EN (\%) = Hb_{e(t)} / Hb_{e(max)} \times 100\% \quad (6)$$

где је “t” одговарајућа вредност Hb_e у одређеном временском тренутку, а “max” представља максималну вредност Hb_e .

Поред тога, у одређеним временским интервалима, одређен је број нехемолизованих еритроцита у аликвотима. Временски тренутак када је постигнуто 50% хемолизе, временски тренутак када хемолиза почиње и временски тренутак кад је хемолиза комплетна израчунати су применом Болтсманове сигмоидалне функције. На крају градуалне хемолизе, добијени духови су испрани центрифугирањем четири пута у хипотоничном пуферу, два пута у изотоничном PBS-у и финално исталожени центрифугирањем 40 min, на $3220 \times g$ и $4^\circ C$. Градуално смањење концентрације пуфера у систему израчунато је применом формуле (једначина 7) која се заснива на уделима додатог хипотоничног пуфера за хемолизу и изотоничног пуфера који је примењен за припрему полазне суспензије еритроцита:

$$C_t = (C_{(i)} V_{(i)} + C_{(h)} V_{(h)t} / 1000) / (V_{(i)} + V_{(h)t}) \quad (7)$$

где је “t” одговарајућа вредност у тренутку t; “V” је запремина и “C” је концентрација изотоничног “(i)” и хипотоничног пуфера “(h)”.

4.2.7. ЕЛЕКТРОФЕРЕЗА НА НАТРИЈУМ ДОДЕЦИЛ СУЛФАТ ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛУ

Протеински састав мембрана еритроцита је анализиран дисконтинуираном електрофорезом на натријум-додецил-сулфат полиакриламидном гелу (енгл. *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) у редукујућим условима [148]. Електрофореза је рађена на „SE 260 Mighty Small II Vertical Slab Electrophoresis Unit“ (GE HealthCare LifeScience, САД) апарату за вертикалну SDS-PAGE са хлађењем. Електрофореза је рађена у 0,75 mm геловима са 10 места састављеним од 4% акриламида (гел за

узорковање) и 12% акриламида (гел за раздвајање). На гел је наношено 40 μg протеина по узорку. Концентрација протеина у узорцима еритроцитних духова одређивана је ВСА тестом (BCA Protein Assay Kit, Pierce, САД). На сваки гел, поред узорака, нанети су протеински маркери стандардних молекулских маса 170 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 26 kDa, 17 kDa, 19 kDa (PageRule Prestained Protein Ladder, Fermentas Life Sciences, САД). Електрофоретско раздвајање је извођено при константној јачини струје од 40 mA уз непрестано хлађење. По завршетку електрофорезе протеинске фракције су визуелизоване бојењем Coomassie плавим након чега је вишак боје уклоњен раствором метанола и сирћетне киселине. Молекулске масе и интензитет протеинских фракција одређиване су денситометријски коришћењем програмског пакета ImageMaster TotalLabv1.11 (GE HealthCare Life Science, САД).

4.2.8. МИКРОСКОПСКА АНАЛИЗА ЕРИТРОЦИТА И ЕРИТРОЦИТНИХ ДУХОВА

4.2.8.1. Светлосна микроскопија

Прве информације о морфолошким карактеристикама еритроцита и „духова“ еритроцита добијене су посматрањем под светлосним инверзним микроскопом са фазним контрастом Olympus CKX 41 (Olympus Europa Holding GmbH, Немачка). Фотомикрографије су анализиране Quick PHOTO Camera 2.3. софтвером (PROMICRA, Чешка).

4.2.8.2. Скенирајућа електронска микроскопија

Детаљнија морфолошка анализа еритроцита и еритроцитних духова урађена је скенирајућом електронском микроскопијом (енгл. *field emission scanning electron microscopy*, FE-SEM). Узорак за анализу је припреман тако што је 1 ml изолованих духова фиксиран 2 сата у 2% раствору глутаралдехида у PBS-у, након чега су духови испрани 4 пута у PBS-у центрифугирањем, додатно фиксирани 2 сата у 2% осмијум-тетроксиду и испрани центрифугирањем 4 пута у PBS-у. Узорци су након тога дехидрирани превођењем кроз серију етанолних раствора (10, 30, 50, 70, 95 и 100%) у трајању од 10 min за сваку концентрацију, а потом подвргнути критичној

тачки сушења, коришћењем течног угљен-диоксида (Bal-TecCPD030 Critical Point Dryer, Bal-TecAG, Лихтенштајн). Након облагања златом, визуелизација је извршена скенирајућим електронским микроскопом (TESCAN MIRA 3 XMU, Tescan, Чешка), при напону од 10 kV.

4.2.8.3. Микроскопија атомских сила

Узорци говеђих и свињских еритроцита, изолованих духова и духова са инкапсулираним леком припремљени су за мерења микроскопијом атомских сила (енгл. *Atomic Force Microscopy*, AFM), применом следећег протокола: 500 μ l еритроцита/духова је адхерирано на покровне љуспице обложене поли-L-лизином, преко ноћи на 4°C. Узорци су фиксирани 2 сата у 2% глутаралдехиду у PBS-у а затим 2 сата у 2% осмијум-тетроксиду. Узорци су испрани и дехидрирани растворима етанола растућих концентрација (10, 30, 50, 70, 95 и 100%) у трајању од 10 min за сваку концентрацију. У завршном кораку дехидратације узорци су три пута испрани у ацетону. Топографска AFM мерења извршена су у полуконтактном режиму на собној температури применом NTEGRA Prima система произвођача NT-MDT (NT-MDT Co, Русија). Паралелно са топографским мерењима, фазни помераји AFM конзолних осцилација бележени су, па су на тај начин формиране AFM фазне слике. При анализи је коришћена NSG01 сонда са стандардним радијусом кривине од око 6 nm и стандардне константе силе од 5 N/m. Све слике добијене су при резолуцији од 512 \times 512 пиксела. Топографске слике обрађене су помоћу софтвера инструмента, док су сирови подаци коришћени за фазне слике. За израчунавање RMS (енгл. *Root Mean Square*) вредности која даје информације о површинској хрпавости, узете су репрезентативне AFM слике чијом софтверском анализом је израчунат RMS.

4.2.9. ОДРЕЂИВАЊЕ ВЕЛИЧИНЕ И РАСПОДЕЛЕ ВЕЛИЧИНЕ ЕРИТРОЦИТНИХ ДУХОВА МЕТОДОМ ЛАСЕРСКЕ ДИФРАКЦИЈЕ

Величина еритроцитних духова анализирана је методом ласерске дифракције на уређају за мерење расподеле величине честица Mastersizer Hydro 2000S (Malvern Instruments Ltd., Велика Британија) применом HidromP јединице за дисперговање честица у течном медијуму.

За мерење величине духова као медијум је коришћен PBS. Узорак је анализиран неразблажен и током анализе је било искључено мешање у коморици. Узорци еритроцита или духова дисперговани су у PBS до постизања оптималне концентрације за мерење, а затим је фокусирани сноп светлости пропуштан кроз узорак након чега је детектована светлост расејана под углом од 0,01 до 135°. Један снимак прикупљен овим детекторима приказује спектар светлости расејане током проласка узорка кроз ласерски сноп у одговарајућем временском периоду. У сваком мерењу инструмент је бележио око 2000 снимака, један снимак у свакој милисекунди и усредњавао измерене вредности у коначан резултат. По завршеном мерењу подаци су софтверски анализирани користећи оптичке параметре или Фраунхоферову апроксимацију и приказани у форми графика зависности броја ћелија од њихове величине, и табеларно као бројчане вредности.

4.2.10. ТЕСТ ВЕЗИВАЊА АНЕКСИНА V

Ниво испољавања фосфатидилсерина на спољашњем слоју мембранског двослоја еритроцита и духова одређен је тестом везивања Анексина V (BeckmanCoulter Inc., Француска). Паковани еритроцити и духови ресуспендовани су у хладном пуферу за везивање Анексина V (10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, и 2,5 mM CaCl₂), тако да концентрација ћелија/духова буде $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ ћелија (духова)/ml. У узорке држане на леду, додат је Анексин V-FITC, а затим су инкубирани 15 min у мраку. Узорци су анализирани током наредних 30 min на проточном цитометру Flow® SL (Partec, Немачка) применом FlowMax 2.4 software (Partec, Немачка). Ћелије или духови који су имали вредности FITC флуоресценције већу од граничне (енгл. "cut-off") вредности неспецифичне флуоресценције проглашени су Анексин V позитивним. Процент позитивних ћелија/духова изражен је као однос броја позитивних и укупног броја ћелија/духова.

4.2.11. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ХОЛЕСТЕРОЛА У ИЗОЛОВАНИМ ЕРИТРОЦИТНИМ ДУХОВИМА

Екстракција холестерола из говеђих и свињских еритроцита и изолованих духова извршена је према модификованој процедури коју су

описали Ferraz и сарадници [149]. Укратко, узорци су лизирани додавањем дестиловане воде у односу 1:10 (v/v). Добијене суспензије су помешане са 80% (m/m) воденим раствором Triton X-100 у односу 2:1 (v/v) и инкубиране 10 min на 4°C, а затим 5 min на 37°C. Суспензије су центрифугиране 15 min, на 12000×g, на 4°C. Након центрифугирања горњи слој је сакупљен, помешан поново са 80% (m/m) воденим раствором Triton X-100 у односу 10:1 (v/v), инкубиран и поново центрифугиран. Добијени горњи слој је сакупљен и до анализе чуван на собној температури. У издвојеним екстрактима, концентрација холестерола је одређена ензимско-колориметријским есејом заснованим на Триндеровој "end-point" реакцији (ELITech Group, Француска).

4.2.12. ОДРЕЂИВАЊЕ УКУПНОГ АНТИОКСИДАТИВНОГ КАПАЦИТЕТА И ПРОДУКАТА ЛИПИДНЕ ПЕРОКСИДАЦИЈЕ

Укупни антиоксидативи капацитет одређен је применом FRAP теста (енгл. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP) према методи коју су описали Benzie и Strain [150], где је уместо са плазмом (како је оригинално описано) есеј рађено са 100 µl лизата еритроцита или изолованих еритроцитних духова. Антиоксидативни капацитет изражен је као она концентрација антиоксиданата која има способност редукције Fe³⁺ јона као и 1 mM раствор FeSO₄. Степен липидне пероксидације на основу концентарције производа липидне пероксидације (енгл. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*, TBARS) у лизатима еритроцита и изолованих еритроцитних духова одређен је према методи Ohkawa и сарадника [151]. Резултати су изражени као вредност TBARS у nmol/mg протеина у испитиваним узорцима.

4.2.13. ИНКАПСУЛАЦИЈА ДЕКСАМЕТАЗОН-НАТРИЈУМ-ФОСФАТА (DexP) У ЕРИТРОЦИТНЕ ДУХОВЕ

Описаном методом градуалне хипотоничне хемоллизе извршена је инкапсулација лека DexP у говеђе и свињске еритроцитне духове. У чашу је стављено 50 ml суспензије пакованих еритроцита, помешаних са PBS-ом непосредно пре почетка хемоллизе до вредности хематокрита од 60%. Чаша са суспензијом еритроцита је постављена на лабораторијску хоризонталну ротациону мешалицу, а затим се помоћу перисталтичке пумпе протоком од

150 ml/h у трајању од 27 min у чашу уводио хипотонични 35 mM натријум-фосфатни/NaCl пуфер који садржи DexP у концентрацији од 0,04 mg/ml. Истовремено са укључивањем пумпе, укључивана је и хоризонтална ротациона мешалица која је обезбеђивала хомогенизовање суспензије у чаши. Брзина ротације мешалице била је 320 обрт/min. По истеку 27 min, еритроцитни духови исталожени су центрифугирањем хемолизата 40 min, на 3220xg, на 4°C. Потом је 1 ml еритроцитних духова, ресуспендован у 8 ml изотоничног фосфатног пуфера са различитим концентрацијама DexP (0,04, 0,08 и 0,12 mg/ml), инкубиран 30 min на собној температури, а затим исталожен центрифугирањем. Иста запремина духова је пренета у 8 ml хипертоничног пуфера који садржи исту концентрацију DexP као и изотонични пуфер (0,04, 0,08, и 0,12 mg/ml). На крају су, еритроцитни духови испрани троструким центрифугирањем у PBS-у како би се уклонио заостали, неинкапсулирани DexP. Као контрола сваком експерименту припремљени су и тзв. лажно-инкапсулирани духови. Ови духови припремани су на идентичан начин као инкапсулирани духови, али током њихове припреме лек није додаван у пуферске растворе.

Параметри инкапсулације

За процену ефикасности процедура за инкапсулацију коришћена су два параметра:

1. количина инкапсулираног DexP: количина DexP инкапсулирана у 0,1 ml духова и
2. ефикасност инкапсулације: однос количине инкапсулираног DexP у процентима и количине DexP додатог на 0,1 ml почетних пакованих еритроцита, изражен у процентима (енгл. *Encapsulation Efficiency*, EE) [152].

Утицај концентрације раствора DexP на параметре инкапсулације

Процедура инкапсулације извршена је, као што је описано, коришћењем DexP у концентрацијама од 0,04, 0,08 и 0,12 mg/ml у изотоничним и хипертоничним фазама процедуре.

Утицај температуре на параметре инкапсулације

Изотоничне и хипертоничне фазе процедуре инкапсулације извршене су на собној температури и 37°C.

Утицај додатка глутаралдехида на параметре инкапсулације

Хипертонична фаза процедуре инкапсулације извршена је без и са додатком глутаралдехида у концентрацији 0,01% (v/v).

Праћење отпуштања лека

За предвиђене временске интервале, у полипропиленским микроепруветама 100 μ l духова инкапсулираних са DexP инкубирано је на 37°C са 900 μ l изотоничног фосфатног пуфера, уз стално мешање на хоризонталној мешалици (240 обрт/min). На почетку теста и у одређеним временским интервалима, прикупљани су узорци и после центрифугирања на 14800 обрт/min, у трајању од 3 min, по 100 μ l супернатанта издвајано је за анализирање присуства DexP. Сваки експеримент рађен је у дупликату, а урађена су три експеримента. На основу количине лека детектоване у супернатантима одређен је проценат ослобођеног DexP у односу на потпуно ослобођени лек (100% отпуштање лека, описано у поглављу 4.2.13.).

4.2.14. ИНФРАЦРВЕНА СПЕКТРОСКОПИЈА СА ФУРИЈЕОВОМ ТРАНСФОРМАЦИЈОМ

Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (енгл. *Fourier transform infrared spectroscopy analysis, FTIR*) примењена је као метода за потврду присуства инкапсулираног лека у еритроцитним мембранама и анализу могућих физичких и/или хемијских интеракција између лека и структурних компоненти еритроцитних мембрана. За ту намену примењена је KBr техника снимања. Узорак је хомогенизован са потребном количином KBr и пресован у виду таблете. Снимање је вршено у опсегу од 400 до 4000 cm^{-1} са резолуцијом од 4 cm^{-1} , на собној температури. Спектри су снимљени помоћу FTIR спектрометра (Bomem MB, Hartmann & Braun, Канада).

4.2.15. ПРИПРЕМА УЗОРАКА ЗА КВАЛИТАТИВНУ И КВАНТИТАТИВНУ АНАЛИЗУ DexP ИНКАПСУЛИРАНОГ У ГОВЕЂЕ И СВИЊСКЕ ЕРИТРОЦИТНЕ ДУХОВЕ

Узорци еритроцитних духова су припремани по модификованој процедури коју су у описали Namidi и сарадници [152]. Укратко, духови су лизирани мешањем 100 μ l узорака са 2 ml дестиловане воде у стакленој епрувети. Протеини лизата преципитирани су са 2 ml метанола након чега су узорци инкубирани на собној температури 30 min, затим пребачени у микроепрувете, након чега су протеини исталожени центрифугирањем 20 min, на 14000 обрт/min, на 4°C. Супернатанти су стерилно профильтровани, аликвотирани у стаклене вајлице за квалитативну и квантитативну анализу до које су чувани на 4°C, најдуже 7 дана.

4.2.16. КВАЛИТАТИВНА И КВАНТИТАТИВНА АНАЛИЗА DexP ИНКАПСУЛИРАНОГ У ГОВЕЂЕ И СВИЊСКЕ ЕРИТРОЦИТНЕ ДУХОВЕ ТЕЧНОМ ХРОМАТОГРАФИЈОМ ПОД УЛТРА ВИСОКИМ ПРИТИСКОМ СА МАСЕНОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЈОМ

Квалитативна и квантитативна анализа DexP инкапсулираног у говеђе и свињске еритроцитне духове извршена је применом течне хроматографије под ултра високим притиском са масеном спектрофотометријом (енгл. *Ultra High Performance Liquid Chromatography/-Heated Electro Spray Ionization-Mass Spectroscopy*, UHPLC/-HESI-MS/MS).

Хроматографско раздвајање стандарда DexP разблаженог у метанолу, као и узорака духова, урађено је на Dionex Ultimate 3000 UHPLC систему (Thermo Fisher Scientific, Немачка) у чијем се склопу налази бинарна пумпа, вакум дегасер, термостат за колоне и ауто-семплер. UHPLC систем је конфигуриран са „triple-quadrupole“ масеним спектрофотометром (TSQ Quantum Access MAX, Thermo Fisher Scientific, Немачка) са електрон спреј јонизацијом (енгл. *Heated Electro Spray Ionization*, HESI). Хроматографско раздвајање урађено је на Hypersil gold C18 колони димензија 50 x 2,1 mm, са честицама величине 1,9 μ m (Thermo Fisher Scientific, САД). Мобилна фаза састоји се од 0,1% раствора мравље киселине (А) и ацетонитрила (Б), а узорци су елуирани према следећем градијенту: 5-20% Б у прва 3 min; 20-40% Б од 3 до 5 min, 40-50% Б од 5 до 7,5 min, 50-60% Б у периоду од 7,5-8,5

min, 60–95% Б од 8,5 до 10,5 min, 95% Б до 11,5 min, 95% то 5% Б од 11,5 до 12 min, и на крају 5% Б до 15 min. Проток је подешен на 0.400 ml/min. Све анализе урађене су са растворима MS квалитета (Fisher Scientific, Велика Британија). Колона је термостатирана на 30°C, док је ињекциона запремина била 10 µl. За контролу UHPLC инструмента коришћен је Chromeleon Xpress softver (Thermo Fisher Scientific, Немачка).

Температура јонске пробе (енг. *vaporizer temperature*) масеног спектрофотометра (TSQ Quantum Access Max triple-quadrupole mass spectrophotometer) подешена је на 350°C. HESI проба је подешена на следеће параметре: напон 4000 V, притисак носећег гаса (H₂) 50 AU (арбитрарне јединице; енгл. *arbitrary units*), притисак гаса у јонском извору 0 AU, притисак ауксиларног гаса 20 AU, температура капиларе 270°C, подешавање јонских сочива 0 V. Подаци добијени на масеном спектрофотометру праћени су у негативном модалитету, у опсегу *m/z* од 100 до 1000. Xcalibur softver (верзија 2.1) коришћен је за контролу инструмента, као и за прикупљање и обраду података.

У експериментима фрагментације, дисоцијација молекула индукована је колизијом (енгл. *Collision-Induced Dissociation, CID*), при чему је енергија колизионе ћелије подешена на 40 eV. У PIS (енгл. *Product Ion Scanning*) експериментима, MS/MS продукт јони добијени су дисоцијацијом јона прекурсора (*m/z* 517,130) у колизионој ћелији triple-quadrupole масеног спектрофотометра (Q2), а њихове масе анализирани су у Q3 квадруполу инструмента. SRM (енгл. *Single Reaction Monitoring*) је најосетљивији тип анализе коришћеног инструмента који показује највећу специфичност за анализирано једињење, и због тога је коришћен за апсолутну квантификацију. Механизам SRM експеримента заснива се на одабиру предефинисаних масених фрагмената, тј. продукт-јона, који показују највећи интензитет у PIS експерименту.

4.2.17. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

Статистичка анализа података извршена је помоћу програма Microsoft Office 2007 Excel (Microsoft Corporation, САД), применом Студентовог t-теста. Вредност *p* мања од 0,05 сматрана је статистички значајном.

РЕЗУЛТАТИ

V

5.1. ОСНОВНИ ХЕМАТОЛОШКИ ПАРАМЕТРИ ОТПАДНЕ КЛАНИЧНЕ КРВИ

Познато је да транспорт животиња и третман у кланицама, прикупљање узорака крви, антикоагуланси, поступци изоловања ћелијских компоненти крви, као и складиштење узорака могу утицати на особине еритроцита [153,154]. Због тога је прва група експеримената урађена са циљем да се утврди да ли се примењеним поступцима (4.2.1 и 4.2.2), добијају довољно квалитетни еритроцити за изоловање интактних мембрана (тзв. духова), које би се даље могле користити као полазна сировина за формулацију система за контролисану/продужену испоруку активне супстанце.

5.1.1. ГОВЕЂИ И СВИЊСКИ ЕРИТРОЦИТИ – ХЕМАТОЛОШКИ ПАРАМЕТРИ

У узорцима пакованих говеђих и свињских еритроцита издвојених из пуне кланичне крви, одређивани су следећи основни хематолошки параметри: број еритроцита, хематокрит, концентрација хемоглобина, MCV, MCH и MCHC, а добијени резултати приказани су у табели 7. Вредности анализираних хематолошких параметра показале су изражене индивидуалне варијације, али већина њих није била изван граница опсега референтних вредности за здрава говеда и свиње. Једино је уочено да су у препаратима пакованих свињских еритроцита вредности MCHC биле незнатно повишене, док су у препаратима пакованих говеђих еритроцита вредности MCV биле незнатно снижене. Ови резултати показују да током уклањања протеина плазме и чувања препарата пакованих говеђих и свињских еритроцита до 24 сата на +4°C, није дошло до значајног промене средњег волумена и смањења садржаја хемоглобина, и да еритроцити третирани на описани начин (4.2.1 и 4.2.2) могу бити полазни материјал за добијање мембрана еритроцита.

Табела 7. Основни хематолошки параметри пакованих еритроцита кланичне говеђе и свињске крви

Говеђи еритроцити (n = 16)		Референтне вредности ^a
Број еритроцита (x10 ¹² /l)	15 ± 4	/
Хемоглобин (g/l)	171 ± 59	/
Хематокрит (%)	52 ± 12	/
MCV (fl)	37 ± 9	40 - 60
MCH (pg)	12 ± 3	11 - 17
MCHC (g/l)	337 ± 125	300 - 360
Свињски еритроцити (n = 9)		Референтне вредности ^a
Број еритроцита (x10 ¹² /l)	10 ± 3	/
Хемоглобин (g/l)	185 ± 52	/
Хематокрит (%)	53 ± 15	/
MCV (fl)	55 ± 10	50 - 68
MCH (pg)	19 ± 3	17 - 21
MCHC (g/l)	350 ± 38	300 - 340

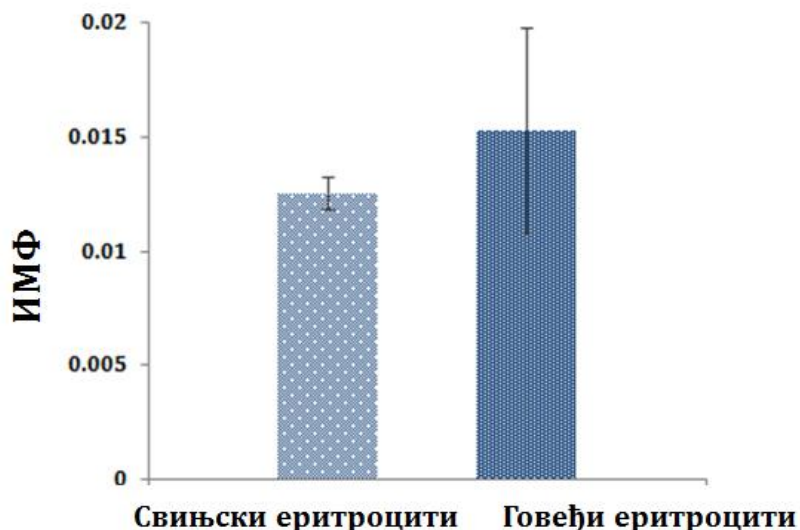
n-број анализираних животиња, резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација

^a референтне вредности за говеђу и свињску периферну крв, према [155]

5.2. ИСПИТИВАЊЕ МЕХАНИЧКЕ ФРАГИЛНОСТИ ЕРИТРОЦИТА ИЗ ГОВЕЂЕ И СВИЊСКЕ КЛАНИЧНЕ КРВИ

Како сама манипулација еритроцитима (чување, пипетирање, центрифугирање, одвајање...) може да промени њихове механичке карактеристике, у следећој фази рада испитана је механичка фрагилност (осетљивост) изолованих еритроцита. Примењени тест механичке фрагилности је поуздан и репродуцибилан тест у којем се примењује сила смицања на узорке еритроцита. Као резултат теста, применом једначине 1, добија се индекс механичке фрагилности (ИМФ), при чему веће вредности ИМФ указују на већу склоност еритроцита ка хемолизи услед примењеног механичког стреса. Резултати теста (слика 24) показују да није било значајне разлике у индексу механичке фрагилности говеђих и свињских еритроцита,

као и да еритроцити обе врсте показују низак степен осетљивости на механички стрес.



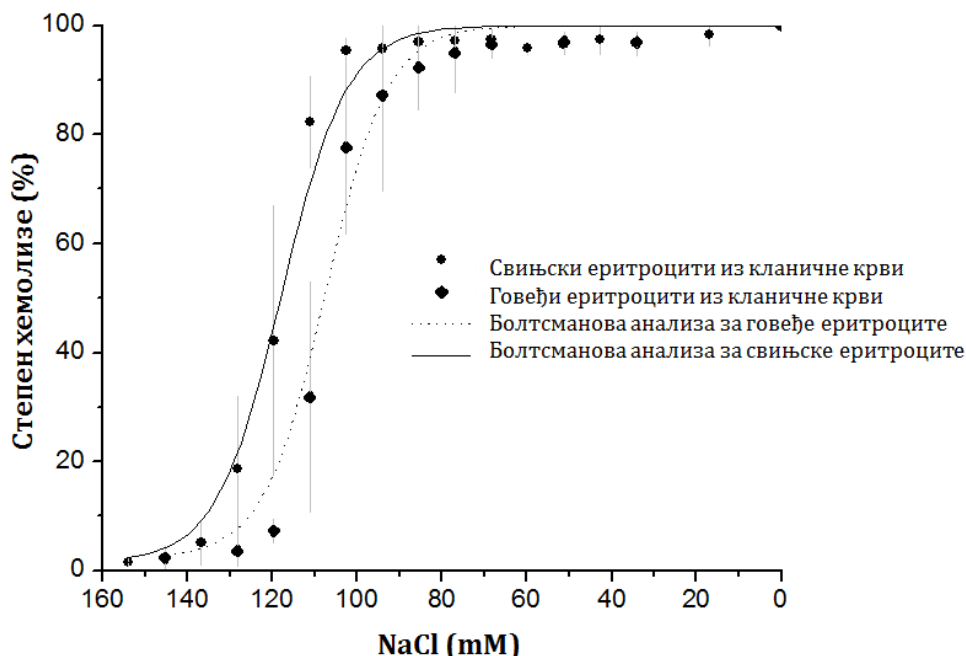
Слика 24. Индекси механичке фрагилности (ИМФ) говеђих и свињских еритроцита изолованих из кланичне крви. Резултати су представљени као средње вредности \pm стандардна девијација три експеримента.

5.3. ИСПИТИВАЊЕ ОСМОТСКИХ КАРАКТЕРИСТИКА ЕРИТРОЦИТА ИЗ ОТПАДНЕ КЛАНИЧНЕ КРВИ

5.3.1. ОТПОРНОСТ ЕРИТРОЦИТА ИЗ ОТПАДНЕ КЛАНИЧНЕ КРВИ НА ОСМОТСКУ ХЕМОЛИЗУ

У циљу оптимизације експерименталних параметара процеса градуалне хемолизе еритроцита из отпадне кланичне крви за добијање интактних мембрана еритроцита, било је неопходно испитати степен њихове осетљивости на осмотску хемолизу. Осмотска осетљивост еритроцита изолованих из кланичне говеђе и свињске крви анализирана је стандардним тестом осмотске фрагилности, а резултати добијени применом једначине 2. Резултати теста фрагилности еритроцита изражени су као средња вредност \pm стандардна грешка степена хемолизе (енгл. *Extent of Hemolysis*, EH) у процентима (%) у зависности од концентрације NaCl (слика 25 и табела 8). На слици 25 и у табели 8 приказани су и резултати обраде експериментално

добijenih резултата Болтсмановом сигмоидалном нелинеарном регресионом анализом.



