



**I.O.S.U.D. - Universitatea de Vest “Vasile
Goldiș” din Arad
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE**

**TEZĂ DE DOCTORAT
Rezumat**

**ARAD
2018**



**I.O.S.U.D. - Universitatea de Vest “Vasile
Goldiș” din Arad
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE**

TEZĂ DE DOCTORAT

IMPLICAREA APOPTOZEI ERITROCITARE ÎN PATOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGII

Conducător științific:

Prof. univ. dr. DANIELA BRATOSIN

Doctorand:

DANA M. ZDREMȚAN

**ARAD
2018**



**I.O.S.U.D. – Vasile Goldiș Western University
of Arad
DOCTORAL SCHOOL OF BIOLOGY**

PhD THESIS

INVOLVEMENT OF ERYTHROCYTE APOPTOSIS IN PATHOLOGY AND BIOTECHNOLOGIES

**Scientific supervisor:
Prof. DANIELA BRATOSIN**

**PhD Student:
DANA M. ZDREMȚAN**

**ARAD
2018**

CUPRINS

Introducere	13
PARTEA I – Considerații generale asupra apoptozei eritrocitare. Implicarea apoptozei eritrocitare în patologii și biotehnologii	17
CAPITOLUL 1. Noțiuni generale despre eritrocitul uman	18
1.1. Originea eritrocitului uman	18
1.2. Eritropoieza sau formarea eritrocitului matur	19
1.3. Structura, fiziologia și morfologia eritrocitului uman	20
1.4. Structura și funcțiile membranei eritrocitare	21
1.5. Reglarea transportului transmembranar la nivelul eritrocitului	25
1.6. Metabolismul eritrocitului uman	27
CAPITOLUL 2. Apoptoza eritrocitelor umane și rolul acesteia în menținerea homeostaziei	29
2.1. Noțiuni generale despre apoptoză	29
2.2. Apoptoza eritrocitului uman (eritroptoza sau eriptoza)	31
CAPITOLUL 3. Efecte ale apoptozei eritrocitare asupra unor dezechilibre homeostazice și patologii	35
3.1. Efectul hipertermiei asupra morții programate a eritrocitelor	36
3.2. Sindromul hemolitic uremic și apoptoza eritrocitară	36
3.3. Efectele agenților infecțioși asupra integrității eritrocitare	36
3.4. Implicarea eritroptozei în anemii	38
3.5. Defecte ale hemoglobinei eritrocitare și efectele lor asupra celulei	39
3.6. Efectele intoxicației cu metale grele asupra eritrocitului	40
3.7. Deshidratarea și efectele sale asupra integrității eritrocitare	41
Capitolul 4. Bioingenierii eritrocitare. Abordări ale ingineriei genetice și ale ingineriei non-genetice	42
4.1. Tendințe moderne în biofarmacologie	42
4.2. Modificări genetice ale eritrocitelor pentru utilizarea lor în scop terapeutic	43
4.3. Modificări non-genetice efectuate la nivel eritrocitar pentru transportul unor produși terapeutici	44
4.4. Aplicații terapeutice ale transportului de produși cu ajutorul eritrocitelor	45
4.4.1. Eritrocitele utilizate ca vectori de transport pentru medicamente trombolitice	45
4.4.2. Eritrocitele utilizate ca vectori de transport pentru enzime	46
4.4.3. Utilizarea eritrocitelor ca vehicule pentru nanoparticule	48
4.4.4. Utilizarea eritrocitelor ca vectori de transport pentru îmbunătățirea tratamentelor dislipidemiilor	53
4.4.5. Transportul oligonucleotidelor antisens de ADN	53
4.4.6. Corticoterapia cu ajutorul eritrocitelor	54
4.5. Metode biotehnologice de obținere a transportorilor eritrocitari	55
4.5.1. Încapsularea substanțelor prin hemoliza hipotonă a eritrocitelor	55
4.5.2. Încapsularea substanțelor prin utilizarea unui dispozitiv de încărcare	56

4.5.3. Încapsularea substanțelor prin utilizarea diluției hipotone a eritrocitelor	56
4.5.4. Încapsularea substanțelor prin pregonflarea hipotonă a eritrocitelor	57
4.5.5. Încapsularea substanțelor în eritrocit prin dializă hipotonă	57
4.5.6. Încapsularea substanțelor în eritrocit prin liză osmotică	58
4.5.7. Încărcarea în eritrocite prin perturbarea chimică a membranelor	58
4.5.8. Încărcarea în eritrocite prin electro-insertie sau electro-încapsulare de	
moleculare bioactive	59
4.5.9. Încapsularea substanțelor în eritrocit prin endocitoză	59
4.5.10. Încărcarea prin fuziune celulară electrică	60
4.5.11. Încărcarea eritrocitelor prin fuziune cu lipide	60
4.6. Metode de prevenire a eliberării premature a substanțelor	
terapeutice/nanoparticulelor din eritrocite	60
PARTEA A II-A – Cercetare personală	62
CAPITOLUL 5. Scopul și obiectivele cercetărilor	63
CAPITOLUL 6. Material și metode	65
6.1. Produse biologice, materiale și aparatură utilizate pentru realizarea părții	
experimentale	65
6.1.1. Produse biologice	65
6.1.2. Materiale chimice	66
6.1.3. Aparatura de laborator	67
6.2. Metode de analiză bazate pe citometrie în flux	68
6.2.1. Citometria în flux. Generalități	68
6.2.2. Prezentarea și analiza datelor obținute prin CMF	72
6.2.3. Evaluarea modificărilor morfologice celulare prin măsurarea absorbției și	
difracției luminii, în sistem FSC/SSC prin tehnici de citometrie în flux	74
6.2.4. Evaluarea viabilității eritrocitelor prin măsurarea activității esterazelor de	
la nivel intracelular, utilizând Calceină-AM	76
6.2.5. Evaluarea apoptozei celulare prin marcarea cu Anexină-V	77
6.3. Metode de analiză prin tehnici de microscopie	78
6.3.1. Analize efectuate prin tehnici de microscopie optică în lumină directă	78
6.3.2. Analiza prin microscopie electronică	79
6.3.2.1. Microscopia electronică de scanare (Scanning Electron Microscopy -	
SEM)	79
6.3.2.2. Microscopie electronică de transmisie (TEM - Transmission	
Electron Microscopy)	81
6.4. Metode de laborator clinic	82
CAPITOLUL 7. Evaluarea apoptozei eritrocitare în anemii	83
7.1. Importanța studierii anemiilor	83
7.2. Caracterizarea lotului studiat	85
7.3. Analiza modificărilor de morfologie prin citometrie în flux și microscopie de	
scanare (SEM) pentru diferitele tipuri de anemie	86
7.3.1. Evaluarea morfologiei eritrocitare prin măsurarea difracției și absorbției	
luminii în sistem FSC/SSC	86
7.3.2. Determinarea prin citometrie în flux a externalizării de fosfatidilserină	90

