

İlaçların Eritrositlerle Hedeflendirilmesi*

Drug targeting with erythrocytes

Nurten ÖZDEMİR, Betül ÖZALP

ÖZET

In vivo ortamda parçalanan, inaktive edilen ve /veya immün sistem tarafından reddedilen etken maddeleri bu etkilerden korumak amacıyla ilaç taşıyıcı sistemler içine yüklenmeleri önerilmektedir. Bu sistemlerle etken maddeler spesifik etki istenen bölgelere kadar taşınabilmekte ve o bölgede açığa çıkabilmektedir. Lipozomlar, nanopartiküller, eritrositler ve magnetik mikroküreler bu grup taşıyıcılarıdır.

Etken maddeleri taşıyıcı yapı olarak biyogeçimliliği sağlamak üzere doğal maddeler tercih edilmektedir. Bu amaçla çeşitli kan bileşenleri örneğin lökositler, eritrositler, antikorlar, serum albuminleri önerilmektedir.

Bu derlemede eritrositlere etken madde yükleme ve eritrositlerle hedefleme mekanizmalarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Anahtar sözcükler: Eritrositler, ilaç hedefleme, eritrosit taşıyıcılar, kontrollü salım.

SUMMARY

Encapsulation of active materials into the carrier systems may permit entrapped substances to be protected in vivo from inactivation or degradation or to be excluded from the immun system. These systems may also permit increased specificity of delivery to the target tissues. Liposomes, nanoparticles, serum albumin microbeads, erythrocytes and magnetic microspheres are some of these carrier systems.

Natural substances are preferred as carriers with respect to biocompatibility. For this purpose blood substances such as antibodies, leukocytes, erythrocytes and serum albumin are used.

Redaksiyona verilmiş tarihi : 23.11.1993

* A.Ü. Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Teknolojisi Bölümü, Ankara TÜRKİYE

The purpose of this paper is to review the mechanism of drug loading into the erythrocytes and the mechanism of drug targeting with erythrocytes.

Key word: Erythrocytes, drug targeting, erythrocyte carriers, controlled release.

Mikroküreler, lipozomlar ve nanopartiküllerde olduğu gibi eritrositlerin de ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilmesi böylece içine yüklenmiş etken maddelerin *invivo* koşullarda parçalanarak inaktive olmaktan korunabileceği, uzatılmış etki sağlanabileceği ayrıca hedef hücre ve dokulara etken maddenin taşınabileceği belirtilmektedir.

Eritrositler -8 µm çapında, disk biçiminde ve 2 tarafı çukur bikonkav bir yapıya sahiptirler. Bu yapı eritrositlere geniş bir yüzey / hacim oranı sağlamaktadır. Yani eritrositler küçük bir hacme karşılık geniş bir yüzeye sahiptirler. Bu özel yapı sayesinde eritrositlerin membranı fazla gerilmeden şişebilmekte ve bol miktarda oksijen ve karbondioksit taşıyabilmektedir. Küçük kan damarlarından geçerken kolayca şekil değiştirebilmektedirler ancak bu değişiklik geçicidir (1).

Eritrositler membran, stoma, hemoglobin, proteinler ve enzimlerden meydana gelmişlerdir. Takriben % 61 su, % 28 hemoglobin, % 7 lipid, % 4 karbonhidrat, elektrolit, enzim, protein ve metabolitlerini içerirler (1). Memeli hayvanlar ve insanlarda olgun eritrositler çekirdek, mitokondri ve ribozom taşımazlar.

Eritrositlerin kan dolaşımına girdikten sonra belli bir yaşam süresi vardır. Bu süre insanda 100-200 gün kadardır. Bu süreyi dolduran eritrositler dolaşımdan uzaklaştırılırlar. Kemik iliğinde devamlı olarak dolaşımdan ayrılan yaşlı hücrelerin yerini dolduracak sayıda eritrosit yapımı olmaktadır. Hergün eritrositlerin % 1 kadarı yenilenmektedir. Yaşlı eritrositlerin yok edilmesi ve gençlerin dolaşıma girişi hassas bir şekilde ayarlandığından dolaşım kanda eritrosit sayısı oldukça sabit tutulmaktadır. Kan kaybı olursa eritrosit yapımı artmaktadır. Normal düzeye ulaşıncaya kadar yapım tekrar normale dönmektedir. Kan nakli ile eritrosit sayısı artırılırsa, sayı normale düşünceye kadar, eritrosit yapımı durmaktadır (2).