Слика 25. Криве осмотске фрагилности говеђих и свињских еритроцита из кланичне крви. Символима (● и ◆) приказане су средње вредности ± стандардна грешка за пет експеримената; Резултати Болтсман-ове сигмоидалне нелинеарне регресионе анализе приказани су линијама (— и)

Табела 8. Осмотска фрагилност говеђих и свињских еритроцита из кланичне отпадне крви

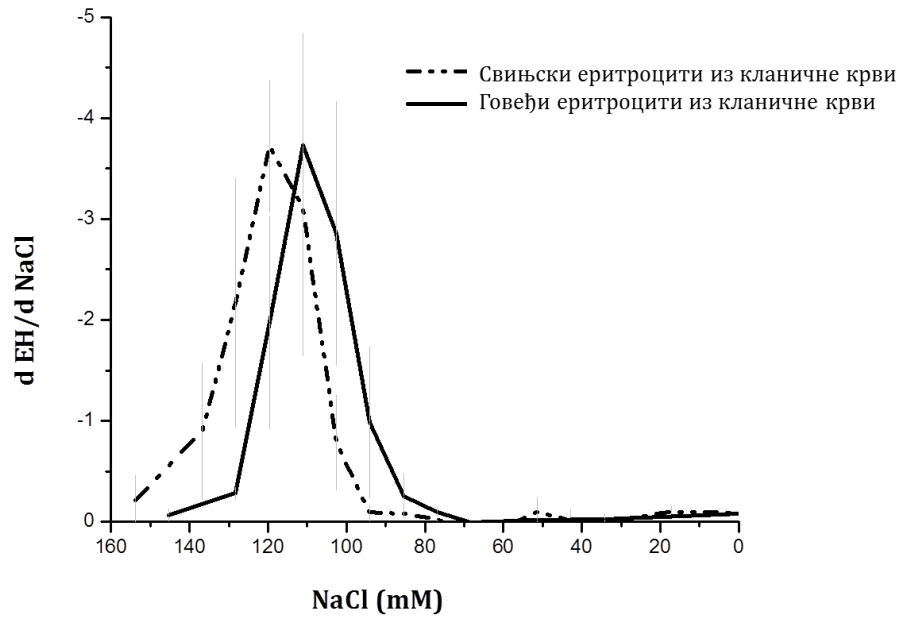
	Кланична отпадна крв (n=5)	
	Говеђи еритроцити	Свињски еритроцити
H₅₀ (mM)^a	108 (97-112)	118* (115-125)
Максимална отпорност (mM)^a	70 (65-101)	92 (90-96)
Минимална отпорност (mM)^a	139 (129-141)	146 (124-149)

^aвредности прерачунате Болтсмановом сигмоидалном нелинеарном регресионом анализом. n-број анализираних животиња; подаци су приказани као средње вредности и као опсежи од минималних до максималних вредности; *p<0.05 статистички значајна разлика у H₅₀ вредностима између свињских и говеђих еритроцита

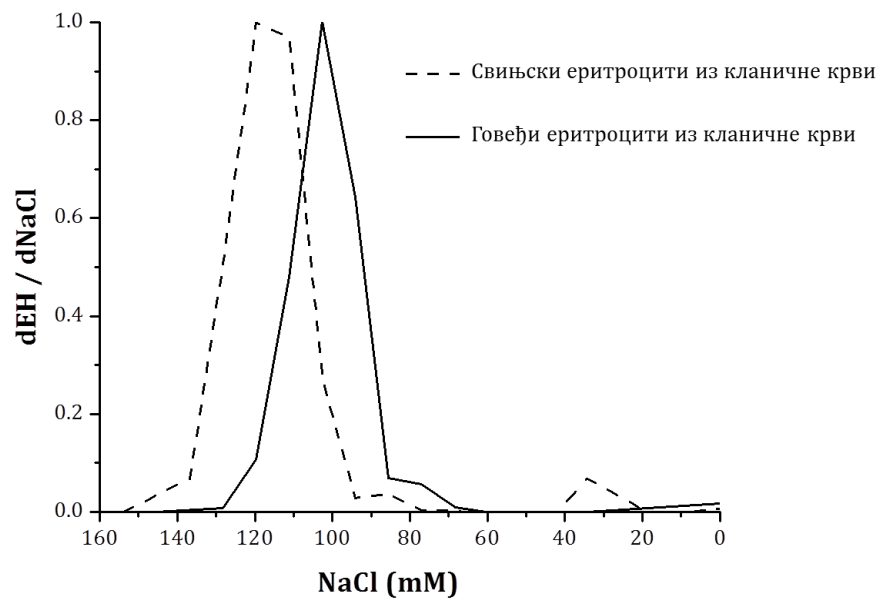
Као резултат Болтсманове сигмоидалне нелинеарне регресионе анализе кривих осмотске фрагилности добијена је вредност H_{50} тј. вредност концентрације NaCl при којој се постиже 50% хемоллизе (H_{50}). За говеђе и свињске еритроците добијене су H_{50} вредности од $0,60 \pm 0,01\%$ NaCl и $0,69 \pm 0,01\%$ NaCl (108 mM и 118 mM раствори NaCl) које показују да свињски еритроцити имају већу осмотску фрагилност у односу на говеђе еритроците.

Да бисмо утврдили да ли у испитиваним узорцима постоје субпопулације еритроцита различите осмотске фрагилности извршена је деривација кривих осмотске фрагилности сваког анализираног узорка. Средње деривационе криве и репрезентативне индивидуалне деривационе криве осмотске фрагилности говеђих и свињских еритроцита приказане су на слици 26. На индивидуалним деривационим кривама осмотске фрагилности говеђих и свињских еритроцита поред главног, уочавају се један или два додатна пика (слика 26 А и Б). што је указало да су у испитиваним узорцима постојале најмање две фракције еритроцита које су се разликовале по осетљивости на осмотску лизу. На основу вредности максимума првог, главног пика, закључено је да је највећи број говеђих и свињских еритроцита лизиран у 103 mM, односно 120 mM растворима NaCl. Други, знатно мањи пик на деривационој криви осмотске фрагилности говеђих еритроцита уочава се при концентрацији NaCl од 77 mM, док се за свињске еритроците уочавају два додатна пика при концентрацији NaCl од 85 mM и 34 mM.

А



Б



Слика 26. Деривационе криве осмотске фрагилности говеђих и свињских еритроцита изолованих из кланичне крви. (А) средња вредност четири различита узорка. (Б) Репрезентативне појединачне деривационе криве осмотске фрагилности говеђих и свињских еритроцита из кланичне крви.

5.3.2. СТЕПЕН ОСМОТСКОГ БУБРЕЊА ЕРИТРОЦИТА ИЗ ОТПАДНЕ КЛАНИЧНЕ КРВИ

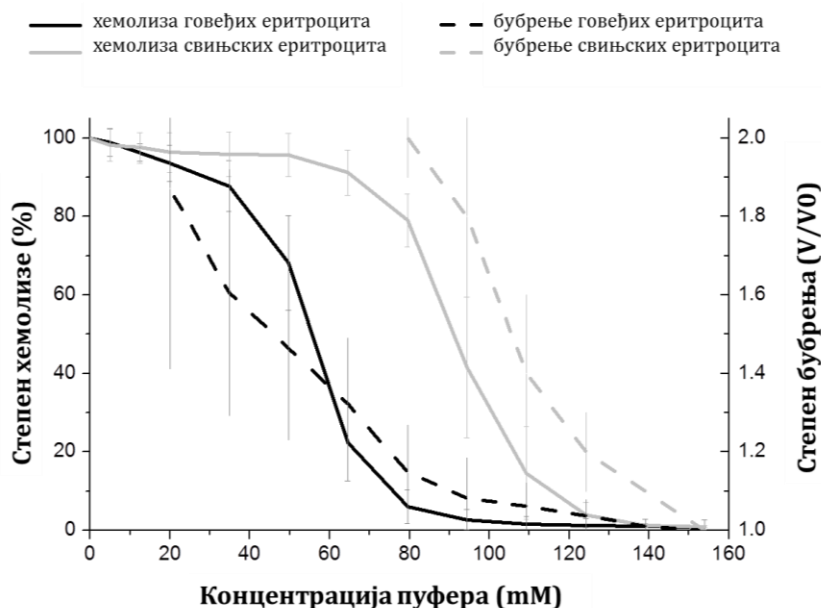
Познато је да увођењем еритроцита у хипотоничан раствор, због разлике у осмотском притиску, мембрана постаје пермеабилна за моновалентне катјоне, у еритроците улази вода након чега они почињу да бубре, тј. облик им се мења од биконкавног до сферног. Како еритроцити почињу да бубре у њиховим мембранама долази до формирања транзитног хемолитичког отвора [156] до кога дифундују молекули хемоглобина, и кроз њега излазе у ванћелијски простор. Ово "избацивање" дела унутарћелијског садржаја смањује напон мембране и хемолитички отвор се затвара. Међутим, даљим смањењем тоничности еритроцити настављају и даље да бубре, отвара се нови хемолитички отвор, избацује се нова количина хемоглобина из ћелије. Ово се дешава све дотле док еритроцити не набубре до критичног нивоа након кога више мембрана није у стању да отварањем малог хемолитичког отвора и избацивањем мале количине хемоглобина „компензује“ разлике у осмотским притисцима, него долази до потпуног пуцања мембране. Из тог разлога, извршена оптимизација бубрења еритроцита обезбеђује контролу процеса хемоллизе [157].

Тако је на самом почетку оптимизације експерименталних параметара процеса градуалне хемоллизе, било неопходно испитати присуство и степен бубрења изолованих говеђих и свињских еритроцита у хипоосмотским растворима. Ови експерименти рађени су са циљем дефинисања моларности пуфера (Na-фосфатни/NaCl пуфери, pH 7,2-7,4) при коме се детектује највећи степен хемоллизе уз очувану целовитост/интактност мембране.

5.3.2.1. Одређивање степена осмотског бубрења говеђих еритроцита микрохематокритском методом

Модификована микрохематокритска метода по Vitvitsky и сарадницима [147] омогућава да се на основу резултата мерења хематокрита и степена хемоллизе (тј. ослобођеног хемоглобина у низу пуферованих раствора са опадајућим концентрацијама NaCl (Na-фосфатни/NaCl пуфери), одреди зависност степена бубрења еритроцита (према једначини 4) од моларности (јонске јачине) пуфера. На слици 27. дат је графички приказ

зависности степена хемолизе и бубрења говеђих и свињских еритроцита од концентрације Na-фосфатног/NaCl пуфера.



Слика 27. Зависност степена бубрења и процента хемолизе говеђих и свињских еритроцита од концентрације Na-фосфатног/NaCl пуфера. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна девијација пет узорака

Детаљни резултати промене вредности хематокрита, процента хемолизе и степена бубрења говеђих и свињских еритроцита са смањењем моларности Na-фосфатног/NaCl пуфера приказани су у табели прилога А.

Анализом добијених резултата показано је да се са смањењем моларности пуфера мења вредност хематокрита, расте степен хемолизе и расте степен бубрења говеђих и свињских еритроцита, тако да вредности хематокрита и степена (%) хемолизе, као и вредности хематокрита и степена бубрења показују високу, статистички значајну, негативну корелацију ($r = -0,96$, $p < 0,001$; и $r = -0,85$, и $r = -0,97$, $p < 0,001$; и $r = -0,88$, $p < 0,01$ респективно за говеђе и свињске еритроците). Степен хемолизе и степен бубрења показали су високу позитивну корелацију за оба узорка кланичне крви ($r = 0,96$, $p < 0,01$ и $r = 0,95$, $p < 0,001$ за говеђе и свињске еритроците респективно). Ипак, максимални степен бубрења испитиваних еритроцита ($V/V_0 \sim 2$ за оба типа еритроцита) постигнут је инкубацијом у Na-фосфатним/NaCl пуферима различитих концентрација, и то 20 mM у случају

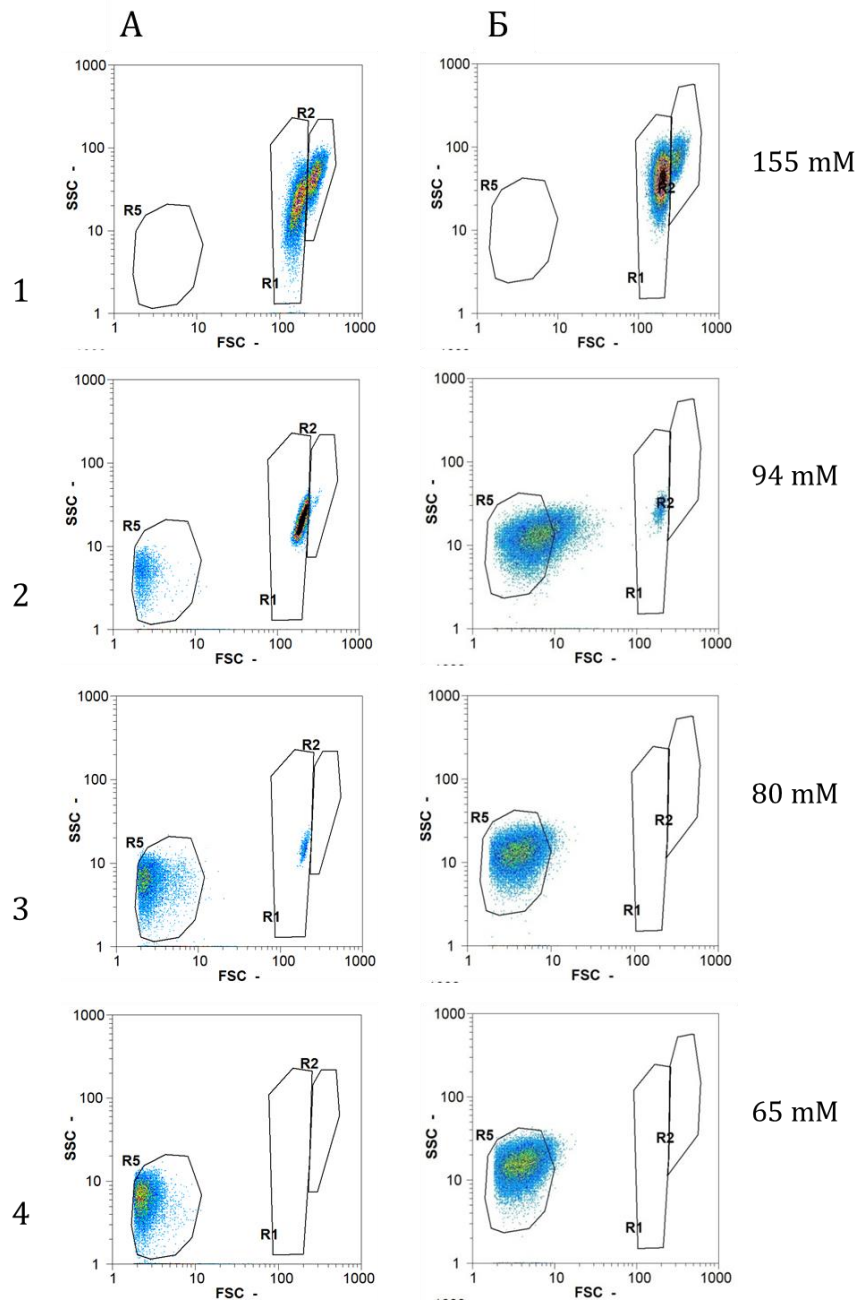
говећих еритроцита и 80 mM у случају свињских еритроцита. Овај резултат је поново указао на већу осмотску фрагилност свињских у односу на говеђе еритроците. Поред тога, добијене вредности степена хемоллизе за испитиване еритроците потврдиле су да је максимално бубрење, односно повећање запремине оба типа ћелија постигнуто при вредности степена хемоллизе од 97%. Даље смањење концентрације пуфера довело је тренутног пуцања еритроцитне мембране и степен бубрења се није могао мерити.

Имајући у виду показану смањену осмотску осетљивост свињских еритроцита у односу на говеђе, добијене сличне вредности степена бубрења биле су неочекиван резултат. Такав резултат указао је на потребу да се степен бубрења говећих еритроцита процени и много софистициранијом методом анализе ћелија, проточном цитометријом.

5.3.2.2. Одређивање степена осмотског бубрења говећих и свињских еритроцита проточном цитометријом

Одређивање степена осмотског бубрења еритроцита из говеђе и свињске кланичне крви проточном цитометријом, урађено је са еритроцитима инкубираним у раствору пуфера истих концентрација који су коришћени у стандардном тесту осмотске фрагилности, прерачуном на основу једначине 5. У изотоничном пуферу, на основу резултата проточне цитометрије (FSC/SSC дијаграми (слика 28 А1, Б1) и дијаграма зависности броја ћелија од SSC (слике 29 и 30)), код оба типа испитиваних еритроцита уочено је „лажно“ постојања две популације еритроцита (опсег R1 и R2) које се разликују по величини. Овај феномен „лажних субпопулација еритроцита“ последица је биконкавног облика ћелија и у литератури је већ описан за хумане и мишје еритроците [158-160]. Са смањењем концентрације пуфера од 155 mM до 65 mM, на Слици 28 (А2, Б2, А3, Б3), може се уочити још једна популација малих "честица" (опсег R5). Највероватније, ова популација малих "честица" представља везикуле које настају услед фрагментације механички ослабљених набубрелих ћелија под силама смицања [161], које се јављају у проточном цитометру. Са даљим смањењем концентрације пуфера (почев од 94 mM) ова популација постаје све заступљенија и код свињских еритроцита при концентрацији пуфера од 80 mM, а код говећих при концентрацији

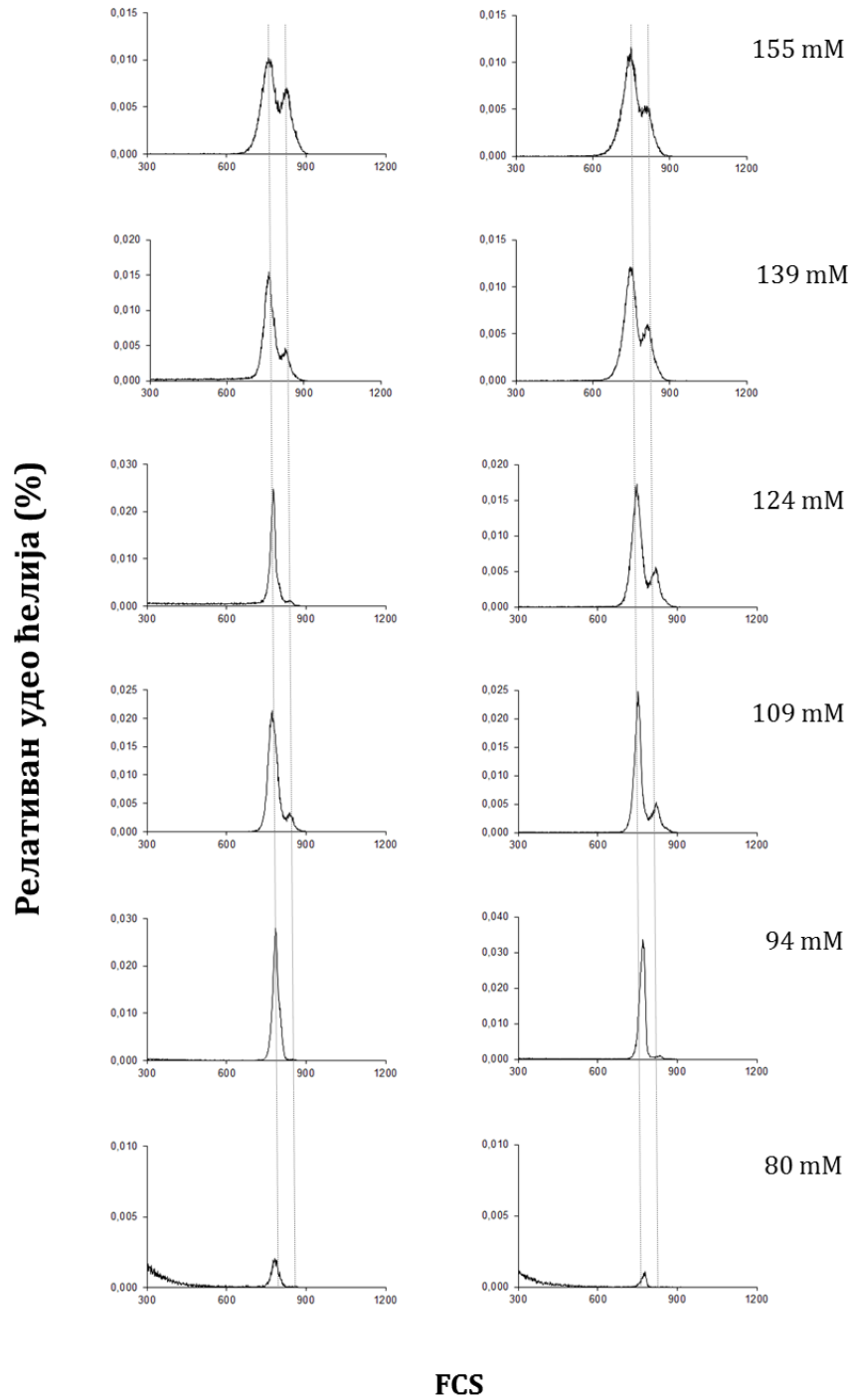
пуфера од 65 mM (слика 28, А3, Б4) детектована је искључиво ова фракција. Овај резултат је у сагласности са резултатима добијеним у стандардном тесту осмотске фрагилности, према коме су свињски еритроцити осмотски фрагилнији од говеђих.



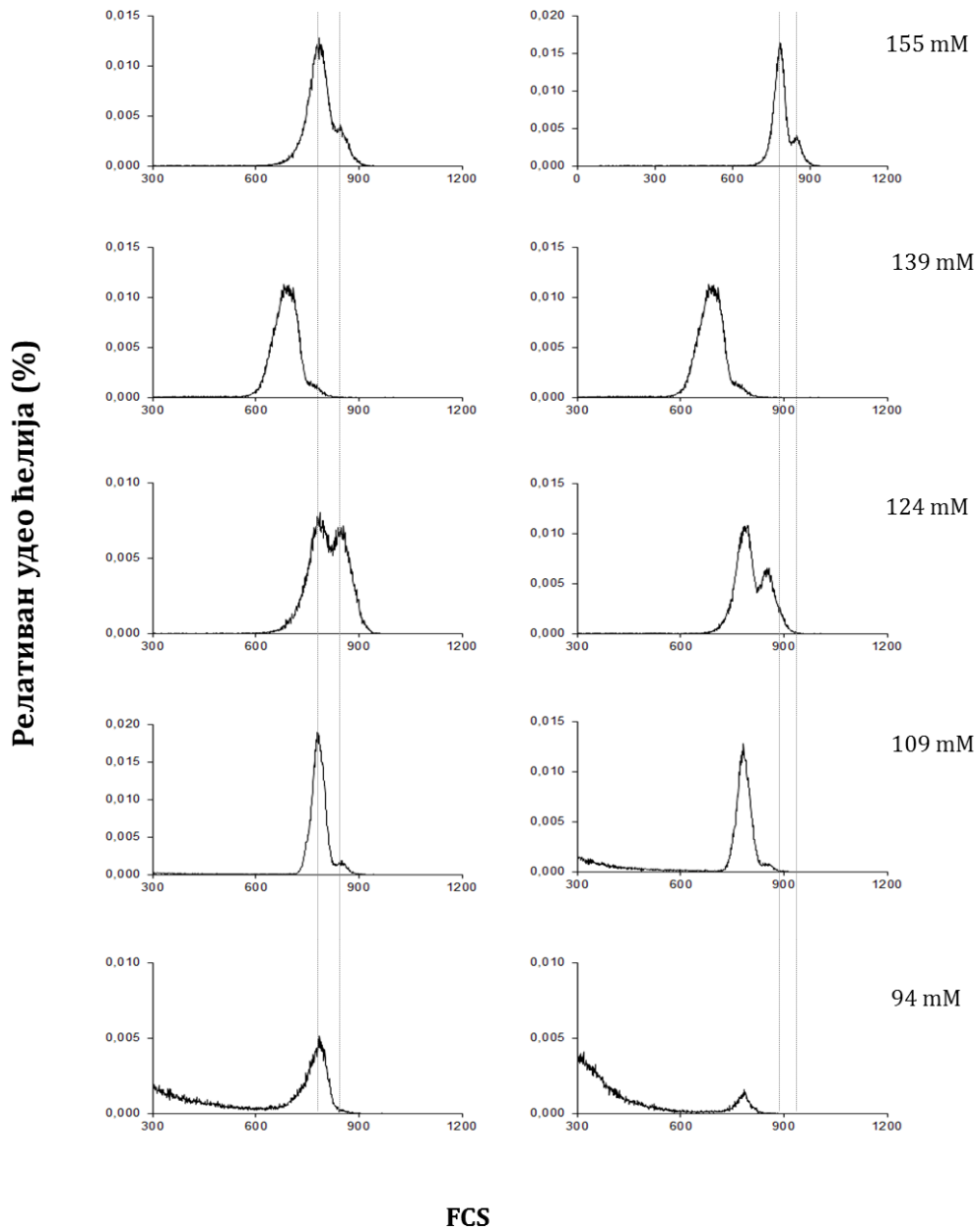
Слика 28. Анализа проточном цитометријом (FSC/SSC дијаграми) говеђих (А) и свињских (Б) еритроцита у хипотоничним натријум-фосфатним/NaCl пуферима опадајућих концентрација. R1, R2 –опсези еритроцита, R5 – мале везикуле. Приказани су резултати једног репрезентативног од три експеримента.

Иако механички стрес проузрокован силама смицања у проточном цитометру не може бити занемарен, показани једнаки индекс механичке фрагилности за говеђе и свињске еритроците, указује да су добијене разлике у FSC/SSC дијаграмима за ове две врсте еритроцита инкубираних у истим хипотоничним пуферима заиста одраз њихове разлике у осмотским особинама.

Без обзира на појаву везикулације, било је могуће анализирати бубрење еритроцита проточном цитометријом у пуферима концентрације од 139 mM и нижим концентрацијама. Хистограми који приказују однос FSC/релативан удео ћелија (%) добијени за по два узорка говеђих и свињских еритроцита (слика 29 и 30) у изотоничном пуферу (155 mM), показали су бимодалну дистрибуцију величине услед биконкавног облика (што је представљено као опсег R1 и R2 на слици 28.). Очигледно је да су говеђи еритроцити мањи од свињских еритроцита (што се одражава у мањим FSC вредностима). Хипотонични пуфери су коришћени са циљем да проузрукују бубрење и дају сферични облик ћелијама, чиме се елиминишу варијације у FSC вредностима услед биконкавног облика еритроцита [160]. Као што је приказано на слици 29, два репрезентативна узорка говеђих еритроцита из кланичне крви (са хематолошким параметрима унутар референтних вредности), дали су униформни образац понашања након излагања еритроцита хипотоничним пуферима. Промене облика резултујућих FSC/релативан удео ћелија хистограма у одређеним хипотоничним пуферима одражавају промене осмотских својстава, од бубрења до фрагментације на мале везикуле у пуферу концентрације 80 mM у случају говеђих еритроцита. У случају свињских еритроцита из кланичне крви, два узорка са хематолошким параметрима унутар референтних вредности (слика 30) нису дала униформне FSC/релативан удео ћелија хистограме. Шта више, хистограми FSC/релативан удео ћелија у одговарајућим хипотоничним пуферима нису показивали бубрење. Фрагментација свињских еритроцита је примећена већ у пуферу концентрације 109 mM, чиме је још једном потврђена већа осмотска фрагилност свињских еритроцита у односу на говеђе еритроците.



Слика 29. Промене у FCS вредностима говеђих еритроцита са опадајућим концентрацијама натријум-фосфатног/NaCl пуфера.

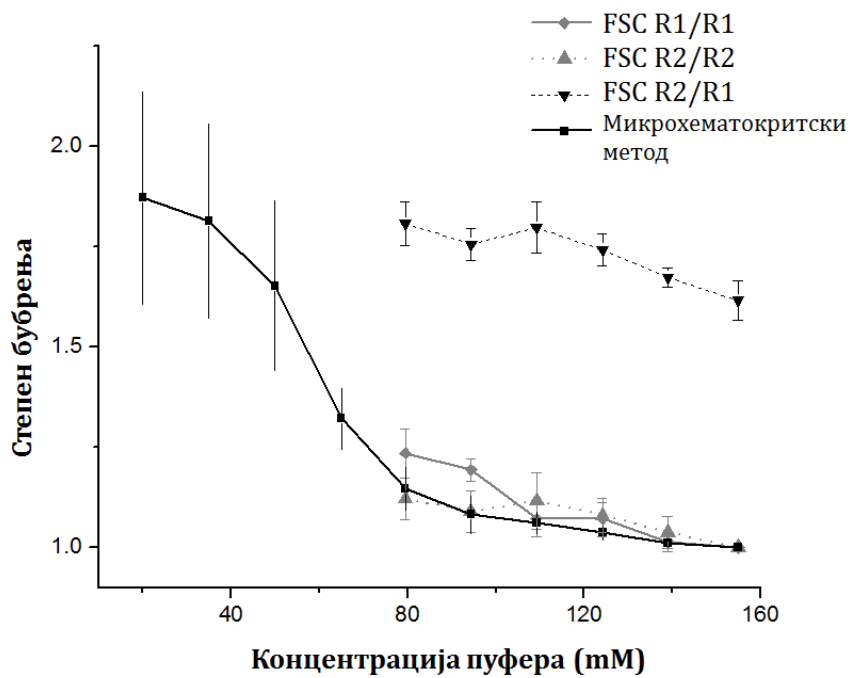


Слика 30. Промене у FCS вредностима свињских еритроцита са опадајућим концентрацијама натријум-фосфатног/NaCl пуфера.