(PS) cu Annexină V-FITC	
7.3.3. Evaluarea viabilității eritrocitelor cu Calceină-AM	91
7.4. Concluzii	93
CAPITOLUL 8. Evaluarea comportamentului osmotic al eritrocitelor umane pentru aplicații biotehnologice de transportori celulari	95
8.1. Analiza prin citometrie în flux și microscopie SEM al comportamentului osmotic al eritrocitelor	95
8.2. Analiza modificărilor de morfologie prin citometrie în flux în sistem FSC/SSC și microscopie de scanare (SEM) pentru eritrocitele supuse șocului osmotic	96
8.3. Determinarea autofluorescenței (MFI) a hematiilor în FL1 și FL2 pentru hematiile supuse șocului osmotic	101
8.4. Determinarea viabilității hematiilor cu calceină-am pentru hematiile supuse șocului osmotic	104
8.5. Determinarea gradului de externalizare al fosfatidilserinei prin citometrie în flux cu anexina-v-fitc la eritrocitele supuse șocului osmotic	106
8.6. Concluzii cu privire la comportamentul osmotic al hematiilor umane	107
CAPITOLUL 9. Utilizarea hematiilor umane ca transportori de nanoparticule feroase - obținere și caracterizare	109
9.1. Pregătirea eritrocitelor și încapsularea nanoparticulelor feroase	111
9.2. Analiza prin citometrie în flux a eritrocitelor incubate cu nanoparticule pe bază de fier	112
9.2.1. Analiza în sistem SSC/FSC	112
9.2.2. Analiza încapsulării nanoparticulelor în eritrocite prin citometrie în flux, utilizând sistemul FL1 de cuantificare a autofluorescenței	114
9.2.3. Analiza viabilității cu Calceină-AM a hematiilor incubate cu nanoparticule în soluții hipotone de NaCl cu concentrații variabile	116
9.2.4. Analiza gradului de externalizare a fosfatidilserinei prin citometrie în flux cu Anexina-V-FITC la eritrocitele incubate cu nanoparticule în soluții hipotone de NaCl	116
9.3. Evaluarea înglobării nanoparticulelor pe bază de fier în eritrocite prin tehnici de microscopie electronică	117
9.3.1. Analiza morfologiei eritrocitelor incubate în medii hipotone în prezența de nanoparticule ferice prin microscopie electronică de scanare (SEM)	117
9.3.2. Evidențierea înglobării de nanoparticule ferice prin analiza EDX (raze X cu dispersie energetică)	122
9.3.3. Evidențierea înglobării de nanoparticule ferice prin microscopie electronică de transmisie (TEM)	127
9.4. Concluzii cu privire la încapsularea nanoparticulelor pe bază de fier în eritrocite	130
Capitolul 10. Încapsularea de nanoparticule feroase în eritrocite utilizând medii speciale de conservare a sângelui (SAGM și PAGGSM) - obținere și caracterizare	133
10.1. Pregătirea eritrocitelor și încapsularea nanoparticulelor feroase	134
10.2. Analiza prin citometrie în flux a eritrocitelor incubate cu nanoparticule pe bază de fier	136
10.2.1. Analiza în sistem FSC/SSC	136

10.2.2. Analiza încapsulării nanoparticulelor în eritrocite prin citometrie în flux, utilizând sistemul FL1.	140
10.2.3. Analiza viabilității cu Calceină-AM a hematiilor incubate cu nanoparticule în soluții hipotone de SAGM și PAGGSM cu concentrații variabile	141
10.2.4. Analiza gradului de externalizare a fosfatidilserinei prin citometrie în flux cu Anexină-V-FITC la eritrocitele incubate cu nanoparticule în soluții hipotone de NaCl	142
10.3. Concluzii cu privire la încapsularea nanoparticulelor pe bază de fier în eritrocite utilizând medii speciale de conservare a sângelui (SAGM și PAGGSM)	143
Capitolul 11. Înglobarea în eritrocit a unei substanțe de contrast utilizată în diagnosticul imagistic	145
11.1. Evaluarea înglobării Omniscanului în eritrocite prin citometrie în flux	146
11.1.1. Analiza probelor prin citometrie în flux, în sistem FSC/SSC	146
11.1.2. Analiza eritrocitelor și Omniscanului prin citometrie în flux, în sistem FL1	148
11.2. Concluzii cu privire la analiza incubării eritrocitelor cu Omniscan	150
Capitolul 12. Înglobarea albuminei marcate cu FITC în eritrocite	151
12.1. Analiza eritrocitelor incubate cu albumină-FITC prin citometrie în flux	151
12.1.1. Analiza în sistem FSC/SSC	152
12.1.2. Analiza eritrocitelor incubate cu albumină prin citometrie în flux, în sistem FL1	152
12.2. Evaluarea înglobării albuminei marcate cu FITC în eritrocite prin tehnici de microscopie optică	153
12.3. Concluzii cu privire la înglobarea albuminei-FITC în eritrocite	157
Concluzii generale	158
Bibliografie	161

INTRODUCERE

Organismul uman adult produce în mod continuu mai mult de 3 milioane de eritrocite pe secundă, care reprezintă aproximativ 50% din volumul sanguin. În plus, volumul brut cumulat al tuturor eritrocitelor depășește doi litri, ceea ce reprezintă aproximativ 10% din volumul total al celulelor, fiind astfel printre cele mai abundente tipuri de celule din corpul uman.

Hematiile umane au o durată de viață în circulația sanguină de 120 de zile înainte de a fi fagocitate de macrofage (Berceanu, 1977).

Hematiile umane au fost considerate mult timp doar niște simpli „saci cu hemoglobină”. Într-adevăr, ele nu conțin nucleu, mitocondrii sau alte organite celulare esențiale sintezei proteice sau altor procese metabolice existente în celulele considerate „celule adevărate”. Datorită acestei aparente simplități, eritrocitele au stârnit interesul cercetătorilor, în special pentru studii legate de îmbătrânirea celulară, hematiile acumulând toate modificările apărute în cursul celor 120 de zile de viață, în lipsa unei neosinteze proteice.

Extinderea cercetărilor a condus ulterior la dezvoltarea multor ipoteze referitor la scoaterea hematiilor umane din circulație după 120 de zile și mai ales asupra semnalelor care declanșează această eliminare: i) modificări ale componentelor de membrană eritrocitară cum ar fi modificarea carbohidraților prin desializare enzimatică, eliberarea de vezicule sau acțiunea unor endopeptidaze, ii) modificări apărute în timp ale componentelor membranare precum banda 3 sau clasa glicoforinelor, modificări care conduc la apariția unor "antigene non-self", care, la rândul lor declanșează producția de anticorpi, iii) pierderea fosfolipidelor de membrană, asimetrie care are ca rezultat apariția progresivă de fosfatidilserină la suprafața celulară, și iv) apariția unor leziuni oxidative ale grupărilor SH conducând la modificarea ireversibilă a proteinelor de membrană (Bratosin *et al.*, 1998).

O dată cu explozia cercetărilor de apoptoză sau moarte celulară programată (PCD), durata programată a vieții eritrocitelor a generat primele cercetări pornind de la ipoteza că eliminarea hematiilor senescente din circulație ar putea fi datorată de asemenea unui fenomen de apoptoză sau asemănător apoptozei (apoptose-like), deși aceste celule muribunde sunt lipsite de nucleu și mitocondrii, elemente esențiale în mecanismul de apoptoză (Bratosin *et al.*, 1999). Ulterior, în 2001, Bratosin și colaboratorii au raportat simultan cu Berg și colaboratorii că moartea programată a eritrocitelor ar putea fi indusă de un influx de Ca^{2+} și prevenită cu inhibitori de caspaze și calpaina deși forme active de caspaza-3 și -8 nu au fost evidențiate în acel timp.

Luând în considerare aceste descoperiri, a fost creat termenul de eritroptoză (Daugas *et al.*, 2001) și ulterior de eritroptoză (Lang *et al.*, 2005) pentru a descrie moartea suicidală a hematiilor. S-a demonstrat că expunerea eritrocitelor la ionomicină, un ionofor al Ca^{2+} , provoacă contracția celulelor, ridarea membranei cu eliminarea de vezicule și expunerea fosfatidilserinei la exterior, toate caracteristici tipice pentru celulele nucleate apoptotice (Bratosin *et al.*, 2001; Berg

et al., 2001; Daugas *et al.*, 2001).