Özellikle dalak, karaciğer, lenf bezleri ve kemik iliği gibi organlarda mevcut makrofajlar yaşlı eritrositleri tahrip etmektedirler. Makrofajlar içinde eritrositlerin parçalanması ile hemoglobin mole-

külü de parçalanmakta, proteinler ayrılmaktadır (1). Eritrosit membranı herhangi bir şekilde zedelenirse hemoglobin hücreden dışarı çıkarak plazmada erimiş halde bulunur. Eritrositlerin geri kalan kısmı hemoglobinin büyük bir kısmını kaybetmiş membran yapısından ibaret kalmaktadır ve bu soluk renkli yapıya "GHOST" adı verilmektedir. Herhangi bir şekilde eritrosit membranının zarar görüp stoplazmik içeriğin hücre dışına çıkması ise "LİZİS" olarak adlandırılmaktadır(3). Eritrositlerin hipotonik bir ortama konulmaları sonucunda membranda 20-50 nm çapında porlar oluşmakta ve stoplazmik içeriğin bir kısmı hücre dışına çıkarak lizis meydana gelmektedir. Aynı eritrositler daha sonra izotonik bir ortama konulduklarında ise membranda oluşan porların kapanması sonucunda ilaç taşıyıcı sistem oluşmaktadır

Eritrosit membranı yarı geçirgendir. Kolesterol ve fosfolipidden oluşmuştur. Yapılan araştırmalar sonucunda kolesterolün eritrositin şeklinde etkin olduğu bulunmuştur. Yine membran yapısında membranın iskeletini oluşturan proteinler vardır. Bunların % 60-75'ini spektrin adı verilen protein teşkil etmektedir ki bu diğer proteinlerle birleşerek eritrositin şeklini vermekte ve bu yapıyı muhafaza etmektedir (4).

Eritrosit membranında yer alan bu lipid ve proteinlerin yapıya etken madde yüklenmesi sırasında zarar görmesi veya yapıdan herhangi bir şekilde uzaklaştırılması eritrositin bikonkav yapısının bozulmasına veya yapıya yüklenecek etken maddenin eritrosit içine yeterince yüklenmemesine, eritrositin osmotik olarak kırılğan hale gelmesine neden olmaktadır (4).

Eritrosit içinde bulunan endoplazmik retikulum, lizozom gibi hücre organelleri de eritrosit esnekliğini sağlamak üzere belli konsantrasyonda hücre içinde bulunurlar. Tüm bu yapıların hedefleme işlemleri sırasında zarar görmeden korunması gerekmektedir (4).

Taşıyıcı sistem olarak eritrositlerin diğer taşıyıcı sistemlere göre bazı avantajları vardır (3). Bunlar:

1. Biyolojik olarak geçimlidirler.
2. Genellikle hastanın kendi eritrositleri kullanıldığından allerjik reaksiyon meydana getirmezler.
3. Eritrositler içinde etken madde enzimatik parçalanmadan korunur.

4. Etken maddede kimyasal modifikasyona gerek yoktur.

5. Retikülo endotelial sistem tarafından tutulurlar. Bu yüzden karaciğer ve dalakta etkili olması istenen maddeler bu yolla verilerek, karaciğer ve dalaktaki fagositik hücrelerin eritrositleri parçalaması sonucunda ortamda açığa çıkarılırlar (3).

Kullanılan etken madde yükleme yöntemine bağlı olarak eritrositlerin biyokimyasal yapısında meydana gelen küçük değişiklikler örneğin hücre proteinlerinden bazı siyalik asit kalıntılarının hücre yüzeyinden uzaklaşması, glikoproteinlerin ayrılması, membran sertliğinin artması, membrandaki sülfidril gruplarının oksidasyonu, bu hücrelerin organizmada genel dolaşımdaki kalış sürelerini ve biyolojik davranışlarını büyük ölçüde değiştirebilmektedir (4-6).

Eritrositlerin taşıyıcı olarak kullanıldığı sistemlerde karşılaşılan bir problem ise bunların kan bankalarında saklanmalarında in vitro stabilite probleminin bulunmasıdır. Normal transfüzyon kanındaki eritrositlerin saklama süreleri birkaç hafta iken etken madde yükleme işlemi sırasında kısmen zarar görmüş eritrositlerde bu süre daha da kısalmaktadır (3).