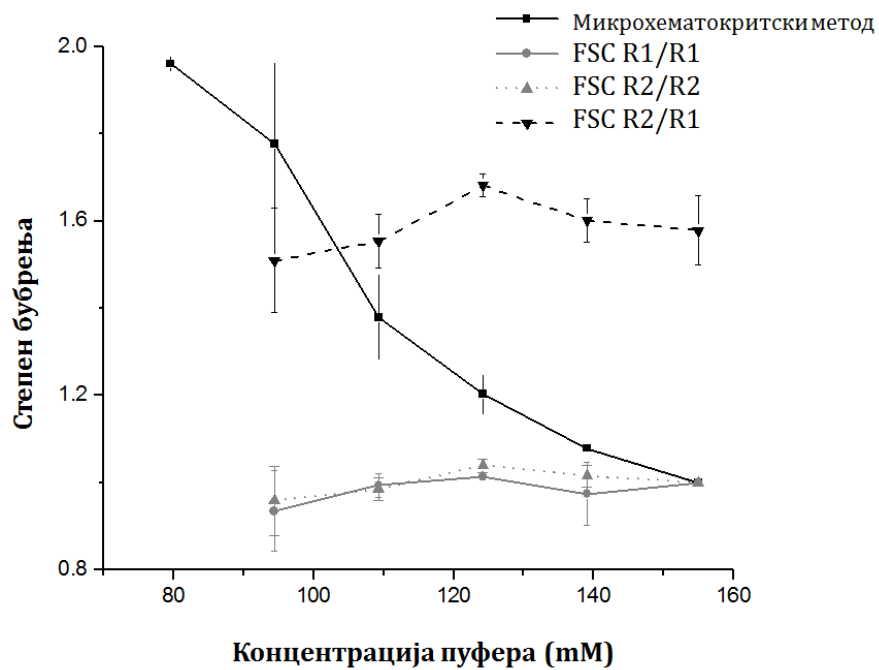
У литератури је већ описана успешна примена методе проточне цитометрије за одређивање облика еритроцита у изотоничним условима при различитим патолошким стањима [159]. По преузетој процедури коју су описали Piagnerelli и сарадници [159], израчунати индекси сферичности износили су $1,58 \pm 0,08$ и $1,67 \pm 0,08$ респективно за узорке свињских и говеђих еритроцита у изотоничним условима. Поред тога, описана метода Piagnerelli и сарадника [159] модификована је, израчунавањем индекса сферичности након инкубације еритроцита у хипотоничне пуфере.

Описани индекси сферичности одређени за опсеге R1 и R2 у хипотоничним пуферима поређени су са резултатима теста осмотског бубрења добијеним микрохематокритским тестом [147]. За наведено поређење, индекси сферичности добијени у изотоничном пуферу узети су као јединична вредност. Корелација резултата приказана је на слици 31 А и Б, за говеђе и свињске еритроците респективно. У случају говеђих еритроцита (слика 31 А) индекс бубрења одређен микрохематокритском методом је у високој корелацији са индексима одређеним методом проточне цитометрије: за $Hct:R2/R1$ $r=0,84$, $p < 0,05$, за $Hct:R1/R1$ $r = 0,95$, $p < 0,01$, за $Hct:R2/R2$ $r = 0,83$, $p < 0,05$. За узорак свињских еритроцита, није показана статистички значајна корелација између индекса одређеним двама наведеним методама (слика 31 Б).

А



Б



Слика 31. Индекс бубрења говеђих (А) и свињских (Б) еритроцита одређен микрохематокритском методом према процедури Vitvitsky и сарадника [147] (резултати су представљени као средње вредности \pm стандардна девијација пет експеримената) и проточном цитометријом према модификованој процедури Piagnerelli и сарадника [159] (резултати су представљени као средње вредности \pm стандардне девијације три експеримента).

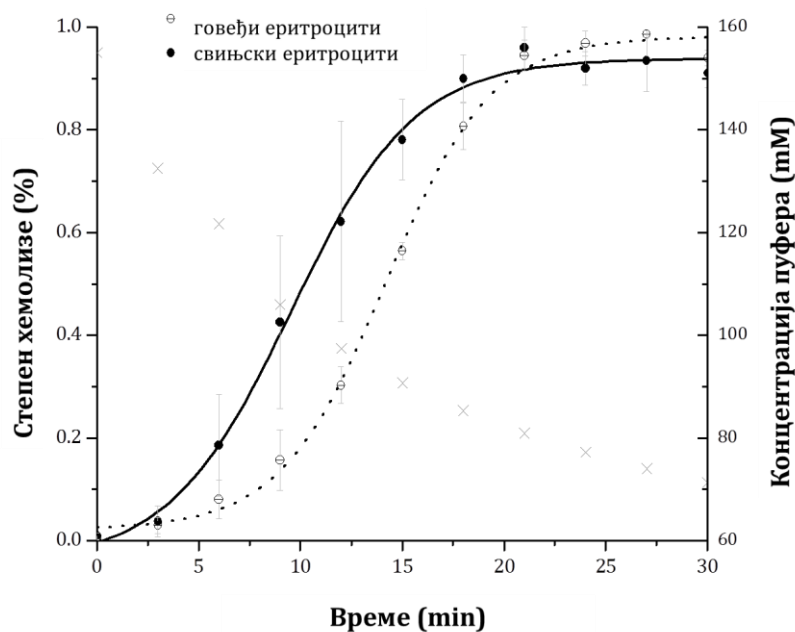
5.4. ДОБИЈАЊЕ ЕРИТРОЦИТНИХ ДУХОВА ИЗ ОТПАДНЕ КЛАНИЧНЕ КРВИ ГРАДУАЛНОМ ХЕМОЛИЗОМ

У следећој групи експеримената извршено је дефинисање кинетике отпуштања хемоглобина и превођења еритроцита у “духове” процесом градуалне хипотоничне хемолизе, као и карактеризација добијених духова, са циљем утврђивања да ли се у описаном процесу заиста добијају интактне мембране које је могуће користити за инкапсулацију биолошки активних супстанци.

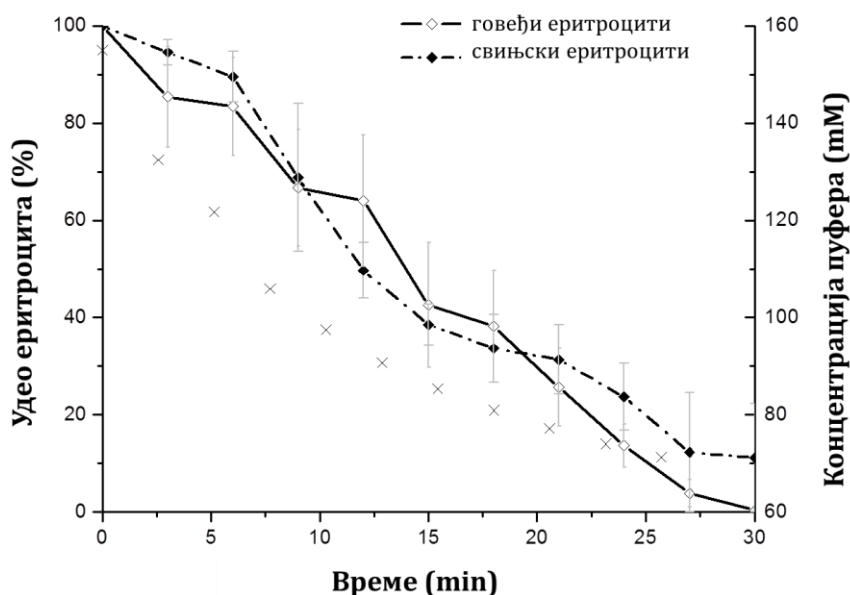
5.4.1. ДИНАМИКА ОСЛОБАЂАЊА ХЕМОГЛОБИНА И “ПРЕВОЂЕЊА” ГОВЕЂИХ И СВИЊСКИХ ЕРИТРОЦИТА У „ДУХОВЕ“ ПРОЦЕСОМ ГРАДУАЛНЕ ХЕМОЛИЗЕ

У овом раду су бели еритроцитни духови (мембране еритроцита без или са малом количином резидуалног хемоглобина), добијени поступком градуалне хипотоничне хемолизе, који подразумева постепено увођење хипотоничног пуфера за хемолизу у суспензију ћелија (слика 23). Као пуфер за хемолизу коришћен је 35 mM NaCl/Na-фосфатни пуфер за који је у претходним анализама показано да доводи до хемолизе > 90% и говеђих и свињских еритроцита (слика 27). Градуална хемолиза изведена је са великом запремином еритроцита (100 ml) током 30 min при протоку пуфера од 300 ml/h. Резултати мерења параметара на основу којих је праћен ток градуалне хемолизе, прерачунати на релативну A_{540} хемолизата (A_{540t}/A_{540max}) графички су приказани на слици 32. Добијене криве зависности степена хемолизе од времена (прерачунат према једначини 6) за говеђе и свињске еритроците имале су сигмоидалан облик (слика 32). Хемолиза, односно екстрацелуларни хемоглобин детектован је у 3. минути код оба узорка еритроцита. Ипак, 50% хемолизе постигнуто је у 14. минути за говеђе и 10. минути за свињске еритроците. Говеђи еритроцити су комплетно лизирани након 27 min, што је одговарало концентрацији пуфера у систему од 74 mM (прерачунато према једначини 7). Процес градуалне хемолизе за свињске еритроците завршен је у 21. минути, што је одговарало концентрацији пуфера у систему од 80 mM (прерачунато према једначини 7). Ови резултати потврдили су наше претходне резултате о већој осмотској осетљивости свињских еритроцита,

без обзира да ли се еритроцити постепено/градуално или нагло излажу хипотоничним пуферима. Процес градуалне хипотоничне хемоллизе праћен је и кроз смањење броја еритроцита, као што је приказано на слици 33. Број ћелија током процеса градуалне хемоллизе опадао је у степенчастом тренду, што је било више изражено за говеђе еритроците. Тренд степенастог смањивања броја еритроцита био је још једна потврда постојања разлике у осмотској осетљивости између говеђих и свињских еритроцита пореклом из кланичне крви, али и потврда да се процес хемоллизе остварује комплексним механизмом. Измерена осмоларност финалног хемолизата износила је 0,141 osmol/kg за говеђе еритроците и 0,149 osmol/kg за свињске еритроците.



Слика 32. Временска зависност ослобађања хемоглобина током градуалне хипотоничне хемоллизе говеђих и свињских еритроцита. Тачке представљају средњу вредност \pm стандардна девијација три узорка; линије представљају фитоване криве, (x) – прерачунате вредности концентрације пуфера у систему

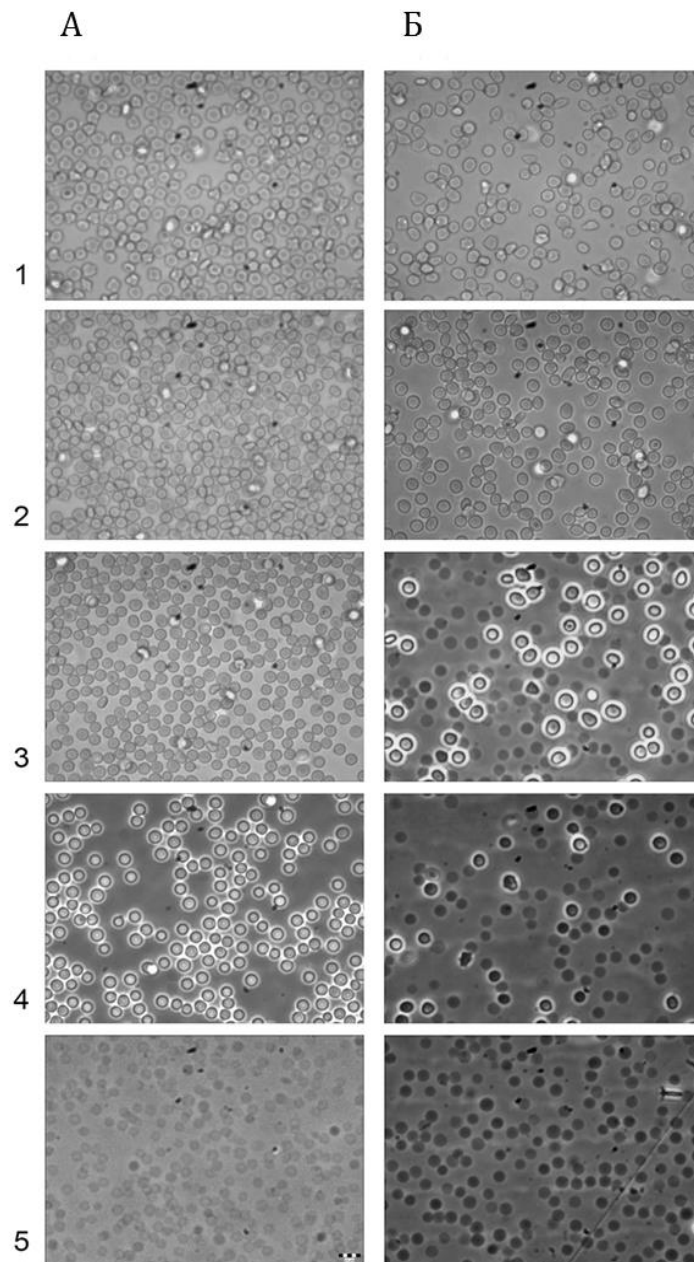


Слика 33. Временска зависност броја ћелија током градуалне хипотоничне хемоллизе говеђих и свињских еритроцита. Тачке представљају средњу вредност \pm стандардна девијација три узорка; линије представљају фитоване криве, (x) – прерачунате вредности концентрације пуфера у систему

Постепени прелазак еритроцита у еритроцитне духове током процеса градуалне хипотоничне хемоллизе потврђен је фазно-контрасном микроскопијом (слика 34).

Микрографије за оба узорка еритроцита направљене су у дефинисаним временским интервалима процеса градуалне хемоллизе којима одговарају одређене концентрација пуфера у систему (према једначини 7) и то: 1) 4 min/130 mM, 2) 6 min/120 mM, 3) 9 min/105 mM, 4) 18 min/84 mM и 5) 26 min/75 mM. Како садржај хемоглобина у еритроцитима чини да на фазном контрасту ћелије изгледају као светле, јасно се може се уочити да је на крају процеса градуалне хемоллизе већина говеђих и свињских еритроцита из кланичне крви, "преведена" у интактне мембране без хемоглобина. На основу резултата добијених из тестова осмотске фрагилности, претпоставили смо постојање осмотски различито осетљивих фракција еритроцита у оквиру узорка еритроцита добијених из говеђе и свињске кланичне крви. Фазно контрасне микрографије које су показале консекутивне морфолошке промене еритроцита до еритроцитних духова

током процеса градуалне хемоллизе, потврдиле су постојање еритроцита са различитом осмотском осетљивошћу у оба узорка испитиваних еритроцита.



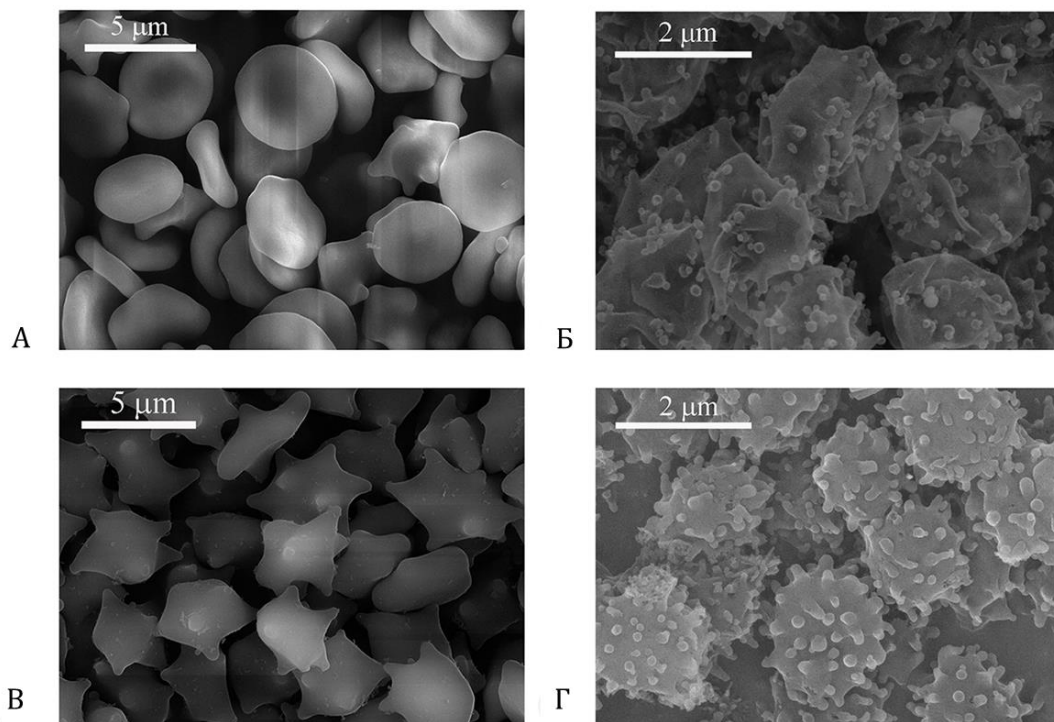
Слика 34. Фазно контрадне микрографије морфолошких промена еритроцита из (А) говеђе и (Б) свињске кланичне крви и добијање еритроцитних духова током градуалне хипотоничне хемоллизе. Микрографије су добијене након: 1) 4 min, 2) 6 min, 3) 9 min, 4) 18 min и 5) 26 min којима одговарају концентрације пуфера од 1) 130 mM, 2) 120 mM, 3) 105 mM, 4) 84 mM и 5) 75 mM; Увећање $\times 400$

5.4.2 МОРФОЛОШКА И БИОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ДУХОВА ДОБИЈЕНИХ ГРАДУАЛНОМ ХИПОТОНИЧНОМ ХЕМОЛИЗОМ

Говеђи и свињски еритроцитни духови изоловани процесом градуалне хипотоничне хемолизе окарактерисани су у смислу оних морфолошких и биохемијских својстава од значаја за потенцијалну инкапсулацију активне супстанце, односно утицај на дифузиони и подеони коефицијент потенцијално инкапсулиране активне супстанце. Ова група испитивања обухватила је: утврђивање детаљних топографских карактеристика, као што су облик, величина и храпавост, утврђивање расподеле величине, испитивање протеинског састава, садржаја холестерола и реорганизације липидног двослоја добијених еритроцитних духова из говеђе и свињске кланичне крви.

5.4.2.1. Скенирајућа електронска микроскопија

Детаљан увид у морфологију интактних говеђих и свињских еритроцита и еритроцитних духова добијених градуалном хемолизом, био је омогућен применом скенирајуће електронске микроскопије (слика 35). На слици 35 А и В, приказана је микрографија говеђих и свињских еритроцита из кланичне крви као стартног материјала за добијање еритроцитних духова. Већина говеђих еритроцита имала је облик биконкавног диска, мада су уочени и еритроцити звездасте морфологије. Присуство еритроцита различите морфологије (покилоцитозе) у периферној крви говеда је нормална карактеристика еритроцита ових животиња. Сви еритроцити из кланичне крви свиња имали су звездасту (ехиноцитну) морфологију (слика 35 В). Оваква морфологија еритроцита свиња не треба се тумачити као знак абнормалности еритроцита датог узорка, имајући у виду да су измерени параметри еритроцита били у оквиру референтних вредности. Оваква ехиноцитна морфологија представља уобичајени артефакт у руковању свињском крвљу, и јавља се након излагања ових еритроцита атмосферском кисеонику [162].



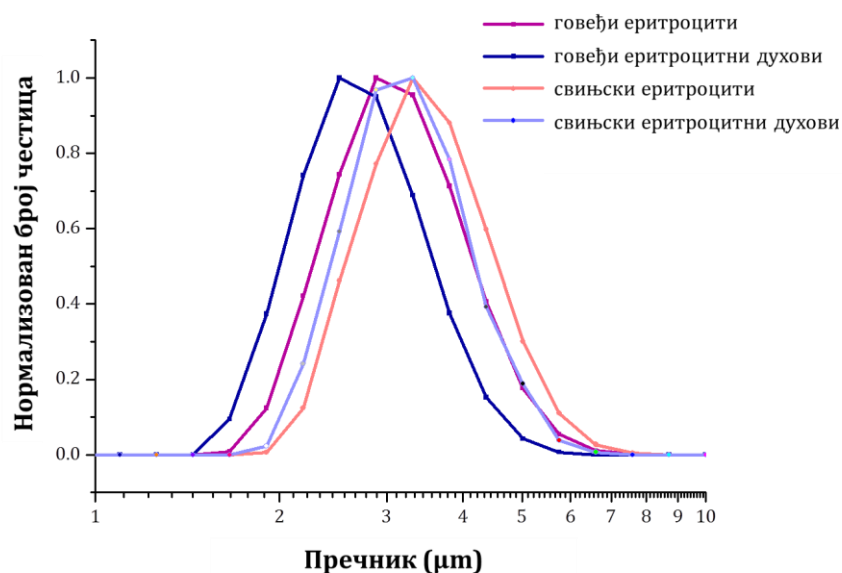
Слика 35. FE-SEM микрографије говеђих еритроцита (А), говеђих еритроцитних духова (Б), свињских еритроцита (В), и свињских еритроцитних духова (Г).

Морфолошка анализа добијених еритроцитних духова обе врсте открива значајну дисторзију од еритроцитног облика и измењену текстуру површине са израженим наборима мембране и постојањем бројних инвагинација (слика 35 Б и Г). Ипак, већи део површине без инвагинација је уочен код говеђих еритроцитних духова у односу на свињске. Наши резултати антипротеин фосфотирозин имуноблота (непубликовани) су показали да су морфолошке промене духова еритроцита обе врсте праћене одсуством фосфорилације тирозина у саставу трансмембранских/цитоскелетних протеина, што иде у прилог тврђењу да су овакве морфолошке промене последица "цурења" АТФ-а током хемоллизе [163]. Поређењем полазних еритроцита и резултујућих духова у случају оба испитивана узорка, FE-SEM микрографије указале су да постоји само благо смањење просечне величине добијених духова у односу на полазне еритроците (слика 35 Б, Г).

5.4.2.2. Мерење и расподела величине говеђих и свињских еритроцита и духова методом ласерске дифракције

У својства материјала која одређују да ли се један материјал може применити за инкапсулацију активних супстанци спадају и величина честица и униформност расподеле честица. Због једноставности и прецизности, метода анализе дифракције ласерске светлости на честицама је примарна метода за испитивање расподела величина у дисперзним системима [164]. Типичне криве расподеле величине по броју полазних еритроцита и добијених еритроцитних духова за оба узорка кланичне крви приказане су на слици 36. Изведени статистички параметри расподеле величине анализираних узорка приказани су у табели 9.

На основу приказаних резултата (слика 36, табела 9) може се закључити, да су говеђи еритроцити мањег дијаметра од свињских. Ова метода је показала да су еритроцитни духови обе животињске врсте били незнатно мањи (за само 10%) од интактних еритроцита. Поред тога, расподела величине добијених еритроцитних духова била је приближно иста за оба типа испитиваних еритроцита из кланичне крви.



Слика 36. Расподела величина говеђих и свињских еритроцита и еритроцитних духова добијених процесом градуалне хемоллизе, диспергованих у изотоничном PBS-у

Табела 9. Статистички параметри расподеле величине говеђих и свињских еритроцита и еритроцитних духова добијених процесом градуалне хемоллизе

Статистички параметри расподеле величине еритроцита и еритроцитних духова (μm) ^a				
	Говеђи		Свињски	
	еритроцити	еритроцитни дугови	еритроцити	еритроцитни дугови
d(N, 0,1)^b	2,45 ± 0,01	2,17 ± 0,02	2,77 ± 0,03	2,65 ± 0,04
d(N, 0,5)^b	3,32 ± 0,02	2,89 ± 0,02	3,69 ± 0,03	3,44 ± 0,04
d(N, 0,9)^b	4,60 ± 0,02	3,95 ± 0,03	5,04 ± 0,04	4,62 ± 0,04
Расподела величине^b	0,65 ± 0,01	0,62 ± 0,01	0,62 ± 0,01	0,59 ± 0,01

^a Резултати три експеримента су приказани као средње вредности ± стандардна девијација

^b Овај параметер указује на 10., 50. (средњи) и 90. перцентил.

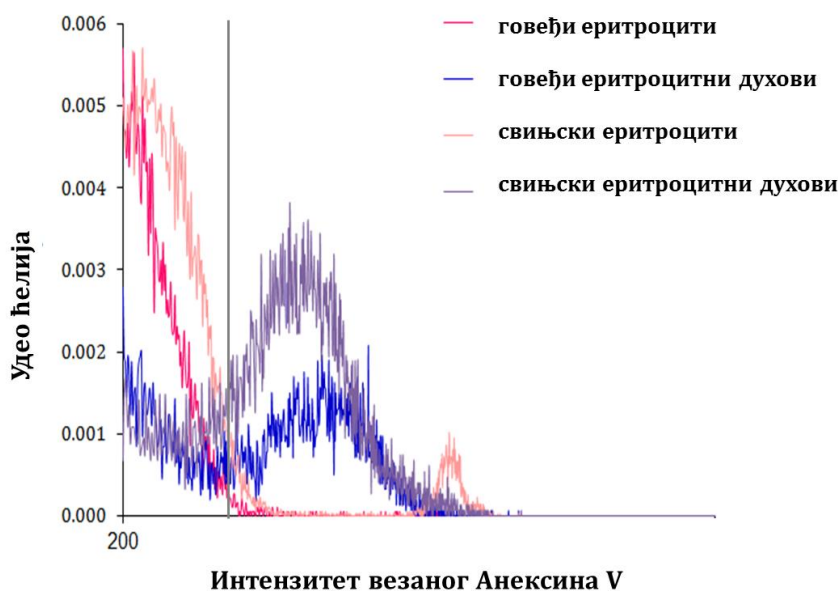
^b Параметар који указује на дисперзију података, дефинисаних као $(d(N, 0,9) - d(N, 0,1)) / d(N, 0,5)$.

5.4.2.3. Испољавање фосфатидилсерина на површини мембране свињских и говеђих еритроцита и духова добијених градуалном хемоллизом

Познато је да излагање еритроцита осмотском стресу (тј. хипер- или хипотоничним условима) и оксидативном стресу може довести до испољавања фосфолипида фосфатидилсерина на спољашњој страни мембране [3, 165], који се нормално налази на унутрашњој страни мембране еукориотских ћелија. Утицај градуалне хипотоничне хемоллизе на реорганизацију липидног двослоја мембране говеђих и свињских еритроцита анализиран је проточном цитометријом на основу интензитета везивања флуоресцентно обележеног протеина анексина V који се специфично везује за фосфатидилсерин.

На основу добијених резултата (слика 37) везивања FITC-ом обележеног анексина V детектоване су разлике у очуваности структуре липидног двослоја на нивоу свињских и говеђих еритроцита, као полазног материјала за добијање духова еритроцита. Наиме, говеђи еритроцити нису везивали анексин V, док је у случају свињских еритроцита детектовано око 6% позитивних ћелија, тј. ћелија које имају некаква оштећења/реорганизацију на нивоу липидног двослоја мембране. Анализом еритроцитних духова добијених градуалном хемоллизом, показано је да је

50% свињских, и само 20% говеђих духова везивало анексин V. Овакав резултат показао је да градуална хемолиза доводи до реорганизације липидног двослоја, а да је степен реорганизације липидног двослоја (тј. оштећења мембране) већи код еритроцитних духова свиња.



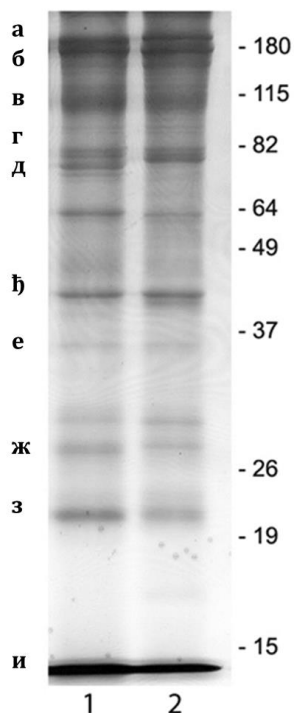
Слика 37. Везивање флуоресцентно обележеног анексина V за говеђе и свињске еритроците и еритроцитне духове добијене градуалном хемолизом. Вертикална линија представља граничну вредност за неспецифичну флуоресценцију

5.4.2.4. Анализа протеинског профила мембрана еритроцита из кланичне крви добијених градуалном хемолизом

У литератури постоје подаци да одређени параметри осмотске хемолизе (нпр. врста пуфера и додаток нутријената) могу утицати на протеински састав добијених мембрана [166]. Ефекат коришћеног процеса градуалне хемолизе на протеински садржај изолованих говеђих и свињских мембрана еритроцита, анализиран је SDS-PAGE-ом у редукционим условима.