În 2009, Bratosin și colaboratorii reușesc să evidențieze existența caspazelor active, respectiv caspaza-3 și -8 în hematiile senescente izolate *ex vivo* ceea ce demonstrează că într-adevar eliminarea hematiilor după o viața programată de 120 de zile este un fenomen de apoptoză.

Implicarea eritroptozei în patologie are o importanță clinică majoră, atât pentru diagnostic, evaluarea gravității bolii dar și pentru stabilirea conduitei terapeutice adecvate și prognostic.

Având în vedere că hematia este o celulă foarte versatilă, cu o membrană extrem de elastică și care se pretează la modificări structurale, fără a-și modifica funcțiile, iar rolul ei primar este de transport, s-a pus problema utilizării acesteia în biotehnologii.

Eritrocitele sunt potențiali vectori biocompatibili pentru diferite medicamente, peptide și enzime. Ele pot fi folosite, fie pentru eliberarea treptată a substanței de interes în organismul vizat, fie pentru a direcționa selectiv medicamentul sau particula, către organe specifice, mai ales către cele la nivelul cărora sunt distruse eritrocitele (Srinu *et al.*, 2012)

În literatură se menționează utilizarea cu succes a eritrocitelor ca vectori de transport pentru enzime (Godfrin&Goineau, 2005), medicamente (Harisa *et al.*, 2011; Fraternali *et al.*, 1996) – astfel de sisteme fiind deja folosite în clinici pentru tratarea pacienților oncologici, dar și pentru nanoparticule magnetice utilizate în imagistică medicală (Antonelli *et al.*, 2011)

Utilizarea eritrocitelor ca transportori are numeroase beneficii: sunt biocompatibile în cazul autotransfuziei, sunt biodegradabile, pot preveni distrugerea și inactivarea medicamentului prin acțiunea factorilor endogeni, protejează organismul de efectele unor agenți toxici precum citostaticele, au abilitatea de a circula în întreg organismul și a atinge organe țintă, se evită răspunsul imun nedorit asupra compusului farmaceutic și scad efectele adverse ale medicamentelor.

În ceea ce privește unele dezavantaje, acestea se referă la posibile modificări care ar putea apărea la nivelul eritrocitului în timpul încărcării cu moleculele de interes, ducând la degradarea lor mult mai rapidă. De asemenea există substanțe care s-ar putea scurge din celule ducând la supradozaj (Valbonesi *et al.*, 2001; Jaitely *et al.*, 1996).

Motivele enumerate anterior ne-au determinat să studiem implicarea apoptozei eritrocitare în patologie și biotehnologii prin utilizarea citometriei de flux pentru analiză dar și a unor tehnici complementare de microscopie optică și electronică.

În acest scop, au fost realizate studii preliminare de stabilire *in vitro* a condițiilor de înglobare a moleculelor în eritrocite și evaluarea compatibilității moleculelor alese și a eritrocitelor transportoare prin analiza viabilității celulelor încărcate cu molecule și nanoparticule de oxid de fier, precum și caracterizarea stării funcționale a eritrocitelor (viabilitate/moarte celulară indusă de molecule/nanoparticule).

În prezent, biomedicina și biofarmacia, se bazează tot mai mult pe înlocuirea

substanțelor medicamentoase clasice cu efecte secundare majore cu alternative de tratament mai puțin toxice pentru organism. Ne-am propus astfel, utilizarea eritrocitului pentru dezvoltarea unor tratamente moderne cu eficiență sporită atât ca efect asupra patologiei și reducerea efectelor secundare dar și ca reducere a costurilor.

Având în vedere potențialul citometriei de flux pentru evaluarea eritrocitelor aflate în apoptoză dar și pentru caracterizarea morfo-structurală a acestora, a fost utilizată această tehnică pentru diagnosticarea și diferențierea anemiilor, analize începute în cadrul studiilor de licență, în anul 2013 și aprofundate de-a lungul perioadei de doctorat

PARTEA I

Considerații generale asupra apoptozei eritrocitare. Implicarea apoptozei eritrocitare în patologii și biotehnologii

CAPITOLUL 1

Noțiuni generale despre eritrocitul uman

Fie că se numesc hematii, eritrocite sau globule roșii, acestea sunt cele mai comune celule sanguine. Cu ajutorul hemoglobinei pe care o conțin, ele sunt responsabile pentru transportul, fixarea și eliminarea gazelor respiratorii precum oxigenul și dioxidul de carbon. Hematiile au o formă de disc biconcav și sunt esențiale tuturor vertebratelor în toate stadiile de viață – embrionară, fetală, neonatală, adolescență și adultă (Dzierzak&Philipsen, 2015).

Hematiile umane normale au un diametru de 7-8 μm și un volum mediu de 90 fl. Ele sunt anucleate și își pierd organitele în timpul maturării. Eritrocitele fac parte din sistemul circulator 100-120 de zile, după care sunt îndepărtate selectiv de macrofage în sistemul reticuloendotelial (Beutler&Lichtman, 1995; Pierigè *et al.*, 2008).

Eritropoieza este un proces realizat la nivelul măduvei roșii hematogene. Există următoarele etape în formarea hematiei: proeritroblastul, eritroblastul bazofil, eritroblastul policromatofil, eritroblastul oxifil și hematia. Formarea eritrocitului este reglată de eritropoietină, un hormon peptidic a cărui secreție este stimulată de anoxia renală.

Structura membranei eritrocitare urmează modelul “mozaicului fluid”, format din două straturi fosfolipidice complexe, unite prin legături hidrofobe, cu intercalarea de proteine membranare cu funcții diverse. Acestea pot avea rol de receptori, transportori, precum și enzimatic. Proteinele membranare periferice reprezintă rețeaua citoscheletului cu rol în controlul taliei, formei, flexibilității și rezistenței membranei eritrocitului, jucând un rol important și în realizarea interacțiunilor intercelulare și fuziunii membranare. Schimbarea acestei structuri complexe duce modificări de ordin morfologic al eritrocitelor, determinând formarea de micro-vezicule la nivelul membranei celulare.

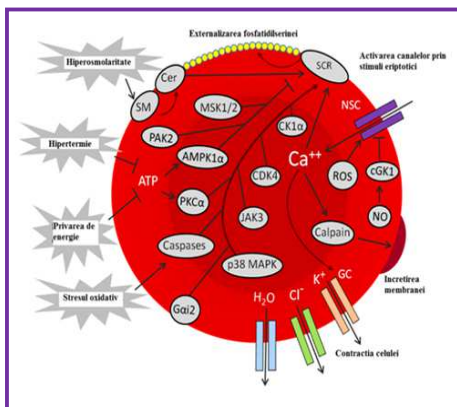
Transportul oxigenului legat de hemoglobină, în interiorul eritrocitului, (mai degrabă decât dizolvat în plasmă) permite ca sângele să rămână mai fluid și cu o capacitate mai mare de a transporta O₂. Eritrocitele majorității vertebratelor non-mamifere au nucleu (Cohen, 1982). La cele mai multe specii de mamifere, eritrocitele sunt lipsite de un nucleu și de alte organite, precum: mitocondriile, aparatul Golgi și reticulul endoplasmic. Absența mitocondriilor permite eritrocitelor să transporte mai mult O₂ și să nu consume oxigenul pe care îl transportă. Cu glucoza ca substrat principal, celulele se bazează pe glicoliza anaerobă, din care rezultă acidul lactic (Rapoport, 1968). Principala sursă de energie, în cazul eritrocitului, ca și al altor celule, este ATP-ul, necesar în special pentru transportul activ al ionilor prin membrana eritocitară, servind la menținerea gradientilor de concentrație ionică transmembranară (Jelkmann, 2012).