Eritrositlere etken madde yükleme yöntemleri

Eritrositlere etken madde yükleme işlemi üç yöntem ile yapılabilmektedir. Bunlar:

1. Hipoosmotik lizis yöntemi
 - a) Seyreltme
 - b) Önce şişirerek seyreltme,
 - c) Diyaliz
 - d) izoionik osmotik lizis
2. Elektriksel şok yöntemi
3. Endositoz yöntemi

Hipoosmotik lizis

Eritrositlerin yüklenmesi için 4 farklı hipoosmotik lizis yöntemi vardır.

a) *Seyreltme yöntemi*: Eritrositler etken madde içeren hipotonik bir ortamda veya suda dilüe edildiklerinde membranlarında oluşan

delikler, eritrosit içindeki bir takım hücre elemanlarının hücre dışına çıkmasına, etken maddenin de eritrosit içine girmesine ve birkaç dakika içinde bir denge oluşmasına neden olmaktadır.

Bu yöntemde hücre elemanlarının en fazla % 60-70'i hücre dışına çıkacak şekilde 1: 3 veya 1: 4 oranında seyreltme yapılmalıdır, Bu seyreltme eritrositlerin in vivo ortamda kalabilme yeteneklerini doğrudan etkilemektedir. Eğer eritrositler bu orandan daha az seyreltilirse eritrosit membranında etken madde girişine uygun porların oluşumu zorlaşmakta, daha fazla seyretmede ise stoplazmik içeriğin büyük bir kısmı oluşan geniş parlardan çıkarak yok olmakta, GHOST adı verilen ve genel dolaşımdan kolayca fagosite edilerek uzaklaştırılabilen yapı olmaktadır (4).

b) Önce şişirerek seyreltme yöntemi: Bu yöntem Rechsteiner (1975) tarafından geliştirilmiştir. Eritrositler çok az hipotonik bir ortamda lizis meydana gelmeksizin süspande edilerek şişmeye bırakılmaktadır. Daha sonra santrifüj edilmekte ve sisteme bir miktar etken maddenin sulu çözeltisi konularak lizis olayı gerçekleştirilmektedir. Bu işlem küçük moleküllü yapıların (ATP gibi) ve stoplazmik enzimlerin hücre içinden çıkmasına izin vermediğinden avantaj sağlamaktadır. Bu yöntem sonucunda hücrelerin in vivo olarak tam hücre özelliği gösterdiği bulunmuştur (6-9).

c) Dializ yöntemi: Konsantre eritrositler diyaliz tüpüne konularak, hipotonik bir ortam ile bu konulan hücreler arasında diyaliz sonucunda lizis meydana getirilmektedir. Eritrositler ile hipoosmotik ortam arasında bulunan diyaliz zarı eritrosite ait yapıların örneğin enzimlerin geçişine engel teşkil etmektedir. İşlem sonucunda etken madde yüklenip membran kapanarak eski halini aldığı eritrosit içeriği çok fazla değişmemiş olmaktadır ki bu da eritrositin in vivo ömrünü uzatmaktadır (4).

d) İzoyonik osmotik lizis yöntemi: Eritrositler, içinde glikol bulunan bir ortamda tutularak lizis meydana getirilmekte; sonra içinde glikol bulunmayan izoyonik bir ortamda seyreltilerek kapatılma işlemi yapılmaktadır (4).

2. Elektriksel Şok İle Yükleme Yöntemi

Bu yöntemde membrana bir elektrik akımı uygulanarak, membranda por oluşturulmaktadır. İlaç molekülünden daha büyük olan hücre elemanlarının kaybı olmaksızın etken maddenin hücre içine

alınması söz konusudur (5, 6). Tatbik edilen potansiyele bağlı olarak membranda belirlenen büyüklükte por oluşturulabilmektedir (10).

Yöntemin en büyük avantajı etken maddeden daha büyük molekülü stoplazma elemanı kaybı olmaksızın, etken maddenin hücre içine alınabilmesidir. Zimmerman'm geliştirdiği bu yöntemle eksternal proteinlerin hücre içine sokulması ve sonra da membranın kapatılması sağlanabilmiştir. Bu yöntem ile çapı 91-176 nm olan lateks partikülleri hücreye alınabilmiştir. Hipoosmotik lizis yönteminde ise denenmesine rağmen lateks partikülleri hücre içine alınamamıştır (10).