SDS-PAGE анализа (слика 38) показала је да се након градуалне хипотоничне хемолизе говеђих и свињских еритроцита у добијеним духовима детектују све главне протеинске фракције карактеристичне за интактне мембране еритроцита (α спектрин (240 kDa), β спектрин и анкирин (220 kDa), бенд 3 (95 kDa), бенд 4.1 (80 kDa), бенд 4.2 (72 kDa); актин (43 kDa),

глицералдехид-6-фосфат дехидрогеназа (35 kDa), стоматин-тропомиозин (27 kDa), пероксиредоксин (22 kDa) и редуковани глобински ланци (16 kDa)).



Слика 38. SDS-PAGE еритроцитних духова добијених градуалном хемоллизом свињских (линија 1) и говеђих (линија 2) еритроцита. (а)- α спектрин, (б)- β спектрин и анкирин, (в)-бенд 3, (г)-бенд 4.1, (д)-бенд 4.2; (ђ)-актин, (е)-глицералдехид-6-фосфат дехидрогеназа, (ж)-стоматин тропомиозин, (з)-пероксиредоксин, и (и)-редуковани глобински ланци.

Процес градуалне хемоллизе у овом раду, пројектован је и оптимизован тако да се изврши максимално искоришћење потенцијала еритроцита из отпадне кланичне крви, односно да се добије пречишћени интактни хемоглобин са максималним приносом и да се очувају мембране еритроцита као потенцијални носачи биолошки активних супстанци. И поред оптимизованог избора пуфера којим се постиже максималан степен хемоллизе, резидуални хемоглобин у мембрани еритроцита је неизбежна појава након процеса хемоллизе, али може бити и користан маркер степена оксидативних оштећења еритроцита [167]. Релативна количина заосталог хемоглобина у добијеним говеђим и свињским еритроцитним духовима процесом градуалне хемоллизе (изражена као однос A_{540} и хематокрита) је приказана у табели 10. Релативан садржај заосталог хемоглобина у свињским еритроцитним духовима је шест пута већи у односу на говеђе

еритроцитне духове добијене истим поступком градуалне хемоллизе, што је био индиректан показатељ о већем степену оштећења свињских у односу на говеђе еритроцитне духове.

Табела 10. Релативан садржај заосталог хемоглобина у говеђим и свињским еритроцитним духовима добијених процесом градуалне хемоллизе

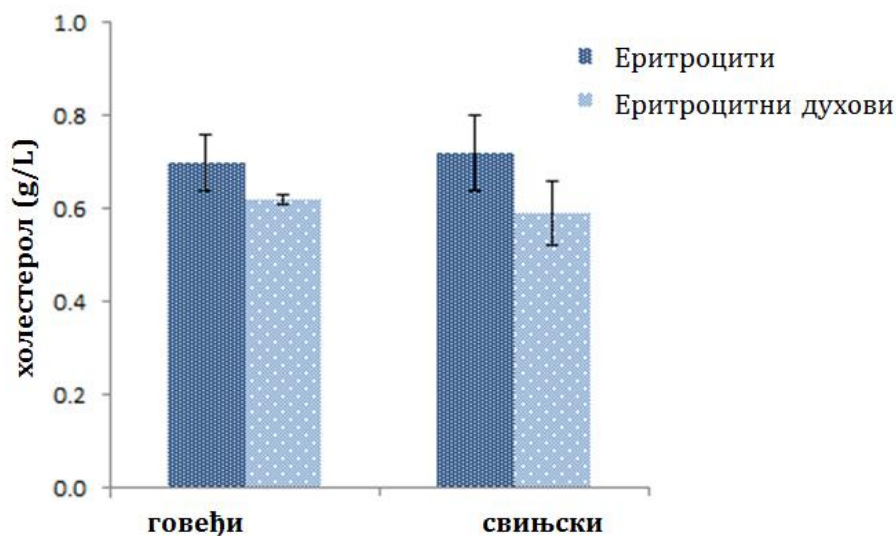
Заостали Hb у еритроцитним духовима* (A ₅₄₀ /Hct)	
Свињски духови	0,30 ± 0,05*
Говеђи духови	0,05 ± 0,01

*изражен као A₅₄₀ нормализован на вредности хематокрита.

Вредности су представљене као средње ± стандардна девијација; *p<0,05, статистички значајна разлика између говеђих и свињских еритроцитних духова

5.4.2.5. Анализа садржаја холестерола у духовима говеђих и свињских еритроцита добијених градуалном хемоллизом

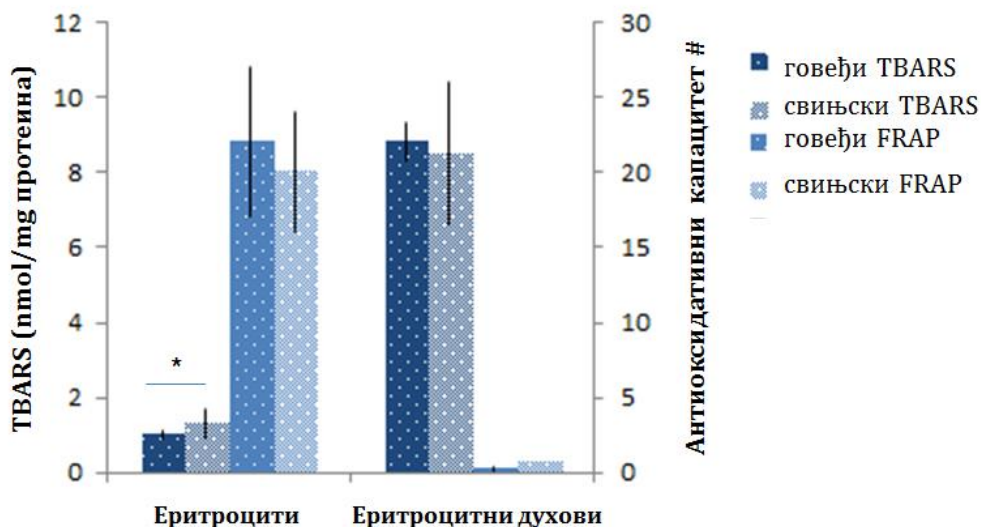
Липидни профил еритроцитних духова добијених градуалном хемоллизом није анализиран у целини, већ кроз испитивање садржаја оних липидних компонената које су битне за примену духова за отпуштање биолошки активних супстанци. Тако је од липидних компоненти анализиран холестерол, односно испитиван је утицај градуалне хемоллизе на његов садржај у финалним еритроцитним духовима. Концентрације холестерола одређене у полазним еритроцитима и резултујућим духовима, приказани су на слици 39. Јасно се може уочити да није било значајне разлике у садржају холестерола говеђих и свињских еритроцита и добијених духова. Конкретно, више од 90% холестерола присутног у интактним еритроцитима говеда и свиња је задржано у еритроцитним духовима добијеним градуалном хипотоничном хемоллизом.



Слика 39. Концентрација холестерола у говеђим и свињским еритроцитима и одговарајућим еритроцитним духовима добијеним градуалном хипотоничном хемолизом

5.4.2.6. Анализа антиоксидативног капацитета и липидне пероксидације у духовима говеђих и свињских еритроцита добијених градуалном хемолизом

У литератури постоје подаци да могућа оштећења мембране до којих долази услед излагања еритроцита осмотском стресу, смањују отпорност на оксидацију, односно њихов антиоксидативни капацитет [3]. На слици 40, приказани су резултати добијени анализом *in vitro* липидне пероксидације и антиоксидативног капацитета, говеђих и свињских еритроцита и одговарајућих духова добијених градуалном хемолизом. Концентрација TBARS била је значајно већа ($p < 0,05$) у узорку свињских еритроцита у односу на узорак говеђих еритроцита. Вредности TBARS добијене за резултујуће еритроцитне духове биле су знатно веће од вредности TBARS добијене за полазне еритроците, али је за оба испитивана узорка еритроцитних духова (говеђи и свињски) та вредност била слична. Као што је и очекивано, одређен антиоксидативни капацитет еритроцитних духова ове врсте (слика 40) показао је обрнути тренд у односу на полазне еритроците.



Слика 40. TBARS вредности и антиоксидативни капацитет еритроцита из говеђе и свињске кланичне крви и одговарајућих духова добијених градуалном хемоллизом. #антиоксидативни капацитет одређен је FRAP методом и изражен као што је описано у поглављу 4.2.12; * $p < 0,05$ статистички значајна разлика у TBARS вредностима између свињских и говеђих еритроцита; резултати су представљени као средње вредности \pm стандардна девијација шест независних експеримената.

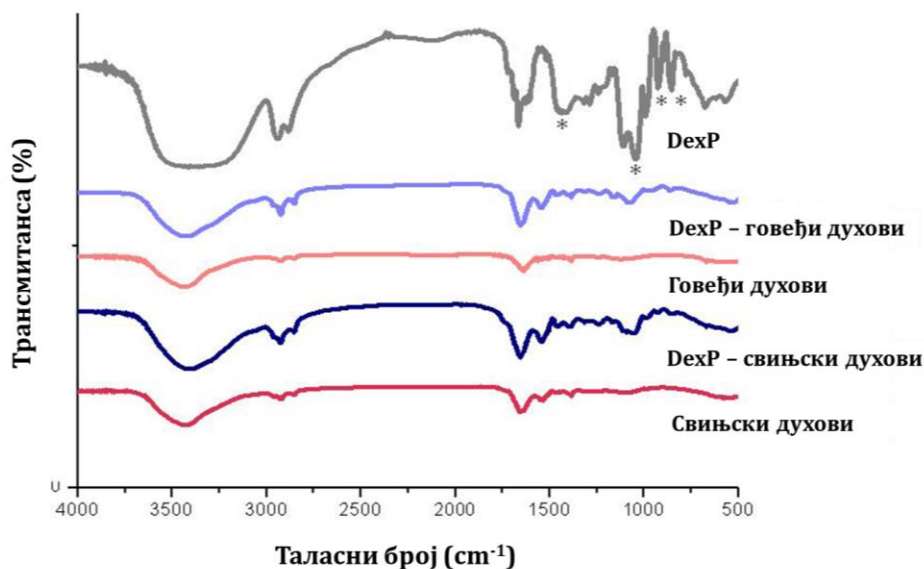
5.5. ИНКАПСУЛАЦИЈА DexP У ГОВЕЂЕ И СВИЊСКЕ ЕРИТРОЦИТНЕ ДУХОВЕ

Како би се показала потенцијална примена описаног процеса градуалне хипотоничне хемоллизе, DexP је прелиминарно инкапсулиран у говеђе и свињске еритроцитне духове, тако што је наведен лек додат у најмањој концентрацији у фазама процедуре описане у поглављу 4.2.13. У циљу потврде присуства DexP након прелиминарне инкапсулације у говеђе и свињске еритроцитне духове градуалном хемоллизом извршена је FTIR анализа.

5.5.1. ИНФРАЦРВЕНА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЈА СА ФУРИЈЕОВОМ ТРАНСФОРМАЦИЈОМ

Поред потврде присуства DexP након прелиминарне инкапсулације у говеђе и свињске еритроцитне духове градуалном хемоллизом, без оптимизације параметара инкапсулације, са најмањом концентрацијом лека,

FTIR анализом је утврђена и хемијска интеракција лека DexP и структурних компоненти обе врсте еритроцитних духова. На слици 41 приказани су добијени FTIR спектри неинкапсулираног лека DexP, празних говеђих и свињских еритроцитних духова и говеђих и свињских еритроцитних духова са инкапсулираним DexP.



Слика 41. FTIR спектри неинкапсулираног DexP, празних говеђих и свињских еритроцитних духова и DexP инкапсулираних говеђих и свињских еритроцитних духова

Неколико карактеристичних трака примећено је у свим анализираним спектрима, али су се оне разликовале по положају и интензитету. Јака и широка апсорпциона трака на 3430 cm^{-1} је детектована услед O-H вибрација савијања и растезања у спектру чистог DexP. Анализа FTIR спектра оба типа еритроцитних духова указала је на C-H вибрације растезања угљенохидратних ланаца у протеинима и фосфолипидима ($2852, 2872, 2925, 2960\text{ cm}^{-1}$), као и на неке траке типичне за фосфолипиде, конкретно P=O везу (1236 cm^{-1}), CH_2 деформационе вибрације угљенохидратних ланаца и C=O везе на око 1740 cm^{-1} [168].

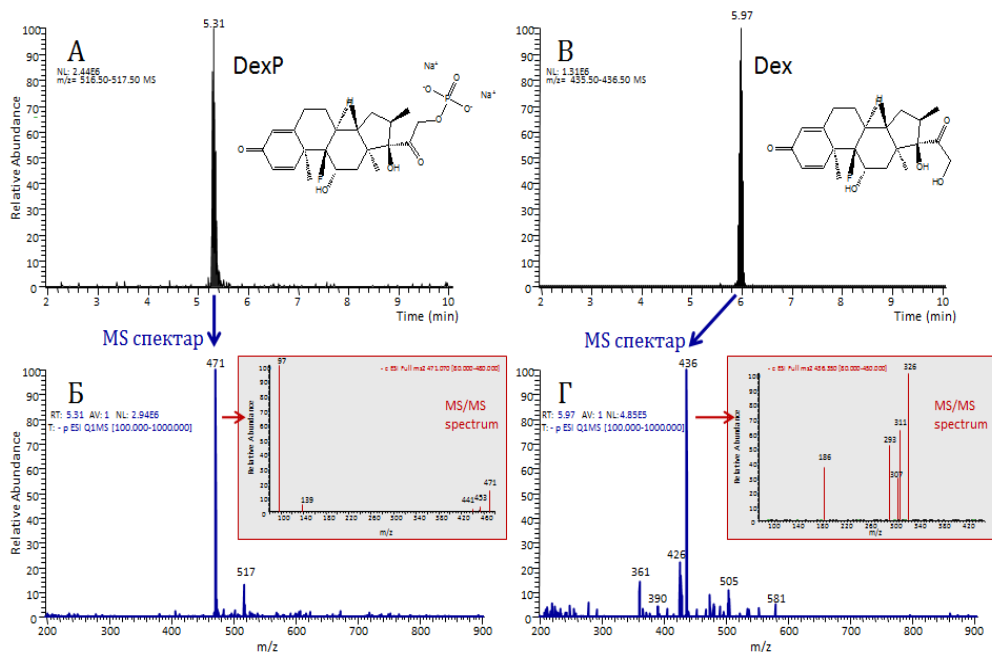
FTIR спектри узорка говеђих и свињских еритроцитних духова са инкапсулираним DexP показали су слагање са "fingerprint" регионом у спектру чистог DexP. Главни пикови DexP примећени су на $854, 925, 1045$ и 1453 cm^{-1} у спектрима узорка говеђих и свињских еритроцитних духова са инкапсулираним DexP, али су били маскирани/померени услед интеракција

инкапсулираног DexP са структурним компонентама еритроцитних духова. Из FTIR спектра DexP-инкапсулираних свињских еритроцитних духова може се видети да је апсорпциона трака на 3429 cm^{-1} померена ка таласном броју 3408 cm^{-1} , што указује на изражено присуство водоничних веза. У случају DexP-инкапсулираних говеђих еритроцитних духова померање наведеног пика мање је изражено ка таласном броју 3422 cm^{-1} . Приметан је појачан интензитет трака на 2852 и 2925 cm^{-1} и растући интензитет односа трака $2852/2925$ код оба испитивана узорка са инкапсулираним DexP. Ипак, већа сличност са "fingerprint" регионом спектра чистог DexP била је показана код DexP-инкапсулираних свињских еритроцитних духова.

5.5.2. КВАЛИТАТИВНА И КВАНТИТАТИВНА АНАЛИЗА DexP ИНКАПСУЛИРАНОГ У ГОВЕЂЕ И СВИЊСКЕ ЕРИТРОЦИТНЕ ДУХОВЕ

У овој докторској дисертацији, развијена је и валидирана метода UHPLC/-HESI-MS/MS за апсолутну идентификацију и квантификавање DexP инкапсулираног у говеђе и свињске еритроцитне дукове. Карактеристике ове методе, попут недвосмислене (селективне) идентификације испитиване активне супстанце инкапсулиране у сложени носач какав представља еритроцитни дух, као и високе осетљивости која омогућава одређивање ниских концентрација активне супстанце (ng/ml), одредиле су је као методу избора. Најпре је на основу UHPLC/-HESI-MS/MS хроматограма укупних јона (енгл. *Total Ion Chromatogram*, TIC) чистог неинкапсулираног DexP (слика 42A) јасно показан пик DexP на ретенционом времену (енгл. *Retention time*, Rt) 5,31 min са пиком продукт јона масе m/z 471 (слика 42B), што одговара квази молекулском јону- $[M+H-2Na]^-$. MS/MS анализа јона прекурсора DexP m/z 471 је дала као главне – MS² фрагменте m/z 471, m/z 453, m/z 441, m/z 139, и m/z 97 (слика 42B). Паралелно је урађена анализа и добијен UHPLC/-HESI-MS TIC хроматограм дефосфорилисаног облика DexP, дексаметазона (Dex) (слика 42 B и Г). UHPLC/-HESI-MS TIC хроматограм Dex је за разлику од DexP јасно показао пик са ретенционим временом Rt=5,96 min са пиком продукт јона масе m/z 436 (слика 42B), што одговара насталом производу са мрављом киселином $[M-H+HCOO]^-$ као резултат коришћења мравље киселине као мобилне фазе. MS/MS анализа јона прекурсора Dex масе m/z

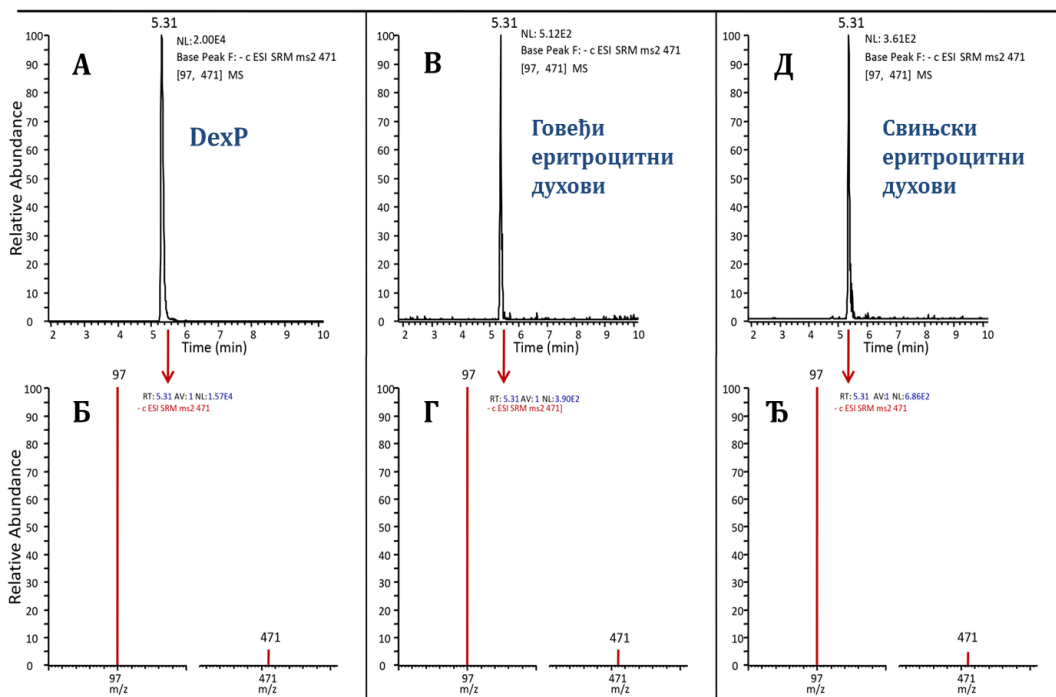
436 дала је главне – MS² фрагменте масе m/z 326, m/z 311, m/z 307, m/z 293 и m/z 186 (слика 42Г). На овај начин, Dex и DexP су били јасно хроматографски раздвојени и могли су се разликовати на основу MS и MS/MS спектра.



Слика 42. Разлике у MS и MS/MS спектрима DexP (A и B) и његовог дефосфорилисаног облика Dex (B и Г)

Апсолутна квантификација DexP у узорцима је извршена у SRM експериментима, као најосетљивијем типу анализе коришћеног масеног спектрофотометра са троструким квадруполем, на основу фрагмената m/z M-H⁻ од 471,29 и m/z M-H⁻ од 97,14, поређењем са стандардом DexP (слика 43). Линерна регресиона анализа DexP калибрационе криве показала је одличну линеарност, уз корелациони коефицијент од $r = 0,9999$, $p < 0,001$. Разблажења стандарда припремљена су растварањем у метанолу, у опсегу концентрација 2,5 ng/ml до 1000 ng/ml. Лимит детекције и квантификације за метод износили су 0,1 и 2,5 ng/ml, респективно. Између и током анализа варијације метода унутар линеарног опсега су биле мање од 10% што је одговарало тачности већој од 90% у свим случајевима. Отпуштање DexP из говеђих и свињских еритроцитних духова праћено је паралелно и DAD анализом (енгл.

Diode Array Detection). Присуство дефосфорилисаног облика лека, DexP није било детектовано ни у свињским ни у говеђим еритроцитним духовима, указујући на комплетну очуваност (енгл. *recovery*) лека DexP инкапсулираног у еритроцитне духове.



Слика 43. Апсолутна квантификација DexP стандарда (А, Б) и инкапсулираног DexP у говеђе (В, Г) и свињске (Д, Ђ) еритроцитне духове извршена у SRM експериментима на основу фрагмента m/z М-Н од 471,29 и m/z М-Н од 97,14

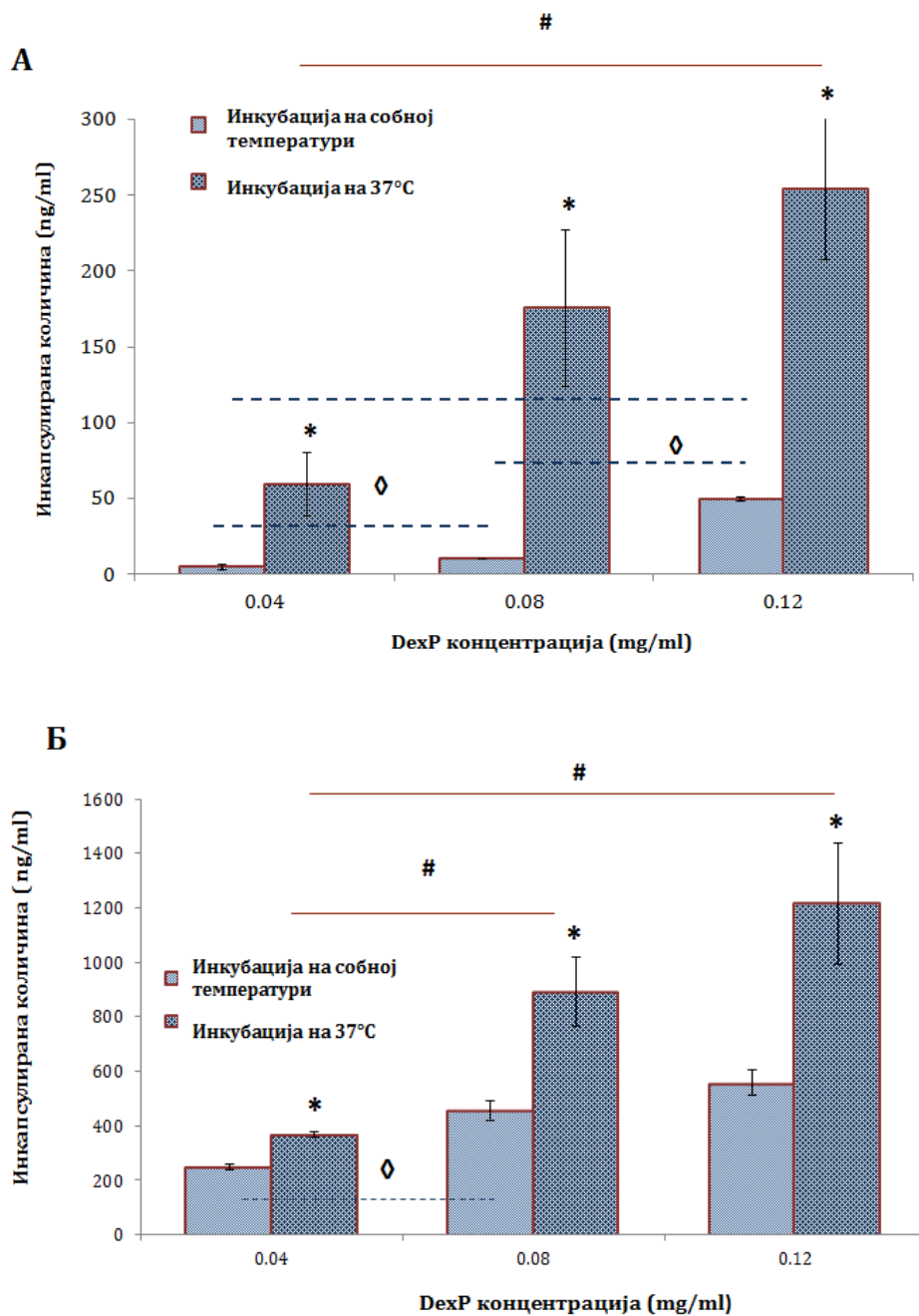
5.5.3. ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ПРОЦЕСНИХ ПАРАМЕТАРА НА ЕФИКАСНОСТ ИНКАПСУЛАЦИЈЕ DexP У ГОВЕЂЕ И СВИЊСКЕ ЕРИТРОЦИТНЕ ДУХОВЕ

Процесом градуалне хемоллизе извршена је инкапсулација DexP у свињске и говеђе еритроцитне духове, на начин описан у поглављу 4.2.13. Са циљем оптимизације процеса, тј. постизања максималне ефикасности инкапсулације DexP, анализиран је утицај температуре инкубације, концентрације лека и додатка глутаралдехида на инкапсулирану количину лека у говеђе и свињске еритроцитне духове. Утицај различитих концентрација DexP и температуре инкубације на количину лека која се инкапсулира у говеђе и свињске еритроцитне духове, приказан је на слици 44.

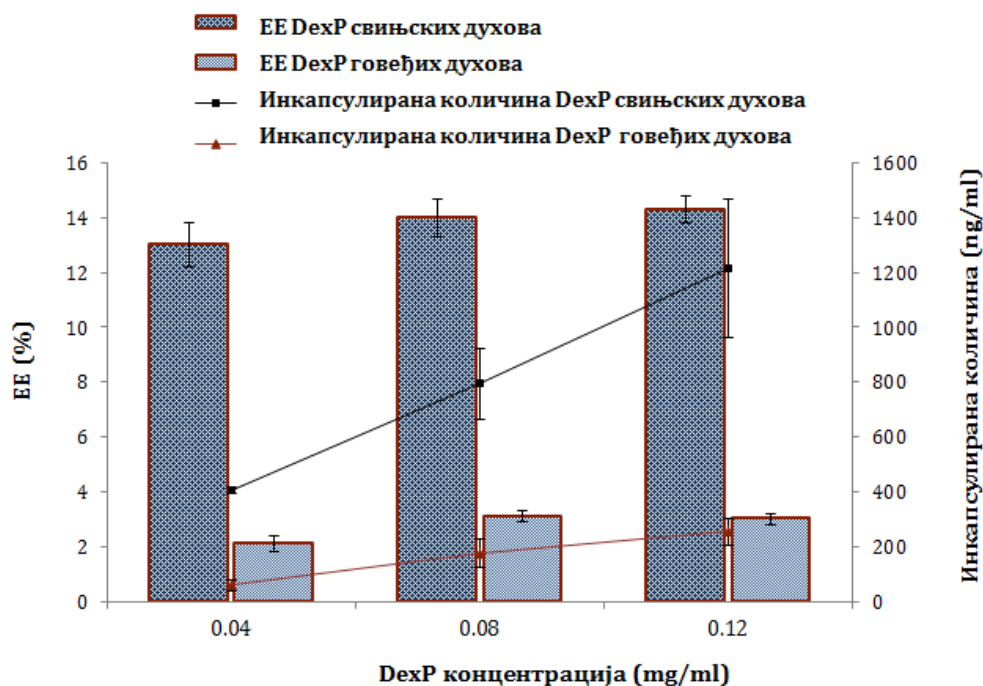
Без обзира на концентрацију лека као и врсту еритроцитних духова, инкубација на 37°C имала је статистички значајан стимулативни ефекат на количину инкапсулираног DexP у еритроцитним духовима ($p < 0,05$). Израженији ефекат инкубације на 37°C постигнут је у случају инкапсулације DexP у говеђе еритроцитне духове, где је концентрација DexP, коришћењем почетне концентрације лека од 0,08 mg/ml, чак 18 пута већа у односу на количину инкапсулираног лека добијену након инкубације на собној температури (слика 44А). Очигледно је да се под истим експерименталним условима много веће вредности инкапсулираног DexP добијају у свињским него у говеђим еритроцитним духовима (слика 44Б). Такође, резултати су показали да је инкапсулација DexP у обе врсте еритроцитних духова директно пропорционална порасту концентрације лека у пуферу за инкубацију, у опсегу испитиваних концентрација од 0,04 до 0,12 mg/ml.