CAPITOLUL 2

Apoptoza eritrocitelor umane și rolul acestuia în menținerea homeostaziei

Apoptoza sau moartea celulară programată (MCP) este un proces de autodistrugere reglat genetic, al cărui fenotip cel mai frecvent este apoptoza, caracterizată printr-o serie de modificări stereotipice care afectează nucleul, citoplasma și membrana plasmatică conducând la dezmembrarea celulei și la digestia rapidă a acesteia de către macrofage sau alte celule învecinate (Slee *et al.*, 2001).

Figura 8. Mecanisme moleculare posibile care reglează eriptoza AMPK1 α : protein kinază 1 α activată de AMP; ATP: adozin trifosfat; CDK4: kinaza 4 dependentă de ciclină; Cer: ceramidă; cGK1: proteina kinaza 1 dependentă de cGMP; CK1 α : cazein kinaza 1 α ; G α 2: subunitate de proteină G; NSC: canal neselectiv de cationi; GC: Canalul Gardos; H₂O: apă; JAK3: kinaza janus 3; NO: oxid nitric; p38 MAK: protein kinaze activate de mitogenul p38; PAK2: p21 kinaza activată 2; PKC α : proteinkinaza C α ; PS: fosfatidilserină; ROS: specii reactive de oxigen; SCR: enzima de încrețire; SM: sfinngomielinază; (după Qadri, *et al.*, 2017).



Cercetarea românească a avut un rol esențial în descoperirea apoptozei eritrocitare și dezvoltarea acestei ramuri științifice. Prima discuție despre existența unui fenomen de apoptoză eritocitară a fost inițiată de Bratosin *et al.* (1999), evidențiindu-se că moartea programată a eritrocitelor umane este posibilă în

prezența influxului de Ca^{2+} . Este pentru prima dată când în literatura de specialitate se demonstrează că fagocitoza eritrocitelor îmbătrânite se datorează fenomenului de apoptoză. În 2001, Daugas *et al.*, propune utilizarea termenului de eritoptoză (*erythroptosis*) pentru procesul nou descoperit, iar în 2005, Lang *et al.*, vorbește despre eriptoză (*eryptosis*).

Eritrocitele mature pot suferi un proces de auto-distrugere rapidă care împărtășește câteva caracteristici cu apoptoza, incluzând contracția celulelor, microvezicularea membranei plasmatică, externalizarea fosfatidilserinei și conducând la dezintegrarea eritrocitelor sau, în prezența macrofagelor, la ingestia eritrocitelor moarte de către macrofage. Această formă a morții programate genetic este indusă de influxul de Ca^{2+} și prevenită de inhibitorii proteazelor cisteinice.

CAPITOLUL 3

Efecte ale apoptozei eritrocitare asupra unor dezechilibre homeostazice și patologii

Eritrocitele sunt celule extrem de sensibile și formează o componentă importantă a corpului uman ca indicator a stării de sănătate. În timpul inflamației, sistemică sau cronică, sistemul hematologic este expus în mod constant citokinelor proinflamatorii din circulație. Eritrocitele au o structură a membranei specializată și organizată, care interacționează și reacționează la acțiunile citokinelor.

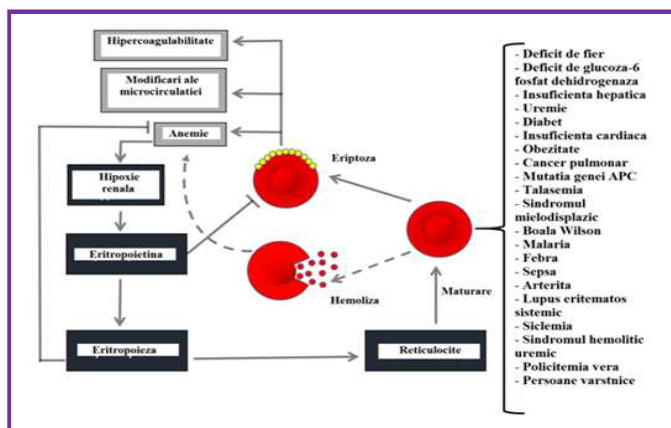


Figura 9. Homeostazia eritrocitară și semnificația clinică a eriptozei (după Qadri *et al.*, 2017).

Până în prezent, apoptoza eritrocitară a fost observată într-o mare varietate de afecțiuni clinice, precum: sepsa (Kempe *et al.*, 2007), sindromul hemolitic uremic (Lang P.A. *et al.*, 2006), insuficiența renală (Myssina *et al.*, 2003), malaria (Brand *et al.*, 2003), anemia hemoragică (Wood *et al.*, 1996), talasemia, deficiența de glucoză-6-fosfat dehidrogenază (G6PD) (Lang *et al.*, 2002), deficitul de fosfat

(Birka *et al.*, 2004), boala Wilson (Lang *et al.*, 2007), anemia feriprivă (Kempe *et al.*, 2006) și multe altele (figura 9).

Cea mai importantă afecțiune a eritrocitelor este anemia, definită ca o patologie în care concentrația hemoglobinei, hematocritul sau numărul de eritrocite sunt scăzute. Din punct de vedere clinic, anemia a fost în mare parte clasificată în trei etiologii fiziopatologice: 1) scăderea producției hematopoietică a eritrocitelor; 2) pierderea de sânge; 3) rata de distrugere crescută a eritrocitelor în circulația periferică. Categoria din urmă cuprinde, în primul rând, hemoliza mediată imun și non-imun (Janz *et al.*, 2013; Dharmarajan, 2008; Koury, 2014; Meulenbroek *et al.*, 2015).

CAPITOLUL 4

Bioingenierii eritrocitare. Abordări ale ingineriei genetice și ale ingineriei non-genetice

Dezvoltarea de produse biofarmaceutice reprezintă un domeniu larg și multidiscplinar. Cele mai multe produse biofarmaceutice sunt pe bază de proteine. Transportorii celulari, în special eritrocitele transportoare, sunt printre cele mai studiate sisteme de livrare datorită unor caracteristici unice pe care le au. Întrucât acești transportori sunt celule endogene, ele produc un răspuns antigenic mai slab sau chiar deloc iar în caz de îmbătrânire celulară, produsul transportat poate să fie metabolizat sau poate fi scos din circulație cu ajutorul macrofagelor, ca un proces natural complet. O altă caracteristică importantă a acestor transportori este aceea că pot fi depozitați la o temperatură de 4°C timp de mai multe ore până la câteva zile înainte de reintroducerea în organismul gazdă, în funcție de modul de stocare și metoda de încapsulare utilizată (Hamidi *et al.*, 2007).