3. Endositoz Mekanizması İle Eritrositlere İlaç Yüklenmesi

Endositoz olayı yaratılarak eritrositler içine etken maddeler alınabilmektedir. Hipoosmotik lizisin tersine virüsler gibi 25-100 nm çapındaki yapıların, enzimlerin ve küçük moleküllerin alınımına uygun bir yöntemdir (11). Hücre membranı endosite edilecek yapıyı sararak içine almakta ve hücre içine alınan yapı eritrositin sitoplazmasından bir membranla ayrılmakta, ayrı bir yapı oluşmaktadır. Bu sayede etken madde eritrositin sitoplazmik enzimlerinin inaktive edici etkisinden ve eritrosit de etken maddenin etkisinden korunmuş olmaktadır. Eğer hücre içine alınan bu yapılarda sükröz gibi difüzyonla hücre içine geçiş yapamayan moleküller varsa, eritrosit içindeki ortam sıvısı bu moleküllerin içinde bulunduğu kesenin içindeki bileşime göre daha düşük konsantrasyonda olduğundan (hipoosmotik etki) eritrosit içindeki ortam sıvısından, çok yoğun ortama sıvı geçişi nedeniyle sükröz içeren kesecik patlayarak içeriği açığa çıkarmaktadır (11, 12).

Eritrosit içine etken madde almayı sınırlayan faktörler

1. *Molekül büyüklüğünün etkisi:* Hipotonik lizis sonucu eritrositler ışık mikroskobu ile incelendiğinde membranlarında 20-50 nm çapındaki porların tek bir noktasından veya pek çok bölgesinden hemoglobinin dışarı çıkış yaptığı tesbit edilmiştir (13).

Küçük moleküllerin, proteinlerin veya molekül ağırlığı 130.000'-nin altında olan enzimlerin, hipotonik lizis işlemi ile eritrosit membranlarında açılan porlardan karşılıklı olarak geçiş yapabildikleri, fakat daha büyük moleküllerin geçemedikleri tesbit edilmiştir (14).

Dışardan enerji verilerek gerçekleştirilen endositoz mekanizmasında hücre içine alınacak partikülün büyüklüğü önemli değildir.

Bu mekanizmada eritrosit membranı yapıyı içine alarak kendiliğinden hapsetmektedir. Dolayısıyla bu yöntemde farklı molekül ağırlığındaki antibiyotikler, bakteriyel virüsler hücre içine alınabilmektedir (15).

2. *Yüklenecek etken maddenin etkisi:* Çoğu lipofilik, amfifilik moleküller düşük dozlarda eritrositlerin hipotonik lizisini engellerler. Yüksek konsantrasyonda ise hücrenin tahrip olmasına neden olurlar. Mishra ve arkadaşları bir elektrik akımı altında yapılan hemoliz ile yapıya klorpromazini yükleyebildikleri halde, prokaini hücre içine alamamışlardır (16).

Yapılan çalışmalar sonucunda membranlarda aktif olan ilaçların oluşan porları etkilediği, porların yeniden yapımı ve stabilitesine etkili olduğu bulunmuştur (4).

Goldman ve arkadaşları birbirinden sadece küçük modifikasyonlarla ayrılan dört etken maddenin eritrositlerle etkileşmesini incelemişler ve bazı antrasiklin türevlerinin eritrosit membranı ile etkileştiğini bulmuşlardır. Adriamisin 14-asetatın, N trifluoraasetiladriamisin 14 valerat'ın eritrositlerin osmotik duyarlılığını düşürdüğünü gözlemişlerdir. Adriamisinin tek başına osmotik özellik üzerinde bir değişikliğe neden olmadığı, adriamisin 14 oktonatın ise çok düşük konsantrasyonlarda dahi hemolitik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Eritrositlerin duonomisin, adriamisin 14 asetat ve adriamisin 14 oktonat ile yapılan etkileşme çalışmalarında bu maddelerden sadece adriamisinin eritrosit şeklini bozmadığı, diğerlerinin ise bikonkav disk şeklini bozduğu görülmüştür (17).

Metotreksat, sitozin arabinoz, aktinomisin D ve bazı pestisitlerin yağda çözünürlüklerinin yüksek olması nedeniyle veya spesifik transport sistemleri ile taşınabildikleri için eritrositlerin içine alındıktan sonra geri serbest bırakıldıkları gözlenmiştir. Bu tür ilaçların eritrositler içinde kalış sürelerini artırmak için değişik metodlar geliştirilmiştir (17) Bunlar:

1. İlaçların polarizasyonunu artırmak için fosforilasyon yapmak.
2. Bu yapıları DNA gibi büyük molekül ağırlığına sahip yapılara kovalan bağlar ile bağlamak.
3. Eritrosit membranının transport özelliklerini değiştirmek.