Ефикасност инкапсулације DexP у говеђе и свињске еритроците духове при различитим концентрацијама лека, на температури од 37°C приказана је на слици 45. При истим експерименталним условима, инкапсулација DexP била је пет пута ефикаснија код свињских у односу на говеђе еритроцитне духове. Добијене вредности ефикасности инкапсулације (ЕЕ) показале су да примена различитих концентрација DexP није значајно утицала на ефикасност инкапсулације. Тако су вредности ЕЕ, независно од примењене

концентрације DexP износиле 13-14% и 2-3% у случају свињских, односно говеђих еритроцитних духова.

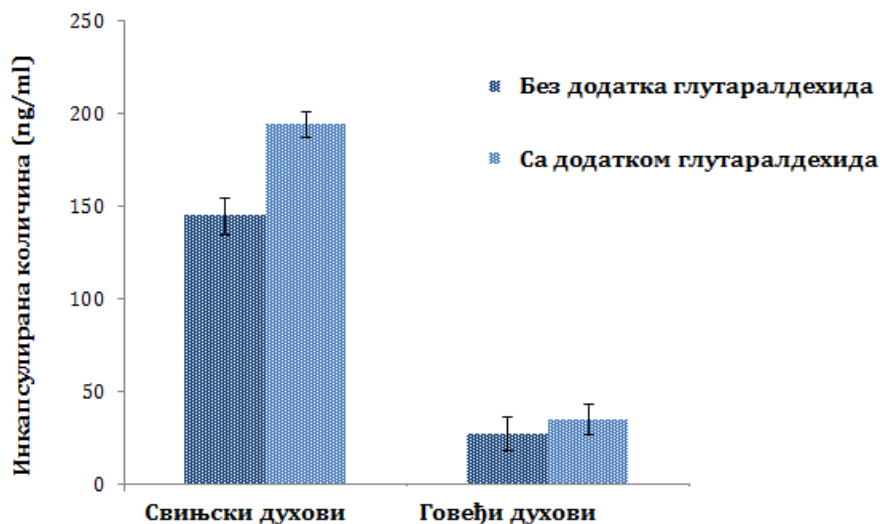


Слика 44. Утицај температуре инкубације и концентрације лека на инкапсулацију DexP у А) говеђе и Б) свињске еритроцитне духове. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардне девијације, три узорка у свакој групи. (*) статистички различите вредности инкапсулиране количине лека након инкубације на 37°C и собној температури. Статистички различите вредности инкапсулиране количине лека при различитим полазним концентарцијама лека након инкубације на собној температури (\diamond) и на 37°C (#). Статистичка значајност је одређена t-тестом, где је за ниво значајности узето $p < 0,05$



Слика 45. Утицај концентрације DexP на ефикасност инкапсулације у говеђе и свињске еритроците духова на 37°C. Резултати су приказани као средња вредност±стандардна девијација три експеримента

Иако није показана статистички значајна разлика у ефикасности инкапсулације при додавању различитих концентрација лека у инкубациони пуфер (слика 45), показани значајни утицај концентрације DexP од 0,12 mg/ml и температуре инкубације од 37°C на количину инкапсулираног лека, одредили су ове параметре процедуре инкапсулације као најповољније за оба типа иститиваних еритроцитних духова. Лек је у овој концентрацији додат у хипертоничним, као и изотоничним фазама процедуре инкапсулације. Додавање воденог раствора глутаралдехида (0,01% (v/v)) у хипертоничној фази процедуре инкапсулације у овом истраживању није показало значајан утицај на побољшање параметара инкапсулације DexP ($p > 0,05$) (слика 46).



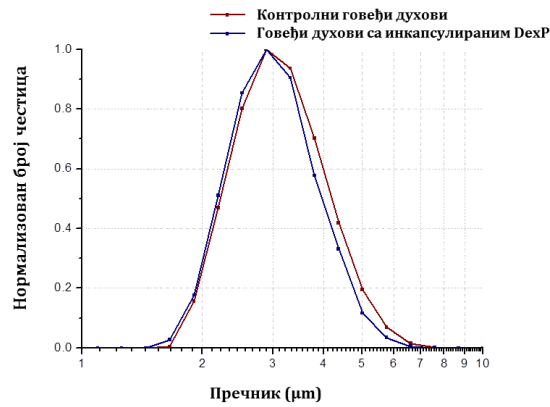
Слика 46. Утицај додатог глутаралдехида (0,01% (v/v)) на количину инкапсулираног DexP у говеђе и свињске еритроците духова на 37°C. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација три експеримента

5.5.4. МОРФОЛОШКА АНАЛИЗА ГОВЕЂИХ И СВИЊСКИХ ЕРИТРОЦИТНИХ ДУХОВА СА ИНКАПСУЛИРАНИМ DexP

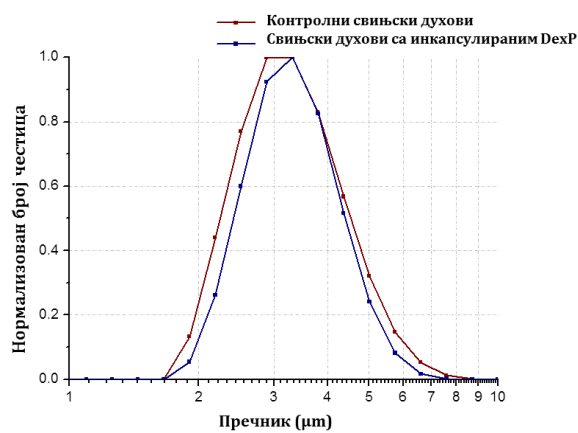
Како је за контролисано отпуштање од значаја и униформна величина духова са инкапсулираним леком, детаљно је анализирана величина инкапсулираних духова методом ласерске дифракције. На слици 47, приказане су логаритамске криве расподеле величине контролних (привидно инкапсулираних) говеђих (А) и свињских (Б) еритроцитних духова и духова са инкапсулираним леком DexP. Изведени статистички подаци су приказани у табели 11.

На основу мерења приказаних у табели 11, закључено је да није било значајне разлике у величини између контролних (привидно инкапсулираних) говеђих и свињских еритроцитних духова и оних са инкапсулираним DexP ($p > 0,05$). Величина еритроцитних духова била је приближно иста за све четири врсте формулације, што указује да поступак инкапсулације DexP градуалном хипотоничном хемоллизом није значајно утицао на величину еритроцитних духова, као и на расподелу величине.

А



Б



Слика 47. Логаритамска зависност нормализованог броја говеђих (А) и свињских (Б) контролних еритроцитних духова и еритроцитних духова са инкапсулираним DexP од њиховог пречника

Табела 11. Утицај инкапсулације DexP на расподелу величине говеђих и свињских еритроцитних духова

	Статистички параметри расподеле величине честица (μm)			
	Говеђи еритроцитни духове		Свињски еритроцитни духове	
	Контрола	DexP	Контрола	DexP
$d(N,0,1)^a$	2,12 ± 0,01	1,99 ± 0,01	2,38 ± 0,03	2,19 ± 0,02
$d(N,0,5)^a$	2,88 ± 0,01	2,74 ± 0,02	3,00 ± 0,02	3,05 ± 0,03
$d(N,0,9)^a$	3,99 ± 0,02	3,89 ± 0,02	4,37 ± 0,02	4,62 ± 0,02
Расподела величине^b	0,65 ± 0,01	0,69 ± 0,02	0,67 ± 0,02	0,70 ± 0,02

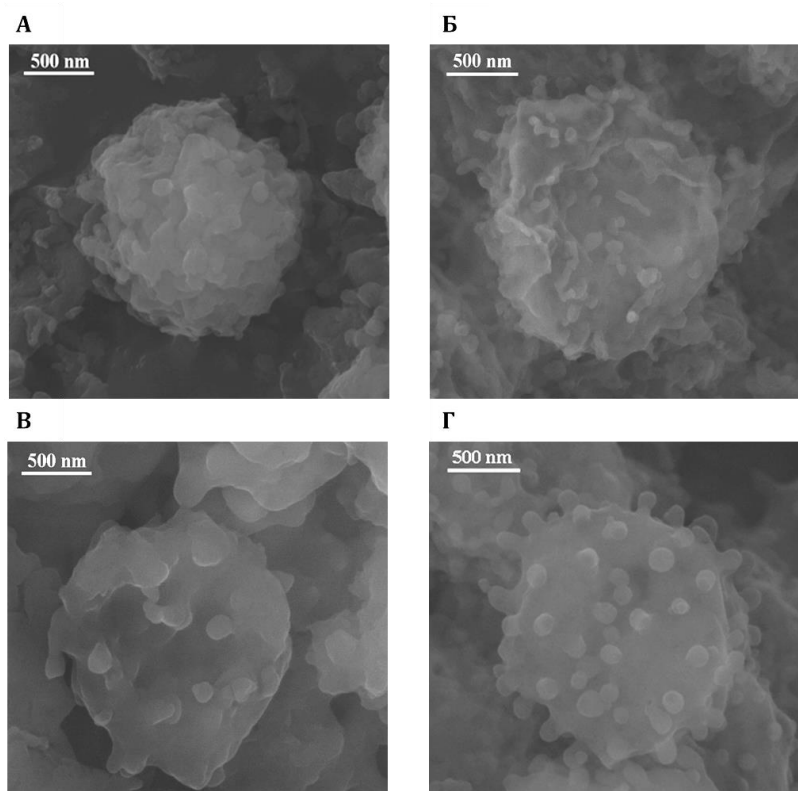
^aСредње вредности ± стандардна девијација три експеримента

^bОвај параметер указује на 10., 50. (средњи) и 90. перцентил.

^вПараметар који указује на дисперзију података, дефинисаних као $(d(N, 0,9) - d(N, 0,1)) / d(N, 0,5)$.

5.5.4.1. Скенирајућа електронска микроскопија (FE-SEM)

На слици 48. приказане су скенирајуће електронске микрографије контролних и говеђих и свињских еритроцитних духова са инкапсулираним DexP. FE-SEM слике оба типа инкапсулираних духова (слика 48 Б, Г) показују да добијени еритроцитни духови носачи имају сличан облик као контролни (привидно инкапсулирани) духови на основу чега је закључено да процедуре инкапсулације DexP у духове не узрокују значајне морфолошке промене. Међутим, иако минималне разлике у облику, величини као и топологији привидно инкапсулираних у поређењу са духовима са инкапсулираним DexP, биле су више изражене код свињских духова (слика 48 В, Г).



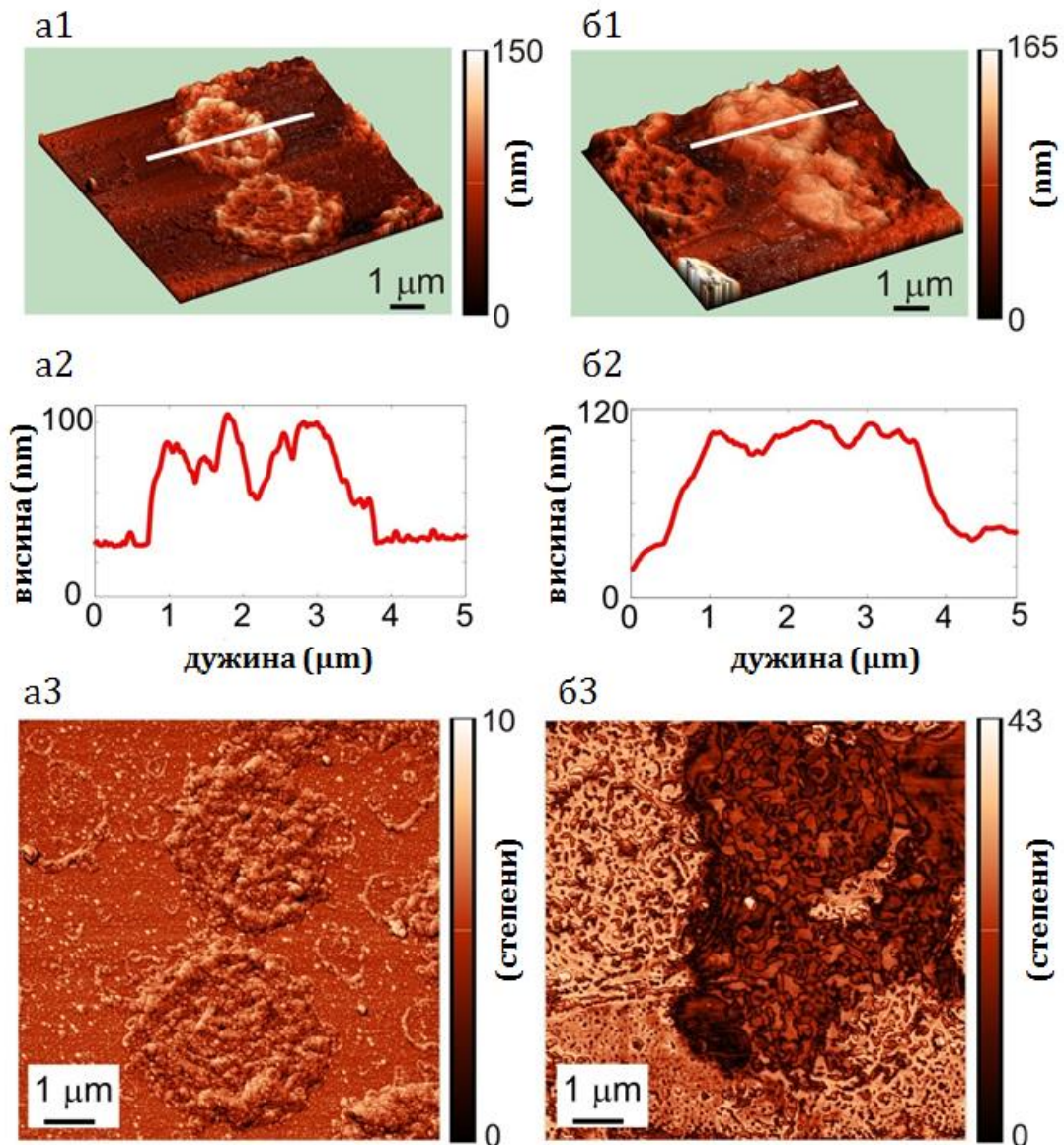
Слика 48. Скенирајуће електронске микрографије : А- контролни говеђи еритроцитни духови, Б- DexP инкапсулирани говеђи еритроцитни духови, В- контролни свињски еритроцитни духови, Г- DexP инкапсулирани свињски еритроцитни духови

5.5.4.2 Микроскопија атомских сила (AFM)

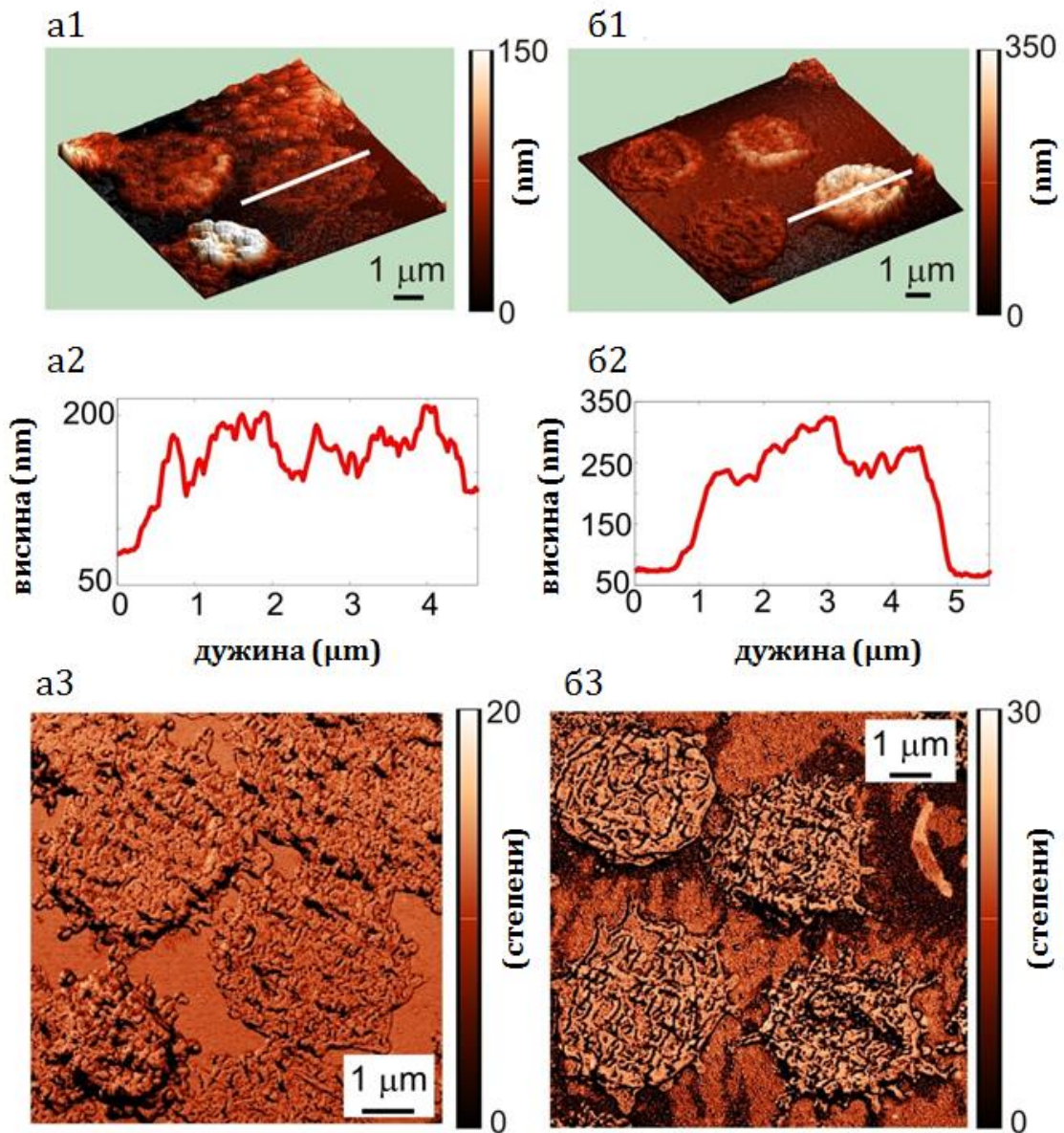
У циљу добијања још детаљнијег увида у топологију испитиваних говеђих и свињских еритроцитних духова са инкапсулираним DexP, урађене су AFM

анализе. У поређењу са FE-SEM анализом која је обезбедила квалитативну морфолошку карактеризацију духова, применом AFM анализе запажене морфолошке промене могле су бити и квантификоване кроз израчунавање храпавости површине односно RMS вредности. Резултати AFM морфолошке анализе дати су на сликама 49 и 50 за DexP инкапсулиране говеђе и свињске еритроцитне духове, конкретно тродимензионалне топографске слике (слике (а1) и (б1)) и висина попречног пресека дуж селектованих линија на узорцима (Слике (а2) и (б2)). Током померања AFM сонде по површини узорка, и амплитудне и фазне осцилације AFM носача сонде под утицајем су рељефа узорка. У близини оштрих ивица код топографија, AFM промене фазе су нагле, па се фазне микрографије могу користити за бољу визуализацију ивица мембранских инвагинација. Фазне слике испитиваних узорака духова приказане су на сликама 49 (а3) и (б3) за контролне и DexP инкапсулиране говеђе еритроцитне духове, односно, на сликама 50 (а3) и (б3) за контролне и DexP инкапсулиране свињске еритроцитне духове, респективно.

На фазним сликама се "кашњење" фазе, тј. када AFM носач сонде прелази преко површине духова, представља као светао контраст. С друге стране, ивице мембранских инвагинација могу се јасно уочити као тамне појаве унутар површине еритроцита, јер ови делови одговарају максималном "кашњењу" фазе AFM носача сонде у односу на површину еритроцитних духова. Према добијеним AFM микрографијама, контролни говеђи еритроцитни духови имају значајну површину са мембранским инвагинацијама. Добијена вредност RMS за површинску храпавост лажно инкапсулираних (контролних) духова износила је $17,1 \pm 1,5$ nm. Инкапсулација DexP довела до благог (али статистички незначајног, $p > 0,05$) пада RMS вредности у односу на површинску храпавост контролних говеђих еритроцитних духова, и та вредност је износила $15,9 \pm 2,8$ nm. RMS вредности за површинску храпавост за контролне и DexP инкапсулиране свињске еритроцитне духове износиле су $30,0 \pm 5,4$ nm и $34,2 \pm 7,7$ nm, респективно. Међутим, ни ова разлика се није показала као статистички значајна ($p > 0,05$). Ипак, AFM анализа показала је значајне разлике у морфологији говеђих и свињских еритроцитних духова, како у случају контролних, тако и духова са инкапсулираним леком ($p < 0,05$).



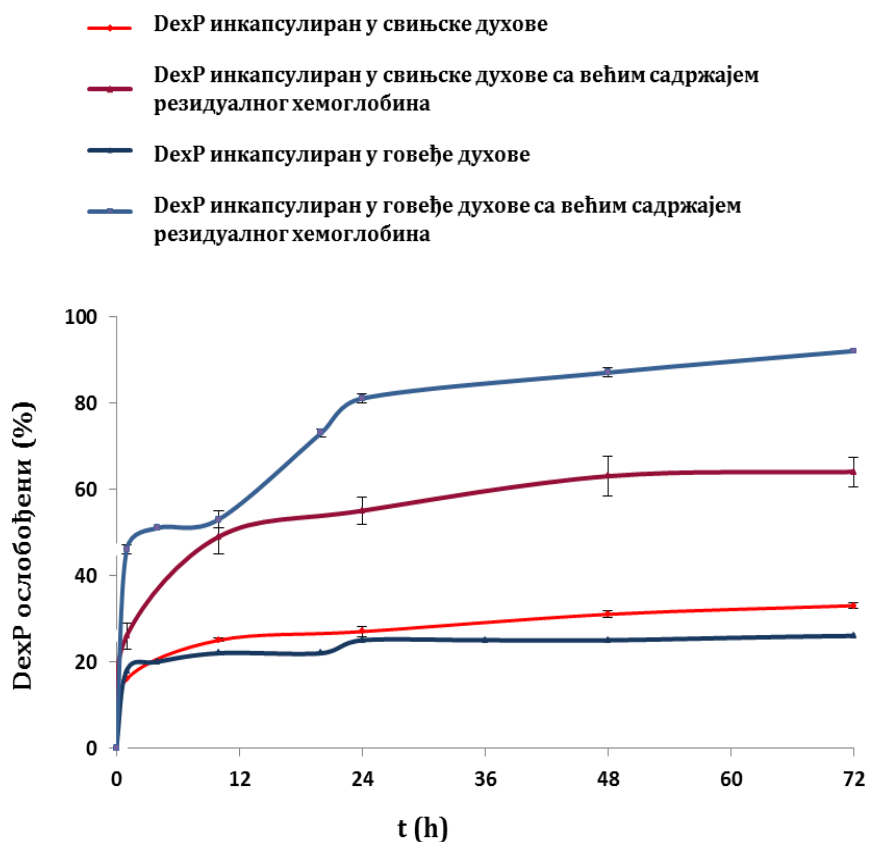
Слика 49. АФМ анализа утицаја процедуре инкапсулације DexP на морфологију: (а) контролних говеђих еритроцитних духова (б) DexP инкапсулираних говеђих еритроцитних духова. Слике (а1), (б1) представљају тридимензионалне топографије. Слике (а2), (б2) представљају висински профил узорака дуж линија означених на сликама (а1), (б1), респективно. АФМ фазне слике добијене су симултано са топографским сликама и приказане као (а3), (б3).



Слика 50. АФМ анализа утицаја процедуре инкапсулације DexP на морфологију: (а) контролних свињских еритроцитних духова (б) DexP инкапсулираних свињских еритроцитних духова. Сlike (а1), (б1) представљају тридимензионалне топографије. Сlike (а2), (б2) представљају висински профил узорака дуж линија означених на сликама (а1), (б1), респективно. АФМ фазне слике добијене су симултано са топографским сликама и приказане као (а3), (б3).

5.5.5. ОТПУШТАЊЕ ИНКАПСУЛИРАНОГ DexP ИЗ ГОВЕЂИХ И СВИЊСКИХ ЕРИТРОЦИТНИХ ДУХОВА

У наредној фази рада праћено је *in vitro* отпуштање DexP из говеђих и свињских еритроцитних духова, при физиолошким условима: на 37°C у изотоничном PBS-у (pH 7,2). Иако еритроцитни духови представљају производ потпуне контролисане хемоллизе еритроцита (што подразумева да је највећи део садржаја хемоглобина уклоњен), неизбежна појава је присуство резидуалног хемоглобина у духовима, што је и описано у поглављу 5.4.2.4). Ниво резидуалног хемоглобина и у говеђим и свињским еритроцитним духовима показао је изражене индивидуалне варијације. У циљу испитивања ефекта резидуалног хемоглобина на кинетику ослобађања DexP, узорци DexP инкапсулираних духова, који су садржали нижи ниво заосталог хемоглобина упоређени су са узорцима који су имали већи садржај хемоглобина (табела 12). Криве отпуштања испитиваних узорака приказане су на слици 51.



Слика 51. Профили отпуштања DexP из еритроцитних духова са различитим садржајем заосталог хемоглобина

Као што се види са кривих отпуштања приказаних на слици 51, почетно нагло ослобађања лека, повезано са површински везаним леком више је изражено у случају говеђих еритроцитних духова. Штавише, криве отпуштања говеђих духова показују мултифазни образац ослобађања. Тако је, почетно ослобађање лека ("*burst*" фаза), у трајању од четири сата (табела 12), праћено спором "*lag*" фазом, која је трајала од шест до четрнаест сати у зависности од садржаја резидуалног хемоглобина (табела 12), а потом и другом фазом бржег отпуштања. DexP инкапсулирани свињски еритроцитни дугови имали су мањи ефлукс лека током почетне ("*burst*") фазе и изостанак друге фазе бржег отпуштања, уочене код говеђих еритроцитних духова (слика 51). Јасно се може видети да је током истог експерименталног времена, виши ниво DexP ефлукса добијен у случају оба типа узорка са већим садржајем резидуалног хемоглобина, у односу на узорке са нижим садржајем резидуалног хемоглобина. Такође се може уочити да је ефекат резидуалног хемоглобина био израженији у случају говеђих еритроцитних духова у односу на свињске еритроцитне дугове.

Табела 12. Параметри *in vitro* кинетике отпуштања DexP из говеђих и свињских еритроцитних духова у изотоничном PBS-у на 37°C

	Говеђи еритроцитни дугови		Свињски еритроцитни дугови	
	Мањи садржај резидуалног Hb	Већи садржај резидуалног Hb	Мањи садржај резидуалног Hb	Већи садржај резидуалног Hb
A_{540}/Hct^a	0,0004±0,0001	0,0020±0,0001	0,0012±0,0001	0,0030±0,0001
Трајање почетног периода отпуштања (h) ^b	4	6	10	10
Трајање секундарног периода отпуштања (h) ^b	12	24	/	/
Укупна количина ослобођена лека (%) ^c	26	96	33	64

Hb-хемоглобин

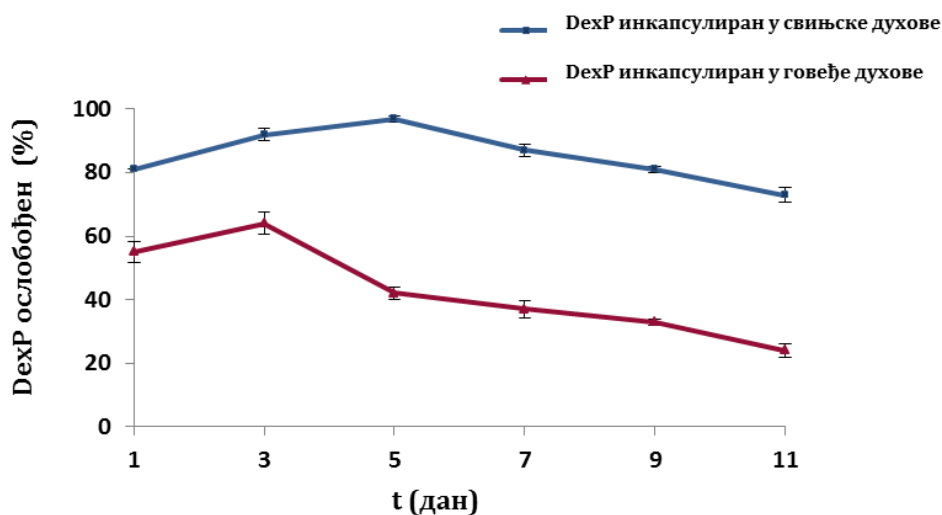
^a A_{540}/Hct представља релативну количину преосталог хемоглобина (изражена као A_{540} нормализована са Hct вредностима). Подаци су приказани као средње вредности± стандардна девијација;

^bВреме кад се почетно ослобађање лека завршава;

^cВреме кад се друго ослобађање лека завршава;

^dКоличина ослобођеног лека током трајања почетног и другог периода ослобађања лека.