Pe baza proprietăților intrinseci ale eritrocitelor s-au elaborat mai multe strategii pentru ingineria celulară a hematiei, care pot fi împărțite în abordări de inginerie genetică și abordări de inginerie non-genetică, astfel încât să fie create diferite sisteme de livrare pe bază de eritrocite. În plus, multe studii au creat particule de dimensiuni nanometrice acoperite cu membrane eritrocitare pentru a imita hematiile ca transportori inteligenți de medicamente (Han *et al.*, 2018). Sistemele de transport disponibile momentan sunt reprezentate de macromoleculele solubile precum anticorpi monoclonali, polimeri sintetici, polizadahide. Mai mult, ei includ structuri complexe precum microcapsule, microparticule, lipoproteine, lipozomi, „celule fantomă” sau celule. Datorită faptului că particulele legate de eritrocite rămân în circulația sanguină o perioadă lungă de timp, hematiile au fost studiate ca vehicule pentru transportul nanoparticulelor polimerice cu scopul de a evita eliminarea lor rapidă de către sistemul reticulo-endotelial. A fost demonstrat că particulele polimerice care sunt atașate la eritrocitele de șobolan prin legare necovalentă, au rămas în circulație peste 10 ore, iar când acestea nu s-au atașat la eritrocite, au fost eliminate în câteva minute. S-a obținut, de asemenea, îmbunătățirea timpului de menținere în circulație prin modificarea suprafeței particulelor cu PEG (Chambers & Mitragotri, 2007).

PARTEA A II-A

Cercetare personală

CAPITOLUL 5

Scopul și obiectivele cercetărilor

De aproape 15 ani conceptul de apoptoză într-o celulă lipsită de nucleu și organite așa cum este hematia umană, concept introdus și demonstrat de Bratosin și colaboratorii (Bratosin *et al.*, 2001; Bratosin *et al.*, 2002; Bratosin *et al.*, 2009) și numit eritroptoza (Daugas *et al.*, 2001) sau ulterior eritroptoza (Lang *et al.*, 2005) a deschis cercetări importante derulate într-o altă lumină decât cele anterioare, atât în hematologie cât și în biotehnologiile farmaco-medicale.

În acest context științific internațional, cercetările noastre s-au înscris pe 2 direcții majore, respectiv:

- a) cercetări fundamentale pentru:
 - înțelegerea mai bună a mecanismelor celulare și moleculare care au loc în patologia hematologică, respectiv implicarea apoptozei eritrocitare în anemii;
- b) cercetări cu caracter aplicativ pentru:
 - utilizarea eritrocitelor umane ca transportori de substanțe medicamentoase pentru îmbunătățirea modului de administrare al nanoparticulelor pentru imagistica medicală, sistemul eritrocitar de transport oferind biocompatibilitate și durată de viață lungă în circulație.

Cercetările noastre originale s-au axat pe:

1. Detectarea și evidențierea fenomenului de apoptoză eritrocitară în cazul diferitelor tipuri de anemii prin citometrie în flux și microscopie SEM cu scopul de a utiliza această tehnică ca metodă de diagnostic și clasificare a acestei patologii;
2. Evaluarea fragilității osmotice eritrocitare prin citometrie în flux și microscopie SEM pentru stabilirea condițiilor optime de obținere a unui sistem de transport eritrocitar prin metoda incubării în mediu hipotonic;
3. Încercări de obținere și caracterizare a hematiilor umane ca transportori de nanoparticule feroase pentru punerea pe piață a unor noi substanțe utilizate în imagistica medicală cu toxicitate și riscuri de inducere sau agravare a unor afecțiuni mult scăzute;
4. Înglobarea în eritrocitele umane a unei substanțe de contrast (Omniscan, substanță pe bază de gadoliniu) utilizată în prezent în diagnosticul imagistic MRI pentru eliminarea riscurilor crescute și a toxicității mari a agenților pe bază de gadoliniu (Gd);
5. Încercări de dezvoltare a unor sisteme adecvate de livrare a medicamentelor cu un număr mare de avantaje în contrast la administrarea convențională, respectiv, reducerea toxicității și a efectelor secundare adverse prin încapsularea acestora în hematii umane.

Ansamblul cercetărilor din această lucrare s-au desfășurat la Institutul de

Științe ale Vieții de la Universitatea de Vest „Vasile Goldiș” din Arad și la Institutul Național de Cercetare – Dezvoltare pentru Științe Biologice din București, conform Acordului de Colaborare Științifică și Parteneriat încheiat între cele două instituții.

Rezultatele obținute și prezentate în continuare sunt structurate pe 7 capitole la care se adaugă, referințele bibliografice și lista publicațiilor științifice rezultate în urma acestor cercetări (2 articole ISI în calitate de autor principal și 1 cerere de brevet național OSIM în calitate de prim autor).

CAPITOLUL 6

Material și metode

Metodele și tehnicile folosite în realizarea acestui proiect, sunt tehnici moderne, de finețe ridicată, conform standardelor cercetării occidentale și se bazează pe tehnici de biochimie, citometrie de flux, microscopie optică și electronică.

Aparatura de laborator utilizată pentru efectuarea experimentelor a constat în următoarele:

- citometrul FC 500 de la Beckman-Coulter;
- microscopul optic Olympus BX 43 cu cameră video Olympus XC 30;
- microscopul optic inversat MCX1600 fabricat în Austria;
- cameră foto cu răcire, Micro Publisher RTV 3 mp;
- microscopul electronic de scanare ESEM, Fei Quanta 250;
- microscopul electronic de tip FEI Tecnaî G2 Spirit TWIN / BioTWIN;
- centrifugă cu răcire, SIGMA 2-6 K;
- agitatoare, nișă chimică etc.

CAPITOLUL 7

Evaluarea apoptozei eritrocitare în anemii

Anemia reprezintă o problemă la nivel mondial care afectează pacienții de toate vârstele și este cea mai comună patologie a sângelui, (24,8% din populația lumii), având diverși factori etiologici. (WHO, 2008; Turner & Bhimji, 2018).

În ciuda progreselor cercetării privind cauzele anemiei, există încă incertitudini cu privire la modul în care aceasta ar trebui investigată, prevenită și gestionată. Aceasta reflectă limitările testelor de laborator, precum și înțelegerea slabă a mecanismelor fiziologice complexe. O mai bună înțelegere a naturii anemiei și a modificărilor în eritrocite poate oferi noi strategii pentru beneficiile pacienților.

În literatura de specialitate s-a discutat că, măsurarea individuală a hematiilor pe baza longevității acestora (spre deosebire de determinarea indicilor medii eritrocitari a întregii populații de celule) ar permite identificarea rapidă a subpopulațiilor circulante (Bratosin *et al.*, 1995; Bratosin *et al.*, 1996) sau, celulele hipocromice și / sau microcitare, deoarece acestea sunt produse de un eritron care

are deficit de fier (Schaefer & Schaefer, 1999).

S-au dezvoltat, de asemenea, metode de citometrie în flux pentru a determina volumul eritrocitului, fie prin măsurarea modificărilor rezistenței electrice (Kubitschek, 1960), fie prin măsurarea cantității de lumină dispersată de eritrocite individuale (Bratosin *et al.*, 1995; Bratosin *et al.*, 1996).

Pe baza tuturor celor menționate, ne-am propus:

- să analizăm prin citometrie în flux morfologia celulară a eritrocitului (prin măsurarea dispersiei luminii, în unghi de 180° și dispersia luminii în unghi de 90° (FSC și SSC) în corelare directă cu analiza SEM);
- să investigăm posibila perturbare a fenomenului de moarte celulară programată a eritrocitului în cazul anemiilor prin măsurarea gradului de externalizare a fosfatidilserinei (PS);
- să determinăm viabilitatea eritrocitului în anemie, conform metodei originale elaborate, cu Calceină-AM;

Cercetările noastre au fost realizate pe 22 de pacienți cu diferite forme de anemie, internați la Clinica de Hematologie din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență Arad. Diagnosticul de anemie a fost stabilit pe baza standardelor OMS, 2001. De asemenea s-a respectat protocolul de diagnostic și tratament în hematologie elaborate de Clinica de Hematologie din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență Arad.