Kullanılan etken maddeye bağlı olarak eritrosit içme alma yöntemleri modifiye edilebilmektedir. Deloach adlı araştırmacı eritrosit-

lerin yüklenmesi sırasında sertleştirme sıcaklığının 37 C'den, 25 C'ye veya daha düşük sıcaklıklara düşürülmesinin iyi sonuç verdiğini belirtmektedir (18).

İlaç taşıyıcı sistem olarak eritrositlerin kullanılış amaçları

Değişik yöntemlerle içlerine etken madde yüklenmiş eritrositlerle, bu etken maddelerin vücutta uzatılmış etki göstermesi sağlanabileceği gibi bazı organlara hedeflendirilmeleri de mümkün olabilmektedir. Yüklenmiş etken maddelerin başlıca 3 mekanizma ile eritrositten açığa çıkması söz konusudur. Bunlar fagositoz, basit difüzyon ve bazı özel transport mekanizmalarıdır. Bunlardan difüzyon mekanizması lipofilik karakterdeki etken maddeler için geçerli olmaktadır. Madde hidrofilik karakterde olduğunda veya yüklü bir yapı gösterdiğinde eritrositlerden salını mekanizması değişmekte ve kontrolü zorlaşmaktadır. Proteinlerin, hormonların ve enzimlerin eritrositler içine yüklenerek vücutta stabil kalış süreleri uzatılabilmektedir (8, 17, 19-22). Örneğin normal serbest metotreksatın 1 saat içinde vücuttan % 31'inin, 6 saat içinde % 95'inin idrarla atılmasına rağmen, eritrosit içine hapsedilen metotreksat'ın 1 saat içinde idrarla ancak % 7'sinin, 3.5 saat sonra % 9'unun atıldığı gözlenmiştir (17). Etken maddelerin yüklenmesi sırasında eritrositlerin özelliklerinin değişmesi ve bir miktar zarar görmeleri söz konusudur. Bu değişimin derecesi doğrudan eritrositlerin dolaşımında kalış sürelerini etkilemektedir. Bu ise etken maddelerin salım süresinin ayarlanmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle eritrositlerle sürekli etki elde etmek yerine, etken maddeleri belirli organlara hedeflemek tercih edilmektedir...

Eritrositler içine etken madde yüklemeye esas olan, eritrosit içeriğinin ve özellikle membran yapısının korunmasıdır. Eritrositlerin deforme olabilmeye yetenekleri onların kapiler damarlardan kolayca geçebilmelerini sağlamaktadır. Membran yapısı bozularak bu özellik kaybolunca (ki bu özellikle yaşlı hücrelerde görülür) hücreler dolaşımdan uzaklaştırılırlar. Zarar görmüş eritrositler retiküloendotelial sistem (RES) tarafından dolaşımdan uzaklaştırılmaktadırlar. Bu ise RES'e ilaç hedeflemeye istenen bir husustur. Eritrositleri hedeflemek amacıyla immünglobülinlerin (Ig) kullanımı da söz konusudur. Yapısında Ig M içeren eritrositlerin karaciğerde yıkımlanıp içerdikleri etken maddeyi orada açığa çıkarması söz konusu iken IgG içerenler dalakta yıkımlanmaktadırlar. Bu da ilgili organlara eritrositlerle etken madde hedeflemeye kullanılan bir yöntemdir. Etken madde yükleme işlemi

sırasında zarar görmüş eritrositlerin RES hücrelerine gitmesinden leşmana tedavisinde, antikanser ilaçların bu dokulara gönderilmesinde ve enzim eksikliğinin giderilmesinde faydalanılabileceği belirtilmektedir (5, 8, 10, 17, 23-26).