Продужено отпуштање DexP постигнуто је током 3 односно 5 дана за свињске и говеђе еритроцитне духове, респективно. Још једна занимљива појава уочена је у профилима отпуштања DexP из говеђих и свињских еритроцитних духова (слика 52). Након 3 односно 5 дана продуженог ослобађања DexP, концентрација DexP у медијуму у којем је праћено отпуштање почела је да опада. Како је детектовано смањење брзине отпуштања лека могло бити последица преласка DexP у Dex, за које је описано да се дешава под утицајем фосфатаза присутних у ћелијама [52], испитали смо присуство Dex у анализираним узорцима. Применом UHPLC/-HESI-MS/MS није било могуће детектовати присуство Dex, чак ни у траговима.



Слика 52. Профили отпуштања DexP из свињских и говеђих еритроцитних духова током 11 дана

ДИСКУСИЈА

VI

Имајући на уму да се у кланицама, крв добија као споредни производ при клању животиња које су прошле контролу и прегледе за коришћење у исхрани људи, у овој докторској дисертацији урађено је испитивање могућности коришћења отпадне говеђе и свињске кланичне крви као непресушног извора биодеривативног материјала - еритроцитних мембрана (духова) које би се користиле за инкапсулацију биолошки активних супстанци. Поред доступности у месној индустрији, свињска и говеђа кланична крв као извор еритроцита имају и друге предности. На пример, у поређењу са еритроцитима живине, говеђи и свињски еритроцити, као еритроцити сисара, су ћелије без једра па се много лакше могу процесирати у циљу изоловања еритроцитних духова.

У литератури постоје бројни описи успешних примена еритроцитних духова из хумане крви као носача лекова, са битном напоменом да су све ове студије изведене са изузетно малим количинама еритроцита (до 1 ml пакованих еритроцита) [26, 169-171]. Међутим, еритроцитни духови пореклом из животињске крви су много мање истражени [37,64,172,173], посебно они добијени из већих количина говеђе и свињске кланичне крви. Познато је да су методе засноване на осмотским особинама еритроцита, као што су хипотонична хемолита, хипотонична дилуција, хипотонично пребубрење и друге, најшире коришћене методе за инкапсулацију активних супстанци у хумане и животињске еритроците/еритроцитне духове [2]. Са друге стране, подаци о осмотским особинама говеђих и свињских еритроцита из кланичне крви су оскудни. Као што су ранија истраживања показала [38,39] током процеса у коме се градуално смањује јонска јачина раствора у коме су инкубирани еритроцити, еритроцити бубре, а хемоглобин излази из ћелија, остављајући интактне еритроцитне мембране. Процесом градуалне хипотоничне хемолите је пуцање еритроцитних мембрана и ослобађање мембранских липида и протеина сведено на минимум. Генерално, привремени отвори на мембрани еритроцита величине 20–50 nm који настају током процеса хипотоничне хемолите [156] омогућавају да класични/конвенционални лекови, али и пептиди, ензими и нуклеинске киселине, додати екстрацелуларно, буду инкапсулирани [174]. На тај начин, успостављање одговарајућих хипотоничних услова у складу са специфичним

осмотским особинама еритроцита омогућава оптимизовано изоловање еритроцитних духова и инкапсулацију различитих активних супстанци у њих. Због тога су у почетној фази рада на овој докторској дисертацији испитане и упоређене осмотске особине еритроцита пореклом из говеђе и свињске кланичне крви у смислу њихове осмотске отпорности и степена бубрења.

Пре испитивања осмотских особина, анализе основних хематолошких карактеристика говеђих и свињских пакованих еритроцита изолованих из кланичне крви су показале да се средње вредности концентрације еритроцита и концентрације хемоглобина у крви, хематокрит, као и вредности MCV, MCH и MCHC нису значајно разликовале од референтних вредности за здраве животиње [155]. Овакав налаз говори да се ови основни параметри „квалитета“ еритроцита, уз коришћење натријум-цитрата као антикоагуланса и током процеса уклањања протеина плазме и добијања пакованих еритроцита из кланичне крви, не мењају. Додатно је тестом механичке фрагилности, потврђено да говеђи и свињски еритроцити изоловани из кланичне крви не показују значајан степен механички индуковане хемолize и да третирани на описан начин могу бити полазни материјал за добијање еритроцитних духова.

Добро је познато да се еритроцити сисара разликују по многим својствима (величини, запремини и облику, саставу липида мембране, саставу и структурној организацији трансмембранских и цитоскелетних протеина, ензимској активности, јонском саставу, садржају АТФ-а и других метаболита...) [155, 175]. Свако од наведених својстава у мањој или већој мери утиче на осмотске особине еритроцита. Међутим, подаци о осмотским особинама животињских еритроцита су веома ограничени и неконзистентни. Тако, Jain [155] тврди да постоји линеаран однос између величине еритроцита и њихове осмотске отпорности. Према овом тврђењу, за говеђе еритроците који су мање величине од свињских еритроцита очекује се да буду мање осмотски резистентни у поређењу са свињским еритроцитима. Са друге стране, истраживања аутора Matsuzawa и Ikarashi [176], као и Brzezińska-Slebodzińska [177] и Johnstone и сарадника [178] у сагласности су са резултатима ове докторске дисертације да су говеђи

еритроцити, иако ћелије са мањим пречником, осмотски отпорнији од свињских еритроцита. Наши резултати показали су да 50% хемолизе у узорку свињских еритроцита проузрокује раствор натријум-хлорида концентрације 118 mM (0,69% раствор NaCl), док 50% хемолизе у узорку говеђих еритроцита проузрокује раствор натријум-хлорида концентрације 108 mM (0,60% раствор NaCl). Ради поређења, према резултатима које су објавили Matsuzawa и Ikarashi [176], измерена је H_{50} у 0,51% и 0,47% раствору NaCl за свињске и говеђе еритроците, респективно. У студији Johnstone и сарадника [178] H_{50} вредност одређена је у 0,56% раствору NaCl за свињске и 0,48% NaCl за говеђе еритроците. Једно од објашњења за повећану осмотску фрагилност свињских еритроцита, може бити поремећај метаболизма и последично оксидативна оштећења мембрана еритроцита, услед транспорта животиња од фарме до кланице и/или услед третмана животиња у кланицама, како су предложили други аутори [179,180]. У литератури је познато да међу анализираним еритроцитима сисара до данас, свињски еритроцити јесу најосетљивији према оксидативном стресу индукованим слободним радикалима [177]. Објашњење за овај феномен може бити нижи ниво ензима антиоксидативне заштите које свињски еритроцити имају у односу на друге врсте [181].

Осим једне студије Jain-а [155], у литератури не постоје подаци других аутора о степену бубрења говеђих и свињских еритроцита. Да би се дефинисао оптимални хипоосмотски пуферски систем чијим коришћењем је могуће лизирати еритроците уз очување структуре њихове мембране, испитан је степен хемолизе и степен бубрења говеђих и свињских еритроцита у Na-фосфат/NaCl пуферима различите моларности (pH 7,2-7,4) применом две методе: микрохематокритске методе (по Vitvitsky и сар. [147]) и проточне цитометрије (по модификованој методи Piagnerelli и сар. [159]). Методе су дале сагласне резултате по питању осмотске фрагилности испитиваних врста еритроцита (слике 25-30), односно да су свињски еритроцити из кланичне крви осмотски фрагилнији од говеђих еритроцита из истог извора. Међутим, док је микрохематокритска метода дала индекс бубрења приближно 2 за обе врсте испитиваних еритроцита, метода проточном цитометријом није показала бубрење у случају свињских

еритроцита. Ипак, методом проточне цитометрије при испитивању осмотског бубрења потврђено је постојање осмотски различитих фракција еритроцита у узорцима изолованим из говеђе и свињске кланичне крви. На овакав резултат прелиминарно је указала деривација резултата добијених тестом осмотске фрагилности (слика 26). Очигледно је (слике 29 и 30) да се наведене фракције разликују у величини (о чему говори бимодална расподела величине еритроцита у хипотоничним пуферима) и својству бубрења. Колико је до сада познато, бимодална дистрибуција величине ћелија која се детектује проточном цитометријом типична је за биконкавне ћелије као што су еритроцити, када се ћелије налазе у изотоничној средини [160]. Како то не важи за еритроците у хипотоничним условима, у којем су попримили сферичан облик, добијени резултат о бубрењу еритроцита проточном цитометријом указује на постојање осмотски различитих фракција еритроцита у узорцима изолованим из говеђе и свињске кланичне крви. На основу овог резултата и резултата већ показаних у литератури за хумане еритроците [171], може се очекивати различита количина инкапсулиране активне супстанце по појединачном еритроциту/еритроцитном духу уколико се за инкапсулацију користи метода заснована на осмози.

Следећи корак била је изолација еритроцитних духова са што мањим садржајем хемоглобина из говеђе и свињске кланичне крви процесом хемолизе у коме је одабрани хипотонични пуфер увођен градуално. Процес градуалне хемолизе је једноставан и без високе цене коштања, јер захтева само реакторску посуду у којој се одвија хемолита, систем за мешање и перисталтичку пумпу. Овај процес се може вршити и у стерилним условима. Због могућности лаког увећања размера, процес је конципиран тако да се примењују само јефтине пуферски системи (Na-фосфат/NaCl пуфери) без додатака адитива (нутријената), који би могли повећати квалитет добијених духова, али и цену коштања процеса. На основу резултата детаљног испитивања осмотских особина говеђих и свињских еритроцита из кланичне крви, градуална хемолита велике запремине еритроцита (100 ml, Hct 60%) изведена је са 35 mM Na-фосфат/NaCl пуфером. Тиме је обезбеђено >90% хемолизе за оба типа испитиваних еритроцита (слика 32) при протоку

пуфера од 300 ml/h током 30 min. Изоловани еритроцитни духови из говеђе и свињске кланичне крви окарактерисани су у смислу морфолошких и биохемијских својстава која би имали утицај на дифузиони и подеони коефицијент потенцијално инкапсулиране активне супстанце. У литератури је познато да се из неких полимера, инкапсулирана активна супстанца отпушта десорбовањем са површине и дифузијом из запремине; овакав начин отпуштања потенцијално инкапсулиране активне супстанце веома зависи од величине, храпавости и специфичне површине материјала коришћеног за инкапсулацију [182]. Тако су у смислу морфологије, анализиране топографске карактеристике - облик, величина, храпавост изолованих празних говеђих и свињских еритроцитних духова. Морфолошка анализа FE-SEM-ом еритроцитних духова обе врсте, открива значајну дисторзију од еритроцитног облика, и измењену текстуру површине са израженим наборима и постојањем бројних инвагинација (слика 35 Б и Г). Ехиноцитна морфологија уочена код свињских еритроцитних духова карактеристична је за хумане еритроците којима је уклоњен АТР, и за хумане еритроцитне духове добијене лизом у хипотоничном раствору PBS-а [166]. Резултати имуноблот анализе којом је испитиван ниво фосфорилисаог тирозина у мембранским/цитоскелетним протеинима дугова еритроцита (*наши непубликовани резултати*) показали су да су морфолошке промене духова еритроцита обе врсте праћене потпуним одсуством фосфорилације тирозина у саставу трансмембранских/цитоскелетних протеина, што иде у прилог тврђењу да су морфолошке промене последица "цурења" донора фосфатне групе, АТР-а, током хемолize. Показане морфолошке промене говеђих и свињских духова могу бити последица и промена у липидном двослоју или структуре цитоскелета, изазване утицајем хипоосмотског пуфера коришћеног за хемолизу, као што је документовано за хумане еритроцитне духове [166].

Резултати мерења величине и расподеле величине методом ласерске дифракције, као и резултати FE-SEM анализе, указали су да процес градуалне хемолize доводи до смањења величине резултујућих духова у односу на полазне еритроците у просеку за само 10%. Поред тога, расподела величине добијених еритроцитних духова била је приближно иста за оба типа

испитиваних еритроцита из кланичне крви. Овај резултат потврдио је да је процес градуалне хемолизе имао само благи утицај на величину еритроцитних духова, односно да је без утицаја на расподелу величине испитиваних еритроцитних духова. Ради поређења, Montes и сарадници [183] објавили су резултате који показују да се класичном хемолизом, тзв. "осмотским шоком" добијају хумани еритроцитни духови чија је величина три пута мања у односу на величину полазних еритроцита (за мерење је коришћена метода статичке дифракције светлости применом уређаја Zetasizer). Показана униформна расподела величине за оба узорка еритроцитних духова добијених процесом градуалне хемолизе је од изузетног значаја за њихову потенцијалну примену за отпуштање инкапсулиране биолошки активне супстанце.

Иако се SDS-PAGE сматра „грубом“ анализом за одређивање протеинског садржаја, она може бити изузетно корисна у процени утицаја различитих хемијских и физичких агенаса на свеукупни протеински састав мембране еритроцита [184]. SDS-PAGE анализом говеђих и свињских мембрана еритроцита добијених градуалном хемолизом, показано је да оне садрже све главне протеинске фракције које се налазе у интактним мембранама еритроцита. Добијени резултат потвђује да градуална хипотонична хемолизе није довела до губитка ни једне од главних протеинских фракција мембране/цитоскелетона изолованих еритроцитних духова обе врсте.

Резултати теста везивања анексина V показали су да еритроцитни духови обе врсте испољавају фосфатидилсерин у спољашњем слоју мембране, што указује да је процес градуалне хемолизе индуковао реорганизацију у фосфолипидном двослоју мембране испитиваних еритроцита. У литератури је већ показано да излагање говеђих еритроцита оксидативном стресу проузрукује делимично испољавање фосфатидилетаноламина (40%) и фосфатидилсерина (30-33%) у спољашњем слоју фосфолипидног двослоја мембране [185]. Испољавање фосфатидилсерина из унутрашњег слоја еритроцитне плазма мембране у спољашњи, дешава се када се еритроцити нађу у осмотски "неповољном окружењу", као што је хипотоничан раствор [3] Поред тога, осмотски стрес

проузрокован излагањем еритроцита хипотоничним растворима може проузроковати стварање "изврнутих" (енгл. *inside out*) духова [186] и то може бити један од разлога испољавања фосфатидилсерина на површини еритроцитних духова. Показане мање промене у дистрибуцији фосфолипида и у величини говеђих и свињских еритроцитних духова изолованих градуалном хипотоничном хемолизом подразумевају свеукупно релативно очуван липидни састав обе врсте еритроцитних духова, према ауторима DeLoach и Spates [172]. Уколико би се изоловани еритроцитни духови применили као носачи активних супстанци, показане структурне промене у мембрани би вероватно довеле до њиховог препознавања и преузимања од стране макрофага [174], што указује да би ови еритроцитни духови могли имати потенцијалну примену као испоручиоци активних супстанци макрофагима и дендритским ћелијама. Холестерол, који представља кључни регулатор флуидности мембране (преко утицаја на "паковање" липида у мембрани) и деформабилности мембране (преко модулације интеракције мембранских протеина у спољашњем делу цитоскелетона [187]), може знатно утицати на пролазак активне супстанце и њено задржавање у мембрани еритроцита. Наши резултати показали су да је више од 90% холестерола присутног у интактним еритроцитима и говеда и свиња задржано у еритроцитним духовима добијеним градуалном хипотоничном хемолизом. Овај резултат указује да у процесу градуалне хемоллизе не долази до статистички значајне деплеције холестерола. Обзиром на показани очувани садржај холестерола и протеина, као и на минималне промене у величини еритроцитних духова, може се рећи да изоловани еритроцитни духови из кланичне говеђе и свињске крви имају способност да имитирају хемијско и структурно анизотропно окружење ћелијских мембрана *in vivo*, што је од значаја за дифузију и партициони коефицијент лекова при њиховој инкапсулацији.

Даље је у овој докторској дисертацији испитано да ли процес градуалне хемоллизе изазива оксидативна оштећења изолованих говеђих и свињских еритроцитних духова, при чему је резидуални хемоглобин у духовима еритроцита анализиран као један од маркера оксидативних оштећења [167]. Добијени резултати указали су на статистички значајно

већи садржај резидуалног хемоглобина у свињским у односу на говеђе еритроцитне духове. Добијени резултати SDS-PAGE говеђих и свињских еритроцитних духова потврдили су да су глобински ланци хемоглобина везани за протеине мембране/цитоскелетона (слика 38). Овај феномен везивања глобинских ланаца описан је у литератури за хумане еритроците изложене оксидативном стресу [188]. Према литературним подацима, говеђи еритроцити у мембрани имају низак ниво незасићених масних киселина које су склоне оксидацији, па су на тај начин мање подложни липидној пероксидацији [189]. Значајно веће вредности TBARS добијене за свињске духове у односу на говеђе духове, биле су у складу са наведеним литературним подацима о осетљивости ових врста еритроцита на липидну пероксидацију [189]. Добијени подаци о смањеном (скоро недектабилном) антиоксидативном капацитету (слика 40) и говеђих и свињских еритроцитних духова у односу на полазне еритроците су очекивани и последица су уклањања унутарћелијских компоненти антиоксидативног система, заједно са хемоглобином током процеса градуалне хемоллизе.

Као биолошки активна супстанца за инкапсулацију, у овој докторској дисертацији изабран је DexP, широко коришћени глукокортикоид са израженим антиинфламаторним и имуносупресивним дејством, али и бројним нежељеним ефектима [190]. Поред терапијске примене, DexP је у великој мери неопходан и као састојак медијума за ћелијске културе, али је његова директна примена ограничена због токсичних ефеката на ћелије [141,191]. Без обзира на сврху примене DexP, показано је да се наведени нежељени ефекти могу избећи уколико се лек примени кроз систем који обезбеђује његово контролисано или продужено ослобађање [53,54,141,192,193]; из тог разлога постоји потреба за сталним развојем (нових) система за продужено отпуштање DexP. За разлику од биолошких носача лекова заснованих на ћелијама, синтетски носачи лекова као што су полимерне или липидне честице, често не испуњавају клиничка очекивања [18]. Због тога су биолошки носачи, добијени од бактеријских и сисарских ћелија, који имају својство контролисане и продужене испоруке лека посебно привлачни истраживачима и клиничарима као системи са потенцијалом за *in vivo* примену [18]. У литератури добро позната примена аутологих хуманих

еритроцита као система за контролисано отпуштање DexP, са фармакокинетичког и фармакодинамичког аспекта даје изузетно задовољавајуће резултате у персонализованој медицини [52]. Ипак, у циљу производње универзалног система за испоруку DexP, примена хетерологих (алогених) еритроцита је неприхватљива због ограничене количине еритроцита доступних за добијање овакве формулације. Други лимитирајући фактор је недостатак индустријске процедуре за производњу таквих система. Из тог разлога је врло битно било размотрити говеђу и свињску кланичну крв, као непресушан извор полазног материјала за добијање нових носача DexP, а кроз развој процеса градуалне хипотоничне хемолизе. Како је у првом делу ове докторске дисертације резултатима биохемијских и морфолошких анализа, показано да се процесом градуалне хипотоничне хемолизе добијају еритроцитни духови из кланичне говеђе и свињске крви који имају способност да имитирају хемијско и структурно анизотропно окружење ћелијских мембрана *in vivo*, у другом делу овог истраживања приступило се инкапсулацији DexP.

У циљу демонстрације примене описаног процеса градуалне хипотоничне хемолизе, DexP је прелиминарно инкапсулиран у еритроцитне духове из говеђе и свињске кланичне крви, без оптимизације параметара инкапсулације, и са најмањом концентрацијом лека. У поређењу са другим методама за инкапсулацију активних супстанци у еритроцитне мембране описаних у литератури, може се рећи да се градуална хипотонична хемолита базира на принципима неколико метода. Наиме, процес је пројектован тако да се изврши уклањање хемоглобина у што је могуће већој мери, да би се он даље могао користити као извор хемског гвожђа [38], што је главна карактеристика методе хипотоничне хемолизе (видети поглавље 2.5.1). Другим речима, постављен је циљ да се добију духови са што мањим садржајем хемоглобина. Садржај хемоглобина у финалним духовима у великој мери зависи од интериндивидуалних варијација у полазним еритроцитима, а може се до одређене мере мењати променом броја циклуса испирања духова након градуалне хемолизе. У погледу фаза у којима се додаје лек, примењена градуална хипотонична хемолита има карактеристике хипотоничне дилуције, у којој се лек додаје већ у фази са

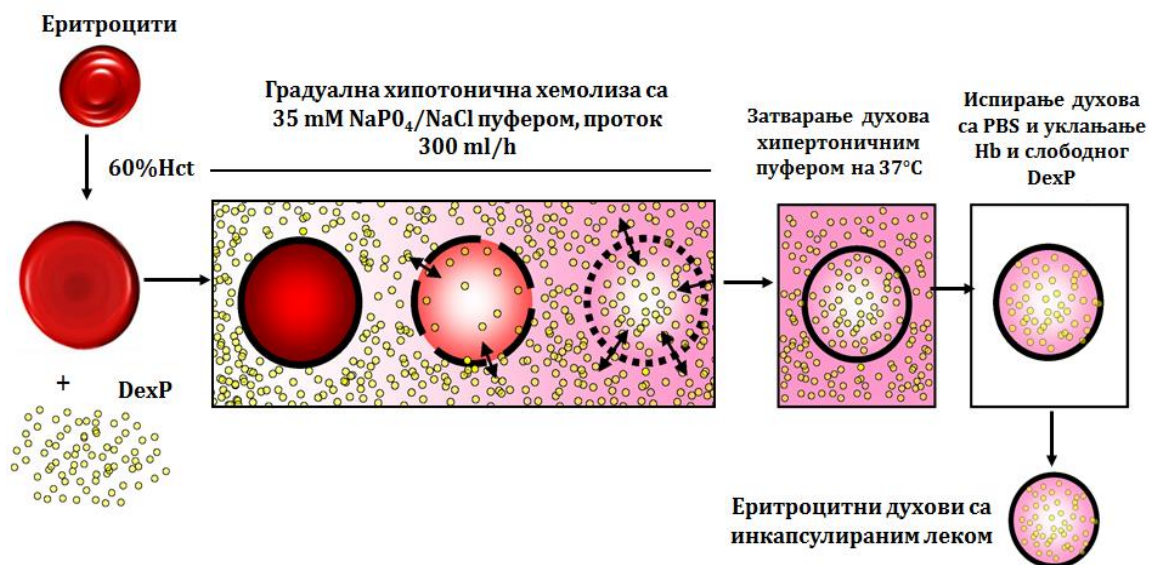
хипотоничним пуфером, као и хипотоничне дијализе у којој се лек додаје и са хипертоничним пуфером. Поред тога, градуалном хипотоничном хемолизом врши се и контрола бубрења еритроцита, на чему се заснива метода хипотоничног пре-бубрења (видети поглавље 2.5.1). Предност примењене градуалне хипотоничне хемоллизе управо јесте контрола бубрења, односно спречавање пуцања еритроцита у хипотоничној средини, што омогућава реверзибилно отварање хемолитичких отвора и последично инкапсулацију активне супстанце. Такође, градуална хипотонична хемолиза не захтева скупу посебну дизајнирану опрему, као што је то нпр. случај са хипотоничном дијализом (видети поглавље 2.5.1).

Потврда присуства DexP након прелиминарне инкапсулације у говеђе и свињске еритроцитне духове градуалном хемолизом урађена је FTIR анализом, на основу појаве специфичних трака из "*fingerprint*" региона чистог DexP у спектрима говеђих и свињских духова са инкапсулираним DexP (слика 41). Поред тога појачан интензитет трака на 2852 и 2925 cm^{-1} заједно са растућим интензитетом односа трака 2852/2925 указао је на повећану уређеност мембране еритроцита обе испитиване врсте са инкапсулираним DexP [194]. Ипак, већа сличност са "*fingerprint*" регионом спектра чистог DexP била је показана код DexP-инкапсулираних свињских еритроцитних духова, указујући вероватно на бољу ефикасност инкапсулације свињских у односу на говеђе еритроцитне духове. За даљу апсолутну идентификацију и квантификовање DexP инкапсулираног у говеђе и свињске еритроцитне духове у овој докторској дисертацији развијена је и валидирана метода течне хроматографије под ултра високим притиском у спрези са MS/MS масеном спектрофотометријом (UHPLC/-HESI-MS/MS). У оквиру развоја нових система за испоруку лека, постоје два главна аналитичка аспекта које треба узети у обзир: квантификација садржаја лека у носачу и квантификација лека ослобођеног из носача [195]. То значи да поступак за разарање носача лека мора бити успостављен тако да обезбеди екстракцију укупно инкапсулираног лека. Поред тога, екстрахован лек мора бити квантификован на специфичан, тачан и поновљив начин [196]. Што се тиче квантификације ослобођеног лека из носача, развијени аналитички поступак мора детектовати ниске концентрације лека у медијуму за отпуштање лека, и

селективно га квантификовати у присуству других састојака система за испоруку лека, који се такође могу ослободити у медијум [195]. Због сложене хемијске структуре испитиваних еритроцитних духова (који се састоје од липида, протеина и угљених хидрата) као носача DexP и претходно описане појаве дефосфорилације инкапсулираног DexP до Dex услед дејства ензима присутних у еритроцитима [53,54], основни предуслов за ово истраживање био је развој аналитичког поступка за апсолутну идентификацију и квантификацију инкапсулираног лека. DexP је у узорцима идентификован на основу његових MS и MS/MS спектра, поређењем са стандардом DexP. Апсолутна квантификација DexP у узорцима извршена је у SRM експериментима, као најосетљивијем типу анализе коришћеног масеног спектрофотометра са троструким квадруполом, на основу фрагмената m/z M-H⁺ од 471,29 и m/z M-H⁺ од 97,14 (слика 42), поређењем са стандардом DexP. У студијама других аутора, DexP је такође био идентификован на основу специфичних продукт јона: [M+H-2Na]⁻ од m/z 471, [M+H-2Na-H₂O]⁻ од m/z 453, и [M+H-2Na-CH₂O]⁻ од m/z 441 [197]. Оптимизована метода омогућила је једнозначно разликовање дефосфорилисаног облика лека Dex, за које је показано у литератури да може настати конверзијом DexP при инкапсулацији у носаче који се заснивају на еритроцитима [52-54]. Присуство дефосфорилисаног облика лека, Dex није било детектовано ни у свињским ни у говеђим еритроцитним духовима, указујући на комплетну очуваност ("*recovery*") лека DexP инкапсулираног у еритроцитне духове. Овај резултат уједно је потврдио одсуство активности фосфатаза одговорних за дефосфорилацију DexP у еритроцитним духовима са инкапсулираним DexP. Аналитичка метода развијена у оквиру ове докторске дисертације, омогућила је недвосмислену идентификацију и квантификацију DexP екстрахованог из еритроцитних духова, оптимизацију инкапсулационих параметара (почетна концентрација лека, температуре инкубације, додатак глутаралдехида), као и праћење кинетике отпуштања DexP из говеђих и свињских еритроцитних духова. Испитивањем утицаја процесних параметара на ефикасност инкапсулације DexP у говеђе и свињске еритроцитне духове, показано је да инкубација на 37°C има статистички значајан ефекат на количину инкапсулираног DexP у еритроцитним

духовима ($p < 0,05$). Под истим експерименталним условима много веће вредности инкапулираног DexP добијене су у свињским него у говеђим еритроцитним духовима, што се може објаснити специфичним саставом фосфолипида у мембрани говеђих еритроцита и успостављањем аналогije са утицајем липидног састава липозома на инкапсулацију/отпуштање лека. Наиме, код сисара је фосфатидилхолин генерално најзаступљенији фосфолипид у саставу еритроцитних мембрана; међутим изражено одступање од овог "правила" постоји код говеђих еритроцитних мембрана, које су посебно дефицитарне у фосфатидилхолину, али садрже висок ниво сфингомијелина [198]. Успостављањем аналогije између еритроцитних мембрана са липозомима, за које је показано спорије отпуштање инкапулираног лека из липозома који садрже сфингомијелин у односу на липозоме без сфингомијелина [199], може се објаснити смањена пермеабилност мембране говеђих еритроцита при инкапсулацији DexP у односу на свињске еритроцитне мембране. Поред тога, инкапсулација DexP у обе врсте еритроцитних духова била је директно пропорционална порасту концентрације лека у пуферу за инкубацију, у опсегу концентрације од 0,04–0,12 mg/ml. Добијени резултати у складу су са резултатима истраживања које су објавили Millan и сар. [65], Namidi и сар. [34,200], и Foroozesh и сар. [169], при инкапсулацији различитих лекова у хумане еритроцитне духове применом хипоосмотских метода.

Схематски приказ оптимизованог процеса градуалне хипотоничне хемоллизе за инкапсулацију DexP у говеђе и свињске еритроцитне духове из кланичне крви дат је на слици 53.