Pacienții diagnosticați cu anemie au format 3 loturi, respectiv: 12 pacienți cu anemie feriprивă, 2 pacienți cu anemie hemolitică autoimună și 8 pacienți cu anemie plurifactorială. Pacienții incluși în studiu nu au fost evaluați după transfuzii cu masă eritocitară sau sânge integral, analizele fiind recoltate la internare. Lotul martor a inclus 8 subiecți practic sănătoși.

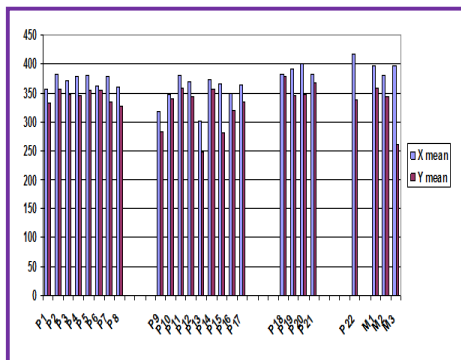
Estimarea viabilității celulare prin măsurarea absorbției și difuziei luminii sau analiza directă în sistem FSC/SSC (light scatter measurements) este o analiză biparametrică deosebit de simplă și sensibilă. În funcție de acești parametri (FSC/SSC) se poate face analiza unei populații celulare eritrocitare și se obține o citogramă de tipul „dot-plot” (Bratosin *et al.*, 1995, Bratosin *et al.*, 1996). În acest caz, fiecare punct reprezintă un eritrocit, pe abscisă fiind reprezentată talia celulară (FSC) iar pe ordonată, refringența sau conținutul celular (SSC).

În funcție de acești parametri (FSC/SSC) se poate face analiza unei populații celulare eritrocitare și se obține o citogramă de tipul „dot-plot” (Bratosin *et al.*, 1995, Bratosin *et al.*, 1996). În acest caz, fiecare punct reprezintă un eritrocit, pe abscisă fiind reprezentată talia celulară (FSC) iar pe ordonată, refringența sau conținutul celular (SSC).

Analiza prin citometrie în flux în sistem FSC/SSC a evidențiat schimbări morfologice semnificative la toți cei 22 de pacienți comparativ cu celulele martor .

Valorile pentru XMean, proporționale cu diametrul celular, au variat foarte mult în rândul pacienților (figura 37), în funcție de tipul de anemie, de la 301 (pacientul P13) la 417 (pacientul P22) comparativ cu cel pentru eritrocitele normale (o medie de 388 ± 8). În același mod, valorile pentru YMean, proporționale cu granularitatea internă, au variat de la 249 (pacientul P13) la 368 (pacientul P21) comparativ cu cel pentru RBCs normale, adică 321 ± 43 (figura 37).

Figura 37. Histograma valorilor XMean și Ymean pentru eritrocitele la subiecții din lotul martor (M1-M3), pacienților cu anemie plurifactorială, sindrom anemic sau fără diagnostic clar stabilit (P1-P8), anemie severă cu deficit de fier (P9-P17), anemie hemolitică (P18-P21) și anemie macrocitară (P22).



Talia eritrocitelor din lotul diagnosticat cu anemie feriprivă a fost mai mică în comparație cu lotul martor, iar conținutul celular a fost redus. Acest fapt este explicabil prin cantitatea redusă de hemoglobină la pacienții cu anemie feriprivă.

De asemenea, s-a observat că valorile YMean au fost compatibile cu nivelurile de Hb determinate biochimic.

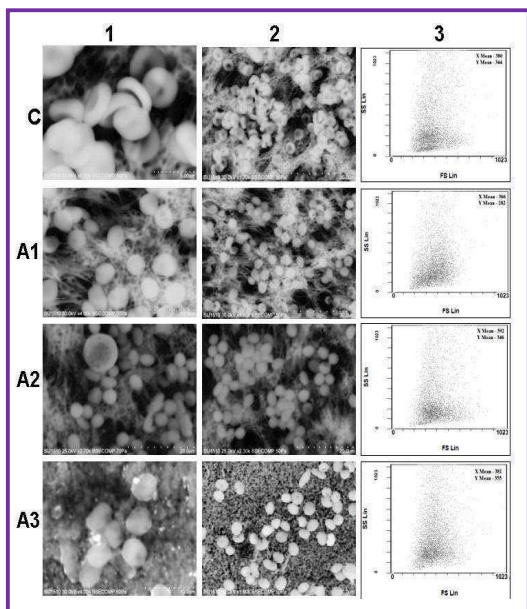


Figura 39. Analiza prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) (1, 2) și analiza dot-plot (3) a eritrocitelor normale (C) și a eritrocitelor din diferite tipuri de anemii. A1: pacient de sex masculin, 65 ani diagnosticat cu anemie feriprivă severă, A2: pacient de sex feminin, 71 ani diagnosticat cu anemie hemolitică autoimună; A3: pacient de sex feminin, 60 de ani cu sindrom anemic sever cu etiologie nespecificată. Datele prezentate sunt reprezentative pentru rezultate similare

În figura 39 este prezentată o primă analiză prin SEM a eritrocitelor provenite de la pacienți cu anemii comparativ cu analizele prin citometrie în flux. Aceasta a evidențiat modificări morfologice semnificative la toți cei 22 de pacienți comparativ cu celulele martor.

Citogramele obținute și analizate prin tehnica celor 4 cadrane și analiza

externalizării de PS la hematitele provenind de la pacienții cu anemii sunt prezentate sintetic în figura. 40.

Rezultatele obținute pentru eritrocitele de la pacienții cu diferite tipuri de anemii nu au demonstrat o externalizare masivă de PS, măsurabilă cu Anexină V-FITC, comparativ cu valorile obținute pentru eritrocitele normale.

Dacă în cazul eritrocitelor normale, procentul de eritrocite pozitive la anexină variază între $0,5\% \pm 0,2\%$, în cazul anemiei, procentul a fost similar sau cel mult 2,1% pentru eritrocitele de la un pacient cu anemie feriprivă severă (figura 40).

Figura 40. Analiza prin tehnica cadranelor prin citometrie de flux a expunerii la fosfatidilserină (testul Annexin-V) a eritrocitelor din diferite tipuri de anemii în comparație cu eritrocitele normale(C). A1: pacient de sex masculin, 65 ani diagnosticat cu anemie feriprivă severă, A2: pacient de sex feminin, 71 ani diagnosticat cu anemie hemolitică autoimună, A3: pacient de sex feminin, 60 de ani cu sindrom anemic sever cu etiologie nespecificată. FL1: fluorescență annexină-V-FITC. FL2: autofluorescență roșie. Cadranelor inferioare stânga: celule viabile anexină-V negative; cadranelor inferioare drepte: celule Annexin-V pozitive. %: procente din diferite regiuni cu intensitate variabilă a fluorescenței. Numărul de celule numărate: 10.000. Datele prezentate sunt reprezentative pentru rezultate similare.