KAYNAKLAR

1. Guyton, A.C., Textbook of Medical Physiology, 3 rd edition, W.B. Saunders comp London, 109 (1967).
2. Conley, C.L., The Blood (Medical Physiology) 13 th ed. vol. 2, Mountcastle, V.B. (ED), C.V. Mosby comp., Saint Louis 1027 (1974).
3. Davson, H., General Physiology 3rd ed., J.A. Churchill Ltd., London, 227 (1964).
4. Juliano, R.L., Microparticulate Drug Carriers: Liposomes, Microspheres and Cells (Controlled Drug Delivery) Robinson J.R., Lee V.H.L., (eds.) Marcel Dekker Inc., New York, 555 (1987).
5. Leung, S.P., Robinson, J.R., Lee, V.H.L., Paranteral Products (Controlled Drug Delivery) Robinson J.R., Lee V.H., (eds.), Marcel Dekker Inc., New York, 433 (1987).
6. Ihler, G.M., Tsang, H.C., Erythrocyte Carriers, *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System*, 1, 155-186 (1990).
7. Pitt, E., Lewis, D.A., Afford, R.E., The use of corticosteroids encapsulated in erythrocytes in the treatment of adjuvant induced arthritis in the rat, *Biochem. Pharmacol*, 32, 3353-3358 (1983).
8. Alpar, H.O., Lewis, D.A., The prolongation of the survival times of mice implagted with TLX-5 cells by treatment with methotrexate encapsulated in erythrocyres, *Biochem. Pharmacol.*, 36, 3081-3087 (1987).
9. Seeman, P., Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis and stable holes in the membrane after lysis by saponins and lysolecithin, *J. Cell. Biol.*, 32, 55-67 (1979).
10. Ihler, G.M., Erythrocyte Carriers (Methods of Durg Delivery) Pergamon Press, New York 3 (1986).
11. Tsong, T.Y., Kingsley, E., Hemolysis of human erythrocyte induced by a rapid temperature jmp, *J. Biol. Chem.*, 250, 786-792 (1975).
12. Sale, A.J.H., Hamilton, W.A., Effects of high electric fields on microorganism III. Lysis of erythrocytes and protoplasis, *Biochim. Biophys. Acta*, 163, 37-39 (1968).
13. Schrier, S.L., Bensch, K.G., Johnson, M., Energized endocytosis in human erythrocyte ghost, *J. Clin. Inverst.*, 56, 8-12 (1975).
14. Baker, R.F., Gillis, N.R., Osmotic hemolysis of chemically modified red blood cells, *Blood*, 33, 170-177 (1969).
15. Danon, D., Osmotic hemolysis by a gradual decrease in the ionic strenght of the surrounding medium, *J. Cell Comp. Physiol.*, 57, 111-117 (1961).

16. **Mishra, K.P., Le Dac B., Singh, B.B.**, Effect of dielectric discharge on drug treated mammalian cells, *Ind. J. Exp. Biol.*, 19, 520-523 (1981).
17. **Goldman, R., Faccinetti, T., Bach, D., Raz, A.A.**, A differential interaction of daunomycin, adriamycin and their derivatives with human erythrocytes and phospholipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, 512, 254-261 (1978).
18. **De Loach, J.R., Harris, R.L., Ihler, G.**, An erythrocyte encapsulator dialyser used in preparing large quantities of erythrocyte ghost and encapsulation of a pecticide in erythrocyte ghost, *Anal. Biochem.*, **102**, 220-227 (1980).
19. **Feld, W.N., Gamble, M.D., Lewis, D.A.**, A comparison of the treatment of thyroidectomized rats with free thyroxine and thyroxine encapsulated in erythrocytes, *Int. J. Pharm.*, 51, 175-178 (1989).
20. **Lynch, W.E., Sartino, G.P., Shaffer, A.**, Erythrocytes as carriers of chemotherapeutic agents for targeting the reticuloendothelial system, *Amer. J. Hematol.*, 9, 249-252 (1980).
21. **Lewis, D.A., Alpar, H.O.**, Erythrocytes as microvesicles (Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy) Donbrow M., (ed). CRC Press, London 299 (1992).
22. **Bird, J., Best, R., Lewis, D.A.**, The encapsulation of insulin in erythrocytes, *J. Pharm. Pharmacol.*, 35, 246-247 (1983).
23. **Ihler, G.M., Glew, R.H., Schere, F.W.**, Enzyme loading of erythrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 70, 2663-2673 (1973).
24. **Koch, H.P.**, Controlled drug delivery system, *Sci. Pharm.*, 59, 85-95 (1991).
25. **Urdike, S.J., Wokomiya, T., Lightfoot, E.**, Asparaginase entrapped in red blood cells, *action and Survival Sci.*, 193, 681-686 (1976).
26. **Jain, S.K., Vyas, S.P.**, Magnetically responsive diclofenac sodium-loaded erythrocytes: preparation and in vitro characterization, *J. Microencapsulation*, 11, 141-151 (1994).