Слика 53. Схематски приказ оптимизованог процеса градуалне хипотоничне хемоллизе за инкапсулацију DexP у говеђе и свињске еритроцитне духове из кланичне крви

Резултати добијени за ефикасност инкапсулације DexP у свињске еритроцитне духова (13-14%) слични су резултатима који су добијени при инкапсулацији различитих активних једињења (лекова, ензима, протеина, полисахарида, ДНК) у хумане еритроцитне духове хипоосмотским процедурама [26,64,152,201]. Ниске вредности ефикасности инкапсулације показане у случају говеђих еритроцитних духова (2-3%) нису сматране лошим резултатом. DexP је хидрофилан и током процедуре инкапсулације тежи да дифундује из спољне средине (пуфер са леком) у унутрашњу "водену" средину еритроцитних духова. Узимајући у обзир мању ефикасност инкапсулације добијене у случају говеђих еритроцитних духова, може се претпоставити да је дифузиони отпор мембране говеђих еритроцита према DexP већи у поређењу са дифузионим отпором мембране свињских еритроцита. Поред тога, добијени резултати за нижу ЕЕ DexP у говеђе духове били су компарабилни са резултатима које су објавили Kim и сар. [70] при инкапсулацији антисенс олигонуклеотида у хумане еритроцитне духове, процедуром која укључује хипотоничне и изотоничне фосфатне пуфере. Насупрот томе, Sternberg и сар. [171] показали су да је ефикасност

инкапсулације FITC-обележеног говеђег серумског албумина у хумане еритроцитне духове (без хемоглобина) скоро 97%. У наведеној студији су фосфатни пуфери такође били примењени у процедури инкапсулације FITC - обележеног говеђег серумског албумина. С обзиром на то да су Ким и сар. [70] показали да примена других пуфера у процедури инкапсулације може да побољша ефикасност инкапсулације, могуће објашњење у нашем истраживању било би то да примењени пуфер није одговарајући за говеђе еритроцитне духове. Будућа истраживања би требало да узму у обзир овај предлог. Генерално, резултати о ефикасности инкапсулације DexP у свињске и говеђе еритроцитне духове из кланичне крви добијени у овој докторској дисертацији могу се поредити са ефикасношћу инкапсулације, која је износила 4-13%, када је DexP инкапсулиран у поли(d,l-лактид-ко-гликолид) (PLGA) и поли(d,l-лактид-ко-гликолид)/полигликолид (PLGA/PLA) микросфере [131,192].

Методом ласерске дифракције одређено је да је величина еритроцитних духова без и са инкапсулираним леком била приближно иста за обе врсте узорка. Овај резултат указао је да поступак инкапсулације DexP градуалном хипотоничном хемолизом није имао значајан утицај на величину еритроцитних духова, као и расподелу величине. Изведени закључак у супротности је са претходним истраживањима чији су резултати показали да постоји ефекат повећања величине еритроцитних мембрана и промене расподеле њихове величине у случају када се примењује хипоосмотски поступак инкапсулације лекова [152,169,200]. Резултат добијен ласерском дифракцијом потврдиле су и FE-SEM и AFM микрографије. FE-SEM микрографије показале су да су минималне разлике у облику, величини као и топологији привидно инкапсулираних у поређењу са духовима са инкапсулираним DexP биле више изражене код свињских духова (слика 48 В, Г). Овакав резултат био је у складу са карактеристикама свињских еритроцита који су осетљивије природе посебно након излагања хипоосмотским условима [162].

Поред тога, FE-SEM и AFM дале су сагласне резултате по питању површинске хрпавости говеђих и свињских еритроцита са инкапсулираним DexP. Инкапсулација DexP у говеђе духове довела је само до благог пада RMS

вредности у односу на површинску храпавост контролних говеђих еритроцитних духова, са $17,2 \pm 1,5$ nm на $15,9 \pm 2,8$ nm ($p > 0,05$). У случају свињских еритроцитних духова, RMS вредности за површинску храпавост износиле су $30,0 \pm 5,4$ nm и $34,2 \pm 7,5$ nm за контролне и DexP инкапсулиране свињске еритроцитне дужаве, респективно ($p > 0,05$). Резултат добијен AFM анализом показао је да додавање лека DexP у процедуру градуалне хемоллизе нема приметни додатни ефекат на морфологију еритроцитних духова. Ипак, AFM анализа потврдила је постојање значајне разлике у морфологији између говеђих и свињских еритроцитних духова (и контролних и са инкапсулираним леком, $p < 0,05$), а то може веома утицати на карактеристике тј. понашање ове две испитиване врсте еритроцитних духова као носача DexP.

Кинетика отпуштања инкапсулираног DexP значајно се разликовала како између врста испитиваних узорка еритроцитних духова, тако и између узорка исте врсте у зависности од садржаја резидуалног хемоглобина. Говеђи еритроцитни дугови за разлику од свињских еритроцитних духова показали су мултифазну кинетику отпуштања инкапсулираног DexP. Код обе врсте еритроцитних духова, постојање *lag*-фазе показује да су у процес ослобађања лека из духова, поред дифузије укључене и неке структурне промене ћелијске мембране.

Добро је познато да кинетика отпуштања лека из еритроцита као носача зависи од величине и поларности инкапсулираних супстанци [26]. Углавном, могу се посматрати три различита начина отпуштања лека: 1) отпуштање лека се обавља брзом дифузијом кроз мембрану код липофилног лека попут примакина [46] или метотрексата [202]; 2) отпуштање лека се обавља ћелијском лизом код лекова попут еналаприлата [152], гентамицина [63] и трамадола [169]; 3) профил отпуштања лека представља комбинацију прва два, као што је показано за изониазид [203] и еритропоетин [204]. Кинетика ослобађања DexP из еритроцитних духова, показала је да је већи DexP ефлукс добијен у случају оба типа узорка са већим садржајем хемоглобина (током истог експерименталног времена) у односу на узорке са нижим садржајем резидуалног хемоглобина. Такође се може уочити да је ефекат резидуалног хемоглобина био израженији у случају говеђих

еритроцитних духова у односу на свињске еритроцитне духове. Ова чињеница иде у прилог теорији да је ослобађање лека поспешено отпуштањем хемоглобина из еритроцитних носача [152,169]. Како је биохемијским анализама показана очувана, односно слична структура говеђих и свињских еритроцитних духова и полазних еритроцита, самим тим и сличне транспортне карактеристике кроз духове као и еритроците, показане разлике у профилима отпуштања DexP из говеђих и свињских духова могу се објаснити постојањем различитих ефлуксних транспортера (који посредују активни ефлукс лека из мембране) у еритроцитним мембранама ове две врсте, како су неки аутори већ предложили [200,205].

Додавање воденог раствора глутаралдехида (0,01% (v/v)) у хипертоничној фази процедуре инкапсулације у овом истраживању није показало значајан утицај на побољшање параметара инкапсулације DexP ($p > 0,05$). Међутим, имајући у виду познато дејство глутаралдехида да стабилише, учвршћава и умрежава мембрану еритроцитних духова, поступак његовог додавања је задржан у процедури инкапсулације, као фактор који контролише отпуштање лека, како је већ показано у неколико рањих истраживања [169,206,207].

У овој студији остварено је продужено отпуштање DexP из говеђих (током 5 дана) и свињских еритроцита духова (током 3 дана). Будућа истраживања требало би да се фокусирају на нове ефективне методе за контролисано отпуштање лека из еритроцитних духова, као што је облагање еритроцитних духова слојевима различитих полимера [26]. Запажени феномен опадајућег тренда ослобођеног DexP након 3 дана у случају свињских и 5 дана у случају говеђих еритроцитних духова, последица је највероватније нестабилности лека проузроковане интеракцијом са неком од градивних компонената сложене структуре еритроцитних духова у експерименталним условима који су коришћени у тесту ослобађања лека (нпр. солубилизација лека од стране масних киселина и сл.). Могућност смањења количине DexP у медијуму услед његове дефосфорилације и превођења у Dex је искључена након додатне UHPLC/-HESI-MS/MS анализе узорка добијених у тесту *in vitro* праћења ослобађања лека. Оваква појава смањења количине лека је већ описана у литератури за случај трамадола

инкапсулираног у хумане еритроците, где је опадајући тренд ослобађања лека запажен након 5 дана [169]. Разматрајући друге типове система за продужено ослобађање DexP, поменуте флукуације у ослобађању DexP описане су и у случају дуго циркулишућих липозома са инкапсулираним DexP [125].

На основу приказаних морфолошких и структурних карактеристика, и карактеристика отпуштања DexP из говеђих и свињских еритроцитних духова изолованих из кланичне крви, може се претпоставити да овакви еритроцитни духови показују велики потенцијал за биомедицинску примену у циљу продужене и контролисане доставе антиинфламаторног лека DexP - од примене у културама ћелија, са циљем стимулације раста и усмеравања диференцијације, до примене у терапијске сврхе широко распрострањених аутоимуних инфламаторних болести. Истовремено, добијени резултати указују на потребу даљих истраживања која би за циљ имала побољшан дизајн еритроцитних духова. Овај приступ подразумева пре свега облагање духова слојевима различитих полимера ради постизања ефикасније инкапсулације и боље контролисаног отпуштања лека као и маскирања антигених детерминанти са циљем добијања носача који би био погодан за примену код већег броја врста сисара. Такође, отвара се као неопходан правац испитивања ефикасности DexP инкапсулираних духова као система за продужену испоруку лекова у *in vivo* условима са крајњим циљем њихове клиничке примене.

ЗАКЉУЧЦИ

VII

У овој докторској дисертацији испитана је могућност коришћења говеђих и свињских еритроцитних мембрана („духова“) пореклом из отпадне кланичне крви, као полазне основе за производњу система за продужено/контролисано ослобађање активне супстанце дексаметазон-натријум-фосфата (DexP). Након дефинисања хематолошких и осмотских карактеристика говеђих и свињских еритроцита, оптимизован је процес градуалне хипотоничне хемоллизе за изоловање еритроцитних мембрана. Добијене еритроцитне мембране окарактерисане су у морфолошком и биохемијском смислу (применом метода SEM; проточне цитометрије, ласерске дифракције, FRAP, TBARS...). Процесом градуалне хемоллизе је затим инкапсулиран DexP у говеђе и свињске еритроцитне мембране, где је методом UHPLC/-HESI-MS/MS испитан утицај процесних параметара на ефикасност инкапсулације и праћена кинетика отпуштања инкапсулираног DexP. Детаљно су испитане морфолошке особине добијеног система на бази еритроцитних мембрана за продужено отпуштање DexP. На основу приказаних резултата могу се извести следећи закључци:

- Говеђи и свињски еритроцити изоловани из отпадне кланичне крви по својим основним хематолошким параметрима нису значајно одступали од референтних вредности за здраве животиње и нису показали значајан степен механички индуковане хемоллизе ($p < 0,05$). Овај резултат потврђује да еритроцити изоловани из отпадне кланичне крви могу бити полазни материјал за добијање еритроцитних духова.
- Тест осмотске фрагилности, микрохематокритска метода и проточна цитометрија дале су сагласне резултате по питању осмотске фрагилности испитиваних еритроцита, и показале да су свињски еритроцити осмотски фрагилнији од говеђих. У обе врсте испитиваних еритроцита детектоване су најмање две фракције које се разликују по осетљивости на осмотску лизу. Методом проточне цитометрије потврђено је да се ове фракције разликују и у величини и степену бубрења.

- Као оптимални пуфер за извођење хемоллизе говеђих и свињских еритроцита, у циљу добијања еритроцитних мембрана, одређен је 35 mM натријум-фосфатни/NaCl пуфер. Његовом применом при протоку пуфера од 300 ml/h, током 30 min ослобађа се >90% хемоглобина из велике запремине (100 ml) обе врсте еритроцита.
- Морфолошке (величина и површинска морфологија) и биохемијске карактеристике (протеински и липидни састав мембране) говеђих и свињских еритроцитних духова изолованих градуалном хемоллизом, указују да као такве, биохемијски и структурно одговарају ћелијским мембранама *in vivo*.
- Развијена метода течне хроматографије под ултрависоким притиском у спрези са MS/MS масеном спектрофотометријом (UHPLC/-HESI-MS/MS) омогућила је апсолутну идентификацију и квантификацију инкапсулираног DexP у говеђе и свињске еритроцитне духове.
- Од испитиваних параметара као најоптималнији за инкапсулацију DexP, у обе врсте еритроцитних духова, одређени су концентрација лека од 0,12 mg/ml и температура инкубације од 37°C. Додавање воденог раствора глутаралдехида (0,01% (v/v)) у хипертоничној фази процедуре инкапсулације у овом истраживању није показало значајан утицај на побољшање параметара инкапсулације DexP ($p > 0,05$).
- Коришћењем свињских еритроцитних духова, постигнут је већи степен инкапсулације DexP (13-14%) у поређењу са говеђим еритроцитним духовима (2-3%). Концентрација инкапсулираног DexP у свињским еритроцитним духовима, одговара минималним концентрацијама DexP које се препоручују за терапијске, профилактичке сврхе, и примену као модулятора раста у културама ћелија.
- Детаљна морфолошка анализа (AFM, FE-SEM, ласерска дифракција) оба типа еритроцитних духова са инкапсулираним DexP, показала је да присуство инкапсулираног DexP нема утицаја на морфологију еритроцитних духова, али да постоје значајне разлике у морфологији

између говеђих и свињских еритроцитних духова, на основу чега се може очекивати различито понашање ове две испитиване врсте еритроцитних духова као носача DexP.

- Кинетика отпуштања инкапсулираног DexP, разликовала се како између врста еритроцитних духова, тако и између узорака исте врсте у зависности од садржаја резидуалног хемоглобина. Постигнуто је продужено отпуштање DexP у периоду од три, односно пет дана у случају DexP инкапсулираних свињских и говеђих еритроцитних духова, респективно.

На основу добијених морфолошких и структурних карактеристика и карактеристика отпуштања DexP из говеђих и свињских еритроцитних духова изолованих из кланичне крви, може се закључити да они показују велики потенцијал за биомедицинску примену у циљу продужене и контролисане доставе антиинфламаторног лека DexP.

ЛИТЕРАТУРА

VIII

-
- [1] Pierigè F, Serafini S, Rossi L, Magnani M. Cell-based drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:286-295
- [2] Hamidi M, Tajerzadeh H. Carrier erythrocytes: an overview. *Drug Deliv* 2003;10:9-20
- [3] Muzykantov VR. Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by mother nature. *Expert Opin Drug Deliv* 2010;7:403-427
- [4] Mansouri S, Merhi Y, Winnik FM, Tabrizian M. Investigation of layer-by-layer assembly of polyelectrolytes on fully functional human red blood cells in suspension for attenuated immune response. *Biomacromolecules* 2011;12:585-592
- [5] Toldra F, Aristoy M, Mora L, Reig M. Innovations in value addition of edible meat by-products. *Meat Sci* 2012;92:290-296
- [6] Wang Q, Cheng H, Peng H, Zhou H, Li PY, Langer R. Non-genetic engineering of cells for drug delivery and cell-based therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.12.003>
- [7] Riedmann EM, Kyd JM, Cripps AW, Lubitz W, Bacterial ghosts as adjuvant particles, *Expert Rev Vaccines* 2007;6:241-253
- [8] Dou H, Destache CJ, Morehead JR, Mosley RL, Boska MD, Kingsley J, Gorantla S, Poluektova R, Nelson JA, Chaubal M, Werling J, Kipp J, Rabinow BE, Gendelman HE. Development of a macrophage-based nanoparticle platform for antiretroviral drug delivery. *Blood* 2006;108:2827-2835
- [9] Porada CD, Almeida-Porada G. Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:1156-1166
- [10] Millán CG, Marinero ML, Castañeda AZ, Lanao JM. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. *J Control Release*, 2004;95:27-49
- [11] Rossi L, Serafini S, Antonelli A, et al. Macrophage depletion induced by clodronate-loaded erythrocytes. *J Drug Target* 2005;13:99-111
- [12] <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/rbcmembrane.html>
- [13] Luna EJ, Hitt AL. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science* 1991;258:955-996

- [14] Hinderling PH. Red Blood Cells: A Neglected Compartment in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, *Pharmacol Rev* 1997;49:279-295
- [15] Ihler GM, Glew RH, Schnure FW. Enzyme loading of erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70:2663-2666
- [16] Yousefpour P, Chilkoti A. Co-opting biology to deliver drugs. *Biotechnol Bioeng* 2014;111:1699-1716
- [17] Hamidi M, Rafiei P, Azadi A, Mohammadi-Samani S. Encapsulation of valproate-loaded hydrogel nanoparticles in intact human erythrocytes: a novel nano-cell composite for drug delivery. *J Pharm Sci.* 2011;100:1702-1711
- [18] Yoo JW, Irvine DJ, Discher DE, Mitragotri S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:521-535
- [19] 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;21:891-896
- [20] 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;118:1442-1449
- [21] 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
- [22] Chambers E, Mitragotri S. Prolonged circulation of large polymeric nanoparticles by non-covalent adsorption on erythrocytes. *J Control Release* 2004;100:111-119
- [23] Zaitsev S, Danielyan K, Murciano JC, Ganguly K, Krasik T, Taylor RP, Pincus S, Jones S, Cines DB, Muzykantov VR. Human complement receptor type 1-directed loading of tissue plasminogen activator on circulating erythrocytes for prophylactic fibrinolysis. *Blood* 2006;108:1895-1902
- [24] Kontos S, Hubbell JA. Improving protein pharmacokinetics by engineering erythrocyte affinity. *Mol Pharm* 2010;7:2141-2147
- [25] Georgieva R, Moya S, Donath E, Bäuml H. Permeability and conductivity of red blood cell templated polyelectrolyte capsules coated with supplementary layers. *Langmuir* 2004;20:1895-1900

- [26] Shailender M, Luo R, Venkatraman SS, Neu B. Layer-by-layer microcapsules templated on erythrocyte ghost carriers. *Int J Pharm* 2011;415:211-217
- [27] Cuppoletti J, Mayhew E, Zobel CR, Jung CY. Erythroosomes: large proteoliposomes derived from crosslinked human erythrocyte cytoskeletons and exogenous lipid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 78:2786-2790
- [28] Lejeune A, Moorjani M, Gicquaud C, Lacroix J, Poyet P, Gaudreault R. Nanoerythroosome, a new derivative of erythrocyte ghost: preparation and antineoplastic potential as drug carrier for daunorubicin. *Anticancer Res* 1994;14:915-919
- [29] Moorjani M, Lejeune A, Gicquaud C, Lacroix J, Poyet P, Gaudreault RC. Nanoerythroosomes, a new derivative of erythrocyte ghost II: identification of the mechanism of action. *Anticancer Res* 1996;16:2831-2836
- [30] Hu C-MJ, Zhang L, Aryal S, Cheung C, Fang RH, Zhang L. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:10980-10985
- [31] Gardos G. Akkumulation de kaliumonen durchmenschlicheBlutkorperchen. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 1953;6:191-196
- [32] Marsden NVB, Ostling SG. Accumulation of dextran inhuman red blood cells after hemolysis. *Nature* 1959;184:723-724
- [33] Zimmermann U. Jahresbericht der kernforschungsanlage Julich GmbH, Nuclear Research Center Julich1973;55-58
- [34] Hamidi M, Zarrin A, Foroozchs M, Mohammadi-Samani S. Applications of carrier erythrocytes in delivery of biopharmaceuticals. *J Control Release* 2007;118:145-160
- [35] Jordan 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;27:133-137
- [36] Magnani M, Rossi L, D'Ascenzo M, Panzani I, Bigi L, Zanella A. Erythrocyte engineering for drug delivery and targeting. *Biotechnol Appl Biochem* 1998;28:1-6

- [37] DeLoach JR, Harris RL, Ihler GM. An erythrocyte encapsulator dialyzer used in preparing large quantities of erythrocyte ghosts and encapsulation of a pesticide in erythrocyte ghosts. *Anal Biochem* 1980;102:220-227
- [38] Stojanović R, Ilić V, Manojlović V, Bugarski D, Dević M, Bugarski B. Isolation of hemoglobin from bovine erythrocytes by controlled hemolysis in the membrane bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol* 2012;166:1491-1506
- [39] Danon D. Osmotic hemolysis by a gradual decrease in the ionic strength of the surrounding medium. *J Cell Comp Physiol* 1961;57:111-117
- [40] Bugarski B, Dovezenski N. Hemofarm Konzern. Verfahren zur Herstellung von Hemoglobin, Deutsches Patentamt DE 19707508, 2000
- [41] DeLoach JR, Ihler GM. A dialysis procedure for loading of erythrocytes with enzymes and lipids. *Biochim Biophys Acta* 1977;496:136-145
- [42] Updike SJ, Wakamiya RT. Infusion of red blood cell-loaded asparaginase in monkey. *J Lab Clin Med* 1983;101:679-691
- [43] Bhaskaran S, Dhir SS. Resealed erythrocytes as carriers of salbutamol sulphate. *Indian J Pharm Sci* 1995;57:240-242
- [44] Jain S, Jain NK. Engineered erythrocytes as a drug delivery system. *Indian J Pharm Sci* 1997;59:275-281
- [45] Bird J, Best R, Lewis DA. The encapsulation of insulin in erythrocytes. *J Pharm Pharmacol* 1983;35:246-247
- [46] Talwar N, Jain NK. Erythrocyte based delivery system of primaquine: in vitro characterization. *J Microencapsul* 1992;9:357-364
- [47] Tajerzadeh H, Hamidi M. Evaluation of hypotonic preswelling method for encapsulation of enalaprilat in intact human erythrocytes. *Drug Dev Ind Pharm* 2000;26:1247-1257
- [48] Patel PD, Dand N, Hirlekar RS, Kadam VJ. Drug loaded erythrocytes: as novel drug delivery system. *Curr Pharm Design* 2008;14:63-70
- [49] Kravtsoff R, Ropars C, Laguerre M, Muh JP, Chassaigne M. Erythrocytes as carriers for L- asparaginase. Methodological and mouse in-vivo studies. *J Pharm Pharmacol* 1990;42:473-476
- [50] Garín MI, Lopez RM, Luque J. Pharmacokinetic properties and in-vivo biological activity of recombinant human erythropoietin encapsulated in red blood cells. *Cytokine* 1997;9:66-71

- [51] 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;47:819-827
- [52] Biagiotti S, Paoletti MF, Fraternali A, Rossi L, Magnani M. Drug delivery by red blood cells. *IUBMB Life* 2011;63:621-631
- [53] 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;33:85-89
- [54] 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;33:57-63
- [55] Annese V, Latiano A, Rossi L, Lombardi G, Dallapiccola B, Serafini S, Damonte G, Andriulli A, Magnani M. Erythrocytes-mediated delivery of dexamethasone in steroid-dependent IBD patients-a pilot uncontrolled study. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1370-1375
- [56] Bossa F, Latiano A, Rossi L, Magnani M, Palmieri O, Dallapiccola B, Serafini S, Damonte G, De Santo E, Andriulli A, Annese V. Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone in patients with mild-to-moderate ulcerative colitis, refractory to mesalamine: a randomized, controlled study. *Am J Gastroenterol* 2008;103:2509-2516
- [57] Castro M, Knafelz D, Rossi L, Ambrosini MI, Papadatou B, Mambrini G, Magnani M. Periodic treatment with autologous erythrocytes loaded with dexamethasone 21-phosphate for fistulizing pediatric Crohn's disease: case report. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:313-315
- [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 Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44:423-426
- [59] <http://www.erydel.com/>

- [60] Kitao T, Hattori K, Takeshita M. Agglutination of leukemic cells and daunomycin entrapped erythrocytes with lectin in vitro and in vivo. *Experimentia* 1978;341:94-95
- [61] Alvarez FJ, Herraез A, Murciano JC, Jordan JA, Diez JC, Tejedor MC. In vivo survival and organ uptake of loaded carrier rat erythrocytes. *J Biochem (Tokyo)* 1996;120:286-291
- [62] Boucher L, Chassaigne M, Ropars C. Internalization and distribution of inositol hexakisphosphate in red blood cells. *Biotechnol Appl Biochem* 1996;24:73-78.
- [63] 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;186:407-412
- [64] Millán CG, Castañeda AZ, López FG, Marinero ML, Lanao JM, Arévalo M. Encapsulation and in vitro evaluation of amikacin-loaded erythrocytes. *Drug Deliv* 2005;12:409-416
- [65] Millán GC, Bax BE, Castaneda AZ, Marinero ML, Lanao JM. In vitro studies of amikacin- loaded human carrier erythrocytes. *Transl Res* 2008;152:59-66
- [66] Al-Achi A, Greenwood R. Erythrocytes as oral delivery systems for human insulin. *Drug Dev Ind Pharm* 1998;24:67-72
- [67] Fraternalе A, Rossi L, Magnani M. Encapsulation, metabolism and release of 2-fluoro-ara-AMP from human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1996;1291:149-154
- [68] Flynn G, McHale L, McHale AP. Methotrexate-loaded, photosensitized erythrocytes: a photo- activatable carrier/delivery system for use in cancer therapy. *Cancer Lett* 1994;82:225-229
- [69] Johnson KM, Tao JZ, Kennan RP, Gore JC. Gadolinium-bearing red cells as blood pool MRI contrast agents. *Magn Reson Med* 1998;40:133-142
- [70] Kim SH, Kim EJ, Hou JH, Kim JM, Choi HG, Shim CK, Oh YK. Opsonized erythrocyte ghosts for liver-targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotides. *Biomaterials* 2009;30:959-967
- [71] 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;11:492-496

- [72] 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;8:2270-2278
- [73] 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;14:60-68
- [74] Ihler G, Lantzy A, Purpura J, Glew RH. Enzymatic degradation of uric acid by uricase-loaded human erythrocytes. *J Clin Invest* 1975;56:595-602
- [75] Petrikovics I, Pei L, McGuinn WD, Cannon EP, Way JL. Encapsulation of rhodanese and organic thiosulfonates by mouse erythrocytes. *Fundam Appl Toxicol* 1994;23:70-75
- [76] Pei L, Petrikovics I, Way JL. Antagonism of the lethal effects of paraoxon by carrier erythrocytes containing phosphotriesterase. *Fundam Appl Toxicol* 1995;28:209-214
- [77] Magnani M, Fazi A, Mangani F, Rossi L, Mancini U. Methanol detoxification by enzyme-loaded erythrocytes. *Biotechnol Appl Biochem* 1993;18:217-226
- [78] 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;1425:328-336
- [79] Kravtsoff R, Desbois I, Lamagnere JP, Muh JP, Valat C, Chassaigne M, Colombat P, Ropars C. Improved pharmacodynamics of L-asparaginase-loaded in human red blood cells. *Eur J Clin Pharmacol* 1996;49:465-470
- [80] Hamarat BS, Uslan AH. Encapsulation of PEG-urease/PEG-AlaDH enzyme system in erythrocyte. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2001;29:405-412
- [81] Kosenko EA, Venediktova NI, Kudryavtsev AA, Ataullakhanov FI, Kaminsky YG, Felipo V, Montoliu C. Encapsulation of glutamine synthetase in mouse erythrocytes: a new procedure for ammonia detoxification. *Biochem Cell Biol* 2008;86:469-476
- [82] Alvarez FJ, Jordan JA, Calleja P, Lotero LA, Olmos G, Díez JC, Tejedor MC. Cross-linking treatment of loaded erythrocytes increases delivery of encapsulated substance to macrophages. *Biotechnol Appl Biochem* 1998;27:139-143

- [83] Alvarez FJ, Jordan JA, Herraез A, Diez JC, Tejedor MC. Hypotonically loaded rat erythrocytes deliver encapsulated substances into peritoneal macrophages. *J Biochem* 1998;123:233-239
- [84] Gaudreault RC, Bellemare B, Lacroix J. Erythrocyte membrane-bound daunorubicin as a delivery system in anticancer treatment. *Anticancer Res* 1989;9:1201-1205
- [85] Magnani M, Casabianca A, Fraternalе 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 USA* 1996;93:4403-4408
- [86] Humphreys JD, Ihler G. Enhanced stability of erythrocyte-entrapped glucocerebrosidase activity. *J Lab Clin Med* 1980;96:682-692
- [87] Thorpe SR, Fiddler MB, Desnick RJ. Enzyme therapy. V. In vivo fate of erythrocyte-entrapped beta-glucuronidase in beta-glucuronidase-deficient mice. *Pediatr Res* 1975;9:918-923
- [88] 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 USA* 1977;74:4620-4623
- [89] Moran NF, Bain MD, Muqit MM, Bax BE. Carrier erythrocyte entrapped thymidine phosphorylase therapy for MNGIE. *Neurology* 2008;71:686-688
- [90] Fraternalе 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;56:263-272
- [91] 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;26:953-957
- [92] Fraternalе 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;17:278-285