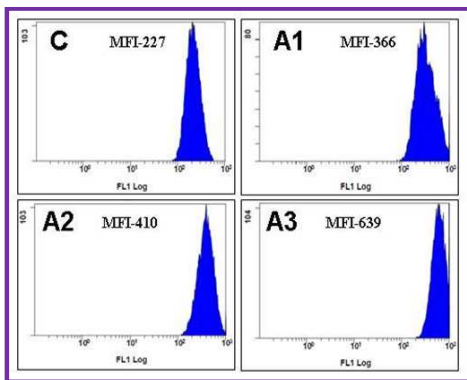
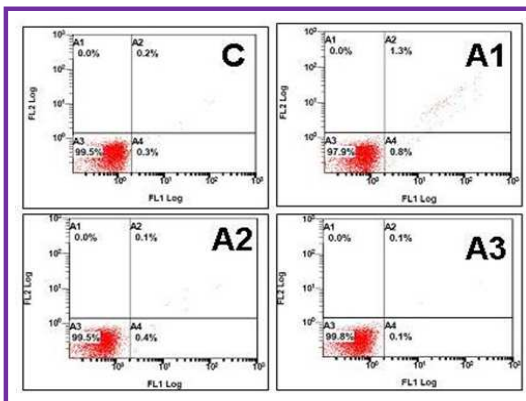


Figura 41. Analiza prin CMF a activității esterazelor celulare (testul de viabilitate calceină-AM) a eritrocitelor normale (C) și a eritrocitelor din diferite tipuri de anemii. A1: pacient de sex masculin, 65 ani diagnosticat cu anemie feriprivă severă, A2: pacient de sex feminin, 71 ani diagnosticat cu anemie hemolitică autoimună; A3: pacient de sex feminin, 60 de ani cu sindrom anemic sever cu etiologie nespecificată. Numerele

reprezintă valorile medii de fluorescență (MFI). Numărul de celule numărate: 10.000. Datele prezentate sunt reprezentative pentru rezultate similare.

Măsurarea viabilității eritrocitelor este foarte dificilă, această celulă fiind lipsită de nucleu și organite. În 2005, a fost dezvoltat un nou test prin citometrie în flux pentru măsurarea viabilității hematiilor utilizând Calceină-AM (Bratosin *et al.*, 2005).

Viabilitatea eritrocitelor de la toți cei 7 pacienți cu anemie de etiologie nespecificată (origine necunoscută), MFI a fost de asemenea mai mare decât MFI pentru eritrocitele de control, variind între MFI-502 și MFI-697.

Rezultatele obținute sunt originale și pot fi sintetizate după cum urmează:

a) Aplicarea analizei directe prin citometrie în flux în sistem FSC/SSC a hematiilor provenind de la diferite tipuri de anemie permite:

- identificarea modificărilor de morfologie reflectată în aspectul dot-plot-ului clasic sau în density-plot;
- cuantificarea modificărilor de talie eritocitară exprimată prin valoarea medie XMean, respectiv a microcitozei;
- cuantificarea conținutului celular prin valori YMean, permite măsurarea conținutului de Hb (valorile YMean au fost compatibile cu nivelurile de Hb determinate biochimic) ceea ce permite posibilitatea înlocuirii determinării cantității de Hb pentru scop diagnostic cu o analiză mult mai simplă, rapidă și fără costuri ridicate de reactivi.

b) Modificările de morfologie eritocitară observate prin citometrie în flux au fost confirmate și corelate cu observațiile de microscopie optică și electronică de scanare. În majoritatea cazurilor la pacienții diagnosticați cu anemii, imaginile obținute atât cu ajutorul microscopului optic cât și a celui electronic cu baleiaj, au prezentat eritrocite mai mici decât în cazul lotului martor cu subiecți aparent sănătoși.

c) Rezultatele obținute prin citometrie în flux pentru eritrocitele de la pacienții cu diferite tipuri de anemie nu au demonstrat o externalizare masivă a fosfatidilserinei măsurabile cu Annexina-V-FITC în comparație cu valorile pentru eritrocitele normale.

d) Viabilitatea eritocitară măsurată prin nivelul activității esterazelor intracelulare cu Calceină-AM a evidențiat o medie a intensității fluorescenței (MFI al calceinei) eritrocitelor mai mare la subiecții cu anemie față de lotul martor. În cazul anemiilor, rata de eritropoieză este crescută pentru compensarea pierderii hematiilor. Astfel, în circulație există un număr mare de eritrocite tinere la pacienții cu anemii, comparativ cu persoanele normocitare, fapt care ar putea explica valorile crescute ale MFI la probele pacienților cu anemii. Aceste rezultate neașteptate sunt în acest moment dificil de interpretat, cu atât mai mult cu cât nu este elucidat rolul esterazelor din interiorul hematiilor. Toate aceste aspecte rămân a fi investigate în continuare.

e) Rezultatele obținute pledează în favoarea aplicării analizei prin citometrie în flux (CMF analizează celulele individual oferind informații despre talia, morfologia și structura acestora) ca o metodă rapidă și eficientă pentru diagnosticarea și caracterizarea anemiilor precum și în monitorizarea bolnavilor în timpul tratamentului și după tratament.

f) Eficiența utilizării citometriei în flux pentru diagnosticul anemiilor a fost dovedit atât la nivel general (pe loturi de pacienți) cât și individual (trei prezentări individuale de caz), fiecare diagnostic stabilit clinic fiind confirmat.

g) De asemenea, analiza prin citometrie în flux poate constitui o metodă importantă în industria biotehnologiei medicale pentru dezvoltarea de medicamente pentru tratarea anemiei.

CAPITOLUL 8

Evaluarea comportamentului osmotic al eritrocitelor umane pentru aplicații biotehnologice de transportori celulari

Hematiile își păstrează forma și caracterul neschimbate, atât în plasmă cât și în serul sanguin. Dacă sunt introduse în soluții ce conțin săruri aflate în altă concentrație decât cea existentă în plasmă sau ser, ele își modifică mai ales forma. În soluții hipotone se ajunge până la eritroliză, în urma căreia hemoglobina trece în lichidul înconjurător.

În vederea folosirii eritrocitelor umane ca transportori de nanoparticule și/sau substanțe biologic active prin incapsulare intracelulară ne-am propus determinarea fragilității osmotice pentru determinarea condițiilor optime de lucru. Pentru aflarea rezistenței eritrocitelor s-a determinat rezistența lor la soluții saline hipotone, conform metodei descrisă de Barshtein (după Barshtein, 2014) și caracterizarea prin metode de citometrie în flux și microscopie electronică de scanare (SEM).

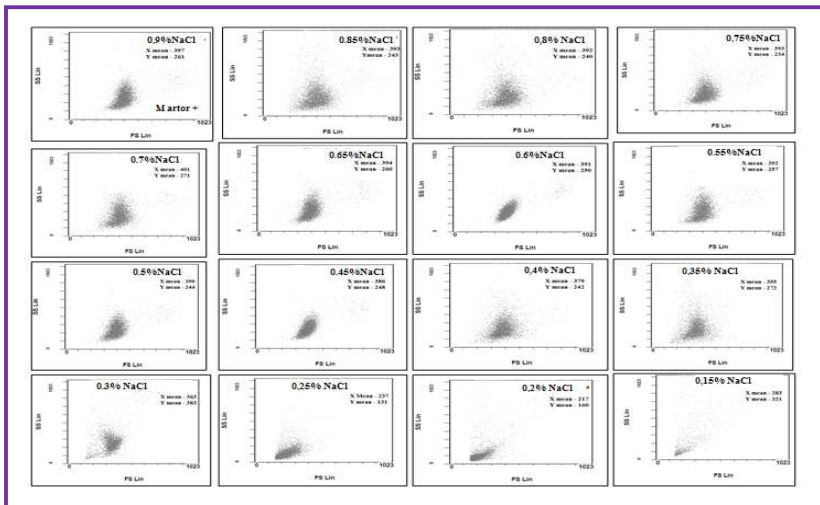


Figura 42. Analiza prin CMF în sistem FSC/SSC (talie celulară/conținut celular) a populației eritrocitare incubată în diferite diluții de medii hipotone (soluții de NaCl).