- [93] Lisovskaya IL, Shcherbachenko IM, Volkova RI, Ataulakhanov FI. Clotrimazole enhances lysis of human erythrocytes induced by t-BHP. *Chem Biol Interact* 2009;180:433-439
- [94] Magnani M, Chiarantini L, Vittoria E, Mancini U, Rossi L, Fazi A. Red blood cells as an antigen-delivery system. *Biotechnol Appl Biochem* 1992;16:188-194
- [95] Murray AM, Pearson IF, Fairbanks LD, Chalmers RA, Bain MD, Bax BE. The mouse immune response to carrier erythrocyte entrapped antigens. *Vaccine* 2006;24:6129-6139
- [96] Olmos G, Lotero LA, Tejedor MC, Diez JC. Delivery to macrophages of interleukin 3 loaded in mouse erythrocytes. *Biosci Rep* 2000;20:399-410
- [97] Chestier N, Kravtsoff R, Canepa S, Chassaing M, Ropars C. Erythrocytes as carriers of ricin A chain: effects on the erythrophagocytic cells. *Adv Exp Med Biol* 1992;326:279-289
- [98] Rossi L, Migliavacca B, Pierigé F, Serafini S, Sanvito F, Olivieri S, Nano R, Antonioli B, Magnani M, Bertuzzi F. Prolonged islet allograft survival in diabetic mice upon macrophage depletion by clodronate-loaded erythrocytes. *Transplantation* 2008;85:648-650
- [99] 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;2:311-322
- [100] Magnani 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;9:749-751
- [101] Bossa F, Annese V, Valvano MR, Latiano A, Martino G, Rossi L, Magnani M, Palmieri O, Serafini S, Damonte G, De Santo E, Andriulli A. Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone 21-phosphate in steroid-dependent ulcerative colitis: a randomized, double-blind Sham-controlled study. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:1872-1879
- [102] Kažić T, *Gotovi lekovi –XIV izdanje*, Integra, 2013
- [103] 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;56:153-157

- [104] Ataulakhanov FI, Kulikova EV, Vitvitsky VM. Reversible binding of anthracycline antibiotics to erythrocytes treated with glutaraldehyde. *Biotechnol Appl Biochem* 1996;24:241-244
- [105] Tonetti M, Astroff AB, Satterfield W, De Flora A, Benatti U, DeLoach JR. Pharmacokinetic properties of doxorubicin encapsulated in glutaraldehyde-treated canine erythrocytes. *Am J Vet Res* 1991;52:1630-1635
- [106] Tonetti M, Zocchi E, Guida L, Polvani C, Benatti U, Biassoni P, Romei F, Guglielmi A, Aschele C, Sobrero A, et al. Use of glutaraldehyde treated autologous human erythrocytes for hepatic targeting of doxorubicin. *Adv Exp Med Biol* 1992;326:307-317
- [107] Matherne CM, Satterfield WC, Gasparini A, Tonetti M, Astroff AB, Schmidt RD, Rowe LD, DeLoach JR. Clinical efficacy and toxicity of doxorubicin encapsulated in glutaraldehyde-treated erythrocytes administered to dogs with lymphosarcoma. *Am J Vet Res* 1994;55:847-853
- [108] Skorokhod OA, Garmaeva T, Vitvitsky VM, Isaev VG, Parovichnikova EN, Savchenko VG, Ataulakhanov FI. Pharmacokinetics of erythrocyte-bound daunorubicin in patients with acute leukemia. *Med Sci Monit* 2004;10:PI55-PI64
- [109] Skorokhod O, Kulikova EV, Galkina NM, Medvedev PV, Zybunova EE, Vitvitsky VM, Pivnik AV, Ataulakhanov FI. Doxorubicin pharmacokinetics in lymphoma patients treated with doxorubicin-loaded erythrocytes. *Haematologica* 2007;92:570-571
- [110] 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;148:177-180
- [111] de Oliveira R. Humane slaughter of bovine, First Virtual Global Conference on Organic Beef Cattle Production, September 02 to October 15, 2002, Via Internet, <http://www.cpap.embrapa.br/agencia/congressovirtual/pdf/ingles/02en03.pdf>.
- [112] Hu J, Xu M, Hang B, Wang L, Wang Q, Chen J, Song T, Fu D, Wang Z, Wang S, Liu X. Isolation and characterization of an antimicrobial peptide from bovine hemoglobin α -subunit. *World J Microbiol Biotechnol* 2010;27:767-771

- [113] Wei J, Chiang B. Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor. *J Food Sci Agric* 2009;89:372-378
- [114] Ofori JA, Hsieh Y-HP. Blood-derived products for human consumption. *Revelation and Science* 2011;1:14-21
- [115] Cofrades S, Guerra NI, Carballo A, Fernández-Martin JF, Jiménez-Colmenero F. Plasma protein and soy fiber content effect on bologna sausage properties as influenced by fat levels. *J Food Sci* 2000;65:281-287
- [116] Viana FR, Silva VDM, Delvivo FM, Bizzotto CS, Silvestre MPC, Quality of ham pâté containing bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat Sci* 2005;70:153-160
- [117] Nissenson AR, Berns JS, Sakiewicz P, Ghaddar S, Moore GM, Schleicher RB, Seligman PA. Clinical evaluation of heme iron polypeptide: Sustaining a response to rHuEPO in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2003;42:325-330
- [118] Koehler KC, Alge DL, Anseth KS, Bowman CN. A Diels–Alder modulated approach to control and sustain the release of dexamethasone and induce osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2013;34:4150-4158
- [119] Chennamaneni SR, Mamalis C, Archer B, Oakey Z, Ambati BK. Development of a novel bioerodible dexamethasone implant for uveitis and postoperative cataract inflammation. *J Control Release* 2013;167:53-59
- [120] Fratoddi I, Venditti I, Cametti C, Palocci C, Chronopoulou MM, Acconcia F, et al. Functional polymeric nanoparticles for dexamethasone loading and release. *Colloids Surf B* 2012;93:59-66
- [121] Gómez-Gaete C, Tsapis N, Besnard M, Bochot A, Fattal E. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 2007;331:153-159
- [122] Hurson CJ, Butler JS, Keating DT, Murray DW, Sadler DM, O'Byrne JM, Doran PP. Gene expression analysis in human osteoblasts exposed to dexamethasone identifies altered developmental pathways as putative drivers of osteoporosis. *BMC Musculoskelet Disord* 2007;8:12

- [123] Goodwin JE, Zhang J, Gonzalez D, Albinsson S, Geller DS. Knockout of the vascular endothelial glucocorticoid receptor abrogates dexamethasone-induced hypertension. *J Hypertens* 2011;29:1347-1356
- [124] Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *New Engl J Med* 2005;353:1711-1723
- [125] Quan L, Zhang Y, Crielaard BJ, Dusad A, Lele SM, Rijcken CJ, Metselaar JM, Kostková H, Etrych T, Ulbrich K, Kiessling F, Mikuls TR, Hennink WE, Storm G, Lammers T, Wang D. Nanomedicines for inflammatory arthritis: head-to-head comparison of glucocorticoid-containing polymers, micelles, and liposomes. *ACS Nano* 2014;8:458-466
- [126] Chen XY, Wang SM, Li N, Hu Y, Zhang Y, Xu JF, Li X, Ren J, Su B, Yuan WZ, Teng XR, Zhang RX, Jiang DH, Mulet X, Li HP. Creation of lung-targeted dexamethasone immunoliposome and its therapeutic effect on bleomycin-induced lung injury in rats. *PLoS One* 2013;8:e58275
- [127] Duarte ARC, Mano JF, Reis RL. Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology. *Eur Polym J* 2009;45:141-148
- [128] Rodrigues LB, Leite HF, Yoshida MI, Saliba JB, Cunha Junior AS, Faraco AAG. In vitro release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier. *Int J Pharm* 2009;368:1-6
- [129] Dias M, Cortez R, Barsan MM, Santos JB, Brett CM, De Sousa HC. Development of greener multi-responsive chitosan biomaterials doped with biocompatible ammonium ionic liquids. *ACS Sustain Chem Eng* 2013;1:1480-1492
- [130] Turkoglu OF, Eroglu H, Okutan O, Burul E, Sargon MF, Ozer N, Oner L, Beskonakli E. The efficiency of dexamethasone sodium phosphate-encapsulated chitosan microspheres after cold injury. *Surg Neurol* 2005;64:11-16
- [131] Jaraswekin S, Prakongpan S, Bodmeier R. Effect of poly(lactide-co-glycolide) molecular weight on the release of dexamethasone sodium phosphate from microparticles. *J Microencapsul* 2007;24:117-128
- [132] Kim DH, Martin DC. Sustained release of dexamethasone from hydrophilic matrices using PLGA nanoparticles for neural drug delivery. *Biomaterials* 2006;27:3031-3037

- [133] Patil SD, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. Concurrent delivery of dexamethasone and VEGF for localized inflammation control and angiogenesis. *J Control Release* 2007;117:68-79
- [134] Park JS, Na K, Woo DG, Yang HN, Park KH. Determination of dual delivery for stem cell differentiation using dexamethasone and TGF- β 3 in/on polymeric microspheres. *Biomaterials* 2009;30:4796-805
- [135] Liang CZ, Li H, Tao YQ, Zhou XP, Yang ZR, Xiao YX, Li FC, Han B, Chen QX. Dual delivery for stem cell differentiation using dexamethasone and bFGF in/on polymeric microspheres as a cell carrier for nucleus pulposus regeneration. *J Mater Sci Mater Med* 2012;23:1097-1107
- [136] Gómez-Gaete C, Fattal E, Silva L, Besnard M, Tsapis N. Dexamethasone acetate encapsulation into Trojan particles. *J Control Release* 2008;128:41-49
- [137] Chang-Lin JE, Attar M, Acheampong AA, Robinson MR, Whitcup SM, Kuppermann BD, Welty D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a sustained-release dexamethasone intravitreal implant. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:80-86
- [138] Larson N, Ghandehari H. Polymeric conjugates for drug delivery. *Chem Mater* 2012;24:840-853
- [139] Liu XM, Quan LD, Tian J, Laquer FC, Ciborowski P, Wang D. Synthesis of click PEG-dexamethasone conjugates for the treatment of rheumatoid arthritis. *Biomacromolecules* 2010;11:2621-2628
- [140] Beck RCR, Pohlmann AR, Hoffmeister C, Gallas MR, Collnot E, Schaefer UF, Guterres SS, Lehr CM. Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: correlation between in vitro drug release and drug transport across Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Biopharm* 2007;67:18-30
- [141] Gaharwar AK, Mihaila SM, Kulkarni AA, Patel A, Di Luca A, Reis RL, Gomes ME, van Blitterswijk C, Moroni L, Khademhosseini A. Amphiphilic beads as depots for sustained drug release integrated into fibrillar scaffolds. *J Control Release* 2014;187:66-73
- [142] Đuričić I. *Fiziološki praktikum, VII izdanje, Naučna knjiga, Beograd, 45-48*
- [143] van Assendelft OW, Holtz AH, Lewis SM. Recommended method for the determination of the hemoglobin content of blood. I.C.S.H. Publications World Health Organization, 1984, 1.4.1.

- [144] Sabine JC, Nickolai DJ. A microhematocrit method and its use with citrated blood. *Blood* 1952;7:1128-1131
- [145] Wintrobe MM, Principles of hematologic examination, in: MM Wintrobe (Ed.), *Clinical Hematology* 8th ed. Lea & Febiger: Philadelphia, 1981, pp.7-19
- [146] Beutler E, in Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA (Eds.), *Hematology*, McGraw-Hill Book Co: New York, 1983, pp. 1626-1627.
- [147] Vitvitsky VM, Frolova EV, Martinov MV, Komarova SV, Ataulakhanov FI. Anion permeability and erythrocyte swelling. *Bioelectrochemistry* 2000;52:169-177
- [148] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 1970;227:680-685
- [149] Ferraz TP, Fiúza MC, Dos Santos ML, Pontes De Carvalho L, Soares NM. Comparison of six methods for the extraction of lipids from serum in terms of effectiveness and protein preservation. *J Biochem Biophys Methods* 2004;58:187-193
- [150] Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999;299:15-27
- [151] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358
- [152] Hamidi M, Tajerzadeh H, Dehpour AR, Rouini MR, Ejtemaee-Mehr S. In vitro characterization of human intact erythrocytes loaded by enalaprilat. *Drug Deliv* 2001;8:223-230
- [153] Earley B, Murray M. The effect of road and sea transport on inflammatory, adrenocortical, metabolic and behavioural responses of weanling heifers. *BMC Vet Res* 2010;6:36. doi: 10.1186/1746-6148-6-36
- [154] Elbers AR, Visser IJ, Odink J, Smeets JF. Changes in haematological and clinicochemical profiles in blood of apparently healthy slaughter pigs, collected at the farm and at slaughter, in relation to the severity of pathological-anatomical lesions. *Vet Q* 1991;13:1-9
- [155] Jain NC. *Essentials of Veterinary Hematology*, 1993, Lea & Febiger Philadelphia

- [156] Seeman P. Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis and stable holes in the membrane after lysis by saponin and lysolecithin. *J Cell Biol* 1967;32:55-70
- [157] Pajic-Lijakovic I. Erythrocytes under osmotic stress - modeling considerations. *Prog Biophys Mol Biol* 2015;117:113-124
- [158] Gutowski KA, Hudson JL, Aminoff DC. Flow cytometric analysis of human erythrocytes: I. Probed with lectins and immunoglobulins. *Exp Gerontol* 1991;26:315-326
- [159] Piagnerelli M, Zouaoui Boudjeltia K, Brohee D, Vereerstraeten A, Piro P, Vincent J-L, Vanhaeverbeek M. Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques. *J Clin Pathol* 2007;60:549-554
- [160] van den Bos C, van Gils FC, Bartstra RW, Wagemaker G. Flow cytometric analysis of peripheral blood erythrocyte chimerism in alpha-thalassemic mice. *Cytometry* 1992;13:659-662
- [161] Mollet M, Godoy-Silva R, Berdugo C, Chalmers JJ. Computer simulations of the energy dissipation rate in a fluorescence-activated cell sorter: Implications to cells. *Biotechnol Bioeng* 2008;100:260-272
- [162] Barger MA, in J.D. Weiss, K.J. Wardrop (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology* 6th ed., Blackwell Publishing Ltd, Ames, 2010, pp. 144-151
- [163] Sheetz MP, Singer SJ. On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes. I. The role of the spectrin complex. *J Cell Biol* 1977;73:638-646
- [164] Stojanovic Z, Markovic S, Uskokovic D. Merenje raspodele velicina cestica metodom difrakcije laserske svetlosti. *Tehnika - Novi materijali*, 2010;19;1-16
- [165] Bosman GJ, Cluitmans JC, Groenen YA, Werre JM, Willekens FL, Novotný VM. Susceptibility to hyperosmotic stress-induced phosphatidylserine exposure increases during red blood cell storage. *Transfusion* 2011;51:1072-1078
- [166] Harris FM, Smith SK, Bell JD. Physical properties of erythrocyte ghosts that determine susceptibility to secretory phospholipase A2. *J Biol Chem* 200;276:22722-22731
- [167] Sharma R, Premachandra BR. Membrane-bound hemoglobin as a marker of oxidative injury in adult and neonatal red blood cells. *Biochem Med Metab Biol* 1991;46:33-44

- [168] Kunitsyn VG, Panin LE, Mechanism of Erythrocyte Deformation under the Action of Stress Hormones. *International Journal of Biophysics* 2013;3:1-14
- [169] Foroozesh M, Hamidi M, Zarrin A, Mohammadi-Samani S, Montaseri H. Preparation and in-vitro characterization of tramadol-loaded erythrocyte carriers for long-term intravenous delivery. *J Pharm Pharmacol* 2010;63:322-332
- [170] Hamidi M, Azimi K, Mohammadi-Samani S. Co-encapsulation of a drug with a protein in erythrocytes for improved drug loading and release: Phenytoin and bovine serum albumin. *J Pharm Pharm Sci* 2011;14:46-59
- [171] Sternberg N, Georgieva R, Duft K, Bäuml H. Surface-modified loaded human red blood cells for targeting and delivery of drugs. *J Microencapsul* 2012;29:9-20
- [172] DeLoach JR, Spates GE. A comparison of membrane lipid content of normal and carrier-erythrocytes from cattle. *Ital J Biochem* 1988;37:386-391
- [173] Milanick MA, Ritter S, Meissner K. Engineering erythrocytes to be erythrosensors: first steps. *Blood Cells Mol Dis* 2011;47:100-106
- [174] Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Erythrocytes load of low molecular weight chitosan nanoparticles as a potential vascular drug delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012;95:258-265
- [175] Harvey JW, in JJ Kaneko, JW Harvey, ML Bruss (Eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic Press, New York, 2008, pp. 173-238
- [176] Matsuzawa T, Ikarashi Y. Haemolysis of various mammalian erythrocytes in sodium chloride, glucose and phosphate-buffer solutions. *Lab Anim* 1979;13:329-331
- [177] Brzezińska-Slebodzińska E. Species differences in the susceptibility of erythrocytes exposed to free radicals in vitro. *Vet Res Commun* 2003;27:211-217
- [178] Johnstone J, MacLaren LA, Doucet J, McAlister VC. In vitro studies regarding the feasibility of bovine erythrocyte xenotransfusion. *Xenotransplantation* 2004 ;11:11-17.
- [179] Adenkola AY, Ayo JO, Sackey AKB, Adelaiye AB. Erythrocyte osmotic fragility of pigs administered ascorbic acid and transported by road for short-term duration during the harmattan season. *Afr J Biotechnol* 2010;9:226-233

- [180] Mota-Rojas D, Becerril-Herrera M, Roldan-Santiago P, Alonso-Spilsbury M, Flores-Peinado S, Ramírez-Necoechea R, Ramírez-Telles JA, Mora-Medina P, Pérez M, Molina E, Soní E, Trujillo-Ortega ME. Effects of long distance transportation and CO₂ stunning on critical blood values in pigs. *Meat Sci* 2012;90:893-898.
- [181] Vodela JK, Dalvi RR. Erythrocyte glutathione-S-transferase activity in animal species. *Vet Hum Toxicol* 1997;39:9-11
- [182] Biondi M, Ungaro F, Quaglia F, Netti PA. Controlled drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:229-242
- [183] Montes LR, López DJ, Sot J, Bagatolli LA, Stonehouse MJ, Vasil ML, Wu BX, Hannun YA, Goñi FM, Alonso A. Ceramide-enriched membrane domains in red blood cells and the mechanism of sphingomyelinase-induced hot-cold hemolysis. *Biochemistry* 2008;47:11222-11230
- [184] Grebowski J, Krokosz A, Puchala M. Fullerenol C₆₀(OH)₃₆ could associate to band 3 protein of human erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* 2013;1828:2007-2014
- [185] Wali RK, Jaffe S, Kumar D, Sorgente N, Kalra VK. Increased adherence of oxidant-treated human and bovine erythrocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 1987;133: 25-36
- [186] Andrade CT, Barros LA, Lima MC, Azero EG. Purification and characterization of human hemoglobin: effect of the hemolysis conditions. *Int J Biol Macromol* 2004;34:233-240
- [187] Sun M, Northup N, Marga F, Huber T, Byfield FJ, Levitan I, Forgacs G. The effect of cellular cholesterol on membrane-cytoskeleton adhesion. *J Cell Sci* 2007;120:2223-2231
- [188] Murakami K, Mawatari S. Oxidation of hemoglobin to methemoglobin in intact erythrocyte by a hydroperoxide induces formation of glutathionyl hemoglobin and binding of alpha-hemoglobin to membrane. *Arch Biochem Biophys* 2003;417:244-250
- [189] Iglesias BF, Catalá A. Rat, caprine, equine and bovine erythrocyte ghosts exposed to t-butyl hydroperoxide as a model to study lipid peroxidation using a chemiluminescence assay. *Res Vet Sci* 2005;79:19-27

- [190] Rang HP, Dale MM., Ritter JM, Moore PK, in G. Hardman and L. E. Limbird (Eds.), *Pharmacology* 5th edition, 2003 Churchill Livingstone, New York, NY, USA
- [191] Ding S, Li J, Luo C, Li L, Long G, Yang S, Zhou S. Synergistic effect of released dexamethasone and surface nanoroughness on mesenchymal stem cell differentiation. *Biomater Sci* 2013;1:1091-1100
- [192] Eroglu H, Kas HS, Oner L, Turkoglu OF, Akalan N, Sargon MF, Ozer N. The in-vitro and in-vivo characterization of PLGA:L-PLA microspheres containing dexamethasone sodium phosphate. *J Microencapsul* 2007;185:603–612
- [193] Wang Y, Gao X, Kuriyavar S, Bourne D, Grady BP, Chen K, Dormer K, Kopke RD, Incorporation, release and effectiveness of dexamethasone in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for inner ear drug delivery, *J Nanotechnol Eng Med* 2011;2:011013-1-011013-7
- [194] Panin LE, Mokrushnikov PV, Kunitsyn VG, Zaitsev BN. Interaction mechanism of anabolic steroid hormones with structural components of erythrocyte membranes *J Phys Chem B* 2011;115:14969-14979
- [195] Martín-Sabroso C, Tavares-Fernandes DF, Espada-García JI, Torres-Suárez AI. Validation protocol of analytical procedures for quantification of drugs in polymeric systems for parenteral administration: dexamethasone phosphate disodium microparticles. *Int J Pharm* 2013;458:188-196
- [196] Rivas IP, Gil-Alegre ME, Torres-Suarez AI. Development and validation of a fast high-performance liquid chromatography method for the determination of microencapsulated pyrethroid pesticides. *Anal Chim Acta* 2006;557:245-251
- [197] Liu H, Chen X, Zhang S, Qu L, Zhao Y, Liu H, Dong M. Separation and determination of dexamethasone sodium phosphate in cochlear perilymph fluid by liquid chromatography with ultraviolet monitoring and electrospray ionization mass spectrometry characterization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 805:255-260
- [198] Florin-Christensen J, Suarez CE, Florin-Christensen M, Wainszelbaum M, Brown WC, McElwain TF, Palmer GH. A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7736-7741
- [199] Webb MS, Harasym TO, Masin D, Bally MB, Mayer LD. Sphingomyelin-cholesterol liposomes significantly enhance the pharmacokinetic and

- therapeutic properties of vincristine in murine and human tumour models. *Br J Cancer* 1995;72:896-904
- [200] Hamidi M, Zarrin AH, Foroozesh M, Zarei N, Mohammadi-Samani S. Preparation and in vitro evaluation of carrier erythrocytes for RES-targeted delivery of interferon-alpha 2b. *Int J Pharm* 2007;341:125-133
- [201] Staedtke V, Brähler M, Müller A, Georgieva R, Bauer S, Sternberg N, Voigt A, Lemke A, Keck C, Möschwitzer J, Bäuml H. In vitro inhibition of fungal activity by macrophage-mediated sequestration and release of encapsulated amphotericin B nanosuspension in red blood cells. *Small* 2010;6:96-103
- [202] Lewis DA, Alpar HO. Therapeutic possibilities of drugs encapsulated in erythrocytes. *Int J Pharm* 1984;22:137-146
- [203] Jain S, Jain SK, Dixit VK. Erythrocytes based delivery of isoniazid: preparation and in-vitro characterization. *Indian Drugs* 1995;32:471-476
- [204] Garín MI, López RM, Sanz S, Pinilla M, Luque J. Erythrocytes as carriers for recombinant human erythropoietin. *Pharm Res* 1996;13:869-874
- [205] Harisa G-D, Ibrahim MF, Alanazi FK. Characterization of human erythrocytes as potential carrier for pravastatin: an in vitro study. *Int J Med Sci* 2011;8:222-230
- [206] Tonetti M, Astroff B, Satterfield W, De Flora A, Benatti U, DeLoach JR. Construction and characterization of adriamycin-loaded canine red blood cells as a potential slow delivery system. *Biotechnol Appl Biochem* 1990;12:621-629
- [207] Talwar N, Jain, NK. Erythrocytes as carriers of primaquin- preparation: Characterization and evaluation. *J Control Release* 1992;20:133-142

ПРИЛОГ А

Зависност хематокрита, степена хемоллизе (%) и степена бубрења од моларности Na-фосфатног/NaCl пуфера добијених при одређивању степена бубрења еритроцита из говеђе и свињске кланичне крви, модификованом микрохематокритском методом [147]. Резултати представљају средњу вредност пет независних експеримената.

Говеђе еритроцити из кланичне крви	Моларност пуфера (mM)	Hct (%)	Степен хемоллизе (%)	Степен бубрења (V/Vo)
	154,0	35 ± 5	1,0 ± 1,7	1,00 ± 0,00
	139,1	37 ± 4	1,1 ± 1,8	1,01 ± 0,02
	124,2	37 ± 5	1,1 ± 1,9	1,04 ± 0,04
	109,3	39 ± 4	1,6 ± 2,1	1,06 ± 0,06
	94,4	40 ± 5	2,7 ± 2,5	1,08 ± 0,10
	79,5	41 ± 5	6,0 ± 4,3	1,15 ± 0,12
	64,6	38 ± 5	22,3 ± 9,8	1,32 ± 0,17
	49,7	23 ± 5	68,1 ± 12,0	1,85 ± 0,58
	34,8	11 ± 5	87,8 ± 6,5	1,84 ± 0,60
	19,9	5 ± 1	93,5 ± 4,5	1,88 ± 0,46
	12,5		96,2 ± 2,2	
	5,0		98,96 ± 3,6	
0		100 ± 0		
Свињски еритроцити из кланичне крви	Моларност пуфера (mM)	Hct (%)	Степен хемоллизе (%)	Степен бубрења (V/Vo)
	154,0	35,0 ± 0,7	0,9 ± 0,3	1,00 ± 0,00
	139,1	37,6 ± 0,5	1,2 ± 0,5	1,08 ± 0,02
	124,2	40,8 ± 2,2	3,9 ± 3,2	1,20 ± 0,09
	109,3	41,0 ± 1,1	14,6 ± 11,8	1,38 ± 0,19
	94,4	35,0 ± 4,8	41,5 ± 18,0	1,78 ± 0,37
	79,5	13,5 ± 9,4	78,9 ± 6,7	1,96 ± 0,02
	64,6	0,0	91,1 ± 5,8	0,0
	49,7		95,7 ± 5,5	
	34,8		95,8 ± 5,7	
	19,9		96,3 ± 5,1	
	12,5		97,5 ± 3,9	
	5,0		98,1 ± 4,1	
0		100 ± 0		

Осенчене вредности представљају најниже вредности моларности пуфера у којима се могао одредити хематокрит и степен бубрења.

БИОГРАФИЈА

Ивана (Томислав) Костић, дипломирани фармацеут, рођена је 13. децембра 1984. године у Београду. На Фармацеутском факултету Универзитета у Београду дипломирала је 2009. године, са просечном оценом 9,29, на катедри за Фармацеутску технологију и козметологију. Докторске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија, уписала је школске 2009/2010. године. Од фебруара 2010. до фебруара 2011. године била је стипендиста Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије у оквиру пројекта технолошког развоја бр. 18002. У звање истраживач приправник изабрана је 27. јануара 2011. године. Од 1. фебруара 2011. године запослена је као истраживач приправник у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду на пројекту „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“ (ИИИ 46010) који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. У звање истраживач сарадник изабрана је 7. септембра 2012. године.

Од 2011. године била је учесник на три међународна научна пројекта: "Development of enzyme processes for production of egg white protein hydrolysates" (E! 6750- ENZEGG), који је реализован у оквиру ЕУРЕКА Програма између Републике Србије и Републике Словеније у периоду 2011.-2014. године; "Stabilisation of natural bioactive compounds: Study of encapsulation techniques and release studies" који је реализован у оквиру билатералне сарадње између Републике Србије и Републике Португал у периоду 2011.-2012. године; и "Hemoglobin from renewable source as a starting material for heme iron product for prevention and therapy of anemia in domestic animals: Optimization of process of isolation and purification of hemoglobin" који је реализован у оквиру билатералне сарадње између Републике Србије и Републике Словеније у периоду 2012.-2013. године. Ивана Т. Костић је била и сарадник на једном иновационом пројекту Министарства просвете науке и

технолошког развоја Републике Србије „Salviva® -хумана вештачка пљувачка, технолошке могућности и клиничка примена“ (451-03-00605/2012-16/57) који је реализован у периоду од 2012. до 2013. године.

Ивана Т. Костић је до сада аутор или коаутор 19 радова штампаних у целини и то: једног (1) поглавља у истакнутој монографији међународног значаја (M13), осам (8) радова у међународним часописима (категорија M20) од којих је три (3) рада публиковано у врхунским међународним часописима (M21), један (1) рад публикован у истакнутом међународном часопису (M22), четири (4) рада у међународним часописима (M23); осам (8) саопштења са међународних скупова штампаних у целини (M33), једног (1) рада у научном часопису националног значаја (M53), и једног (1) саопштења са скупа националног значаја штампаног у целини (M63). Објавила је и 12 радова саопштених на домаћим и међународним скуповима штампаних у изводу, од чега је једно (1) предавање по позиву са међународног скупа штампаног у изводу (M32), девет (9) радова са међународних скупова (M34), и два (2) рада са скупова националног значаја штампаних у изводу (M64).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Костић (Томислав) Ивана

број индекса 4005/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Процесно очуване мембране еритроцита добијене из кланичне крви као системи за продужено ослобађање активних супстанци"

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 07.04.2015.

Томислав Ивана

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивана (Томислав) Костић

Број индекса 4005/2009

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада "Процесно очуване мембране еритроцита добијене из кланичне крви као системи за продужено ослобађање активних супстанци"

Ментори проф. др Бранко Бугарски и др Весна Илић

Потписани/а Ивана (Томислав) Костић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 07. 04. 2015.

Костић Иван

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"Процесно очуване мембране еритроцита добијене из кланичне крви као системи за продужено ослобађање активних супстанци"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 07.04.2015.

Јосипа Убана