Estimarea modificărilor morfologice celulare prin măsurarea absorbției și difuziei luminii sau analiza directă în sistem FSC/SSC (*light scatter measurements*) este o analiză biparametrică deosebit de simplă și sensibilă

permițând evidențierea de populații cu aceeași morfologie și chiar cuantificarea modificărilor prin interpretarea valorilor XGeoMean și YgeoMean. De o manieră comparativă, rezultatele modificărilor de morfologie sub acțiunea soluțiilor hipotonice sunt prezentate în figura 42.

În urma centralizării rezultatelor obținute s-a observat că începând cu diluția 0,3% NaCl s-au obținut variații mari ale valorilor parametrilor Xmean și Ymean, fapt care sugerează eritroliza, începând cu această diluție. Cele mai mari valori ale taliei și refringenței celulare au fost obținute la diluția 0,55% NaCl, după aceasta, talia și refringența celulară încep să scadă (figura 44). Putem afirma că la diluția de 0,55% NaCl, eritrocitul are volumul maxim, moment după care, membrana acestuia se rupe, aparând în suspensie fragmente eritrocitare, care prin aglutinare sunt recunoscute ca evenimente cu talie mai mare decât în cazul eritrocitelor din soluția izotonă de NaCl (0,9%).

Analiza la microscopul electronic de scanare arată în special celule normale pentru eritrocitele control (M+), în soluție izotonă de NaCl 0,9%, având formă biconcavă, remarcându-se totuși și prezența unor sferocite și echinocite, în număr redus, ceea ce confirmă și rezultatele obținute la evaluarea prin citometrie de flux, atât la analiza SSC/FSC cât și la marcarea celulelor cu Anexină V și Calceină-AM.

În cazul eritrocitelor suspendate în diferite medii hipotone, celulele au o morfologie aparent normală și nu prezintă diferențe semnificative fata de celulele martor; majoritatea eritrocitelor având o formă discoidală, biconcavă, cu apariția unor rare echinocite (diluție hipotonică de la 0,85% la 7%).

MFI-ul reprezintă, în cazul celulelor nemarcate cu fluorocromi, autofluorescența celulei. În histogramele prezentate în figura 46, acest parametru are o valoare descrescătoare, de la eritrocitele incubate în soluție izotonă de NaCl (0,9%), unde $MFI = 0,477$, ajungând ca în cazul eritrocitelor incubate în soluție hipotonă cu concentrația de 0,45% NaCl, la un $MFI = 0,68$. Rezultatele pot fi explicate prin pierderea treptată a hemoglobinei din eritrocitele supuse la scăderea treptată a osmolarității soluției de NaCl, prin difuzia apei în celulă, creșterea volumului și tensionarea membranei eritrocitare cu formare de pori.

Rezultatele cercetărilor noastre au demonstrat că:

a) Tehnica citometriei în flux reprezintă o tehnică rapidă și mai ușoară decât metodele convenționale pentru determinarea comportamentului osmotic al eritrocitelor, meritând investigații ulterioare.

b) Prin utilizarea acestei tehnici am obținut informații importante despre fragilitatea osmotică a eritrocitului uman și în special în evaluarea formei eritrocitelor (cuantificabilă prin XMean-uri obținute în FSC) și s-a putut confirma umflarea eritrocitelor. În urma testării fragilității osmotice eritrocitare s-a observat că începând cu diluția 0,3% NaCl rezultatele nu mai sunt elocvente, variațiile apărând datorită degradării eritrocitelor aflate într-un mediu hipoton. Atât talia celulelor cât și refringența citoplasmatică au o ușoară tendință ascendentă până la soluția de 0,7% NaCl iar apoi urmează o stagnare, fapt ce sugerează intrarea soluției hiposmolare de NaCl în interiorul hematiei, determinând creșterea în volum a acesteia.

c) S-a putut stabili intervalul osmotic optim de încărcare a hematiilor în

vederea transformării acestora în transportori de nanoparticule și/sau medicamente.

d) În cazul determinării autofluorescenței verde (FL1) sau roșie (FL2), autofluorescențe conferite de cantitatea și starea de oxidare a Hb, hematiile supuse testului de rezistență osmotică, începând cu diluția 0,3%, au dat rezultate mai puțin concludente, degradarea hematiilor fiind mare, datorită incubării lor într-un mediu hipoton.

e) Determinarea viabilității eritrocitare cu Calceină-AM se dovedește și în acest caz un test sensibil și util în aprecierea stării funcționale a celulelor.

f) Determinarea expunerii de resturi de PS (ca marker de fagocitoză și de scoatere a acestora din circulație in vivo) la suprafața eritrocitelor supuse șocului osmotic reprezintă un test de valoare în aprecierea calității hematiilor transporter pentru obținerea unor produse cu durata de viață crescută in vitro.

CAPITOLUL 9

Utilizarea hematiilor umane ca transportori de nanoparticule feroase - obținere și caracterizare

Citogramele în sistem FSC/SSC pentru nanoparticulele utilizate cât și pentru eritrocitele în soluție de 0,9% NaCl (martor eritrocitar de neînglobare a nanoparticulelor) sunt prezentate în figura 52. Așa cum se observă, din poziția nanoparticulelor în citograma FSC/SSC, ele se plasează în zona din stânga a citogramei, zonă cu dimensiune mică, ceea ce ne-a permis crearea unei regiuni de excludere R1 în citogramele analizate. În acest fel rezultatele obținute sunt de o acuratețe mai mare, artefactele și semnalele de fond fiind eliminate în mare măsură.

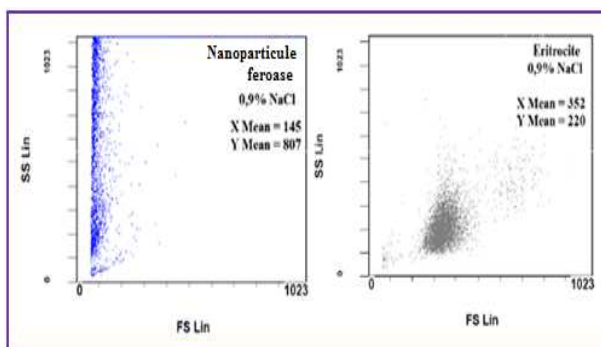


Figura 52. Analiza prin CMF în sistem FSC/SSC pentru nanoparticulele feroase (citograma din stânga) și a eritrocitelor martor de neînglobare în soluție de 0,9% NaCl.

Diluția hipotonică a fost prima metodă investigată și utilizată pentru încapsularea substanțelor chimice în eritrocite și această metodă este cea mai simplă și cea mai rapidă. Un volum de eritrocite preparate a fost diluat cu 2-20 volume de soluție apoasă de nanoparticule. Soluția a fost apoi refăcută prin adăugarea unui tampon hipertonic. Amestecul rezultat a fost apoi centrifugat și sedimentul a fost spălat cu soluție tampon izotonă.

Eritrocitele au fost dializate în prezența nanoparticulelor pe bază de fier, în soluții saline, în concentrații descrescătoare, în condiții sterile, prin incubare timp de 4 ore la temperatura camerei pe un agitator. Eritrocitele încărcate au fost recuperate prin centrifugare la 400 g și spălate de 3 ori cu soluție izotonă pentru a îndepărta rezidurile. Urmând aceeași procedură, s-au preparat eritrocite fără nanoparticule, cu excepția faptului că au fost dializate în absența materialului feros.

În cadrul acestui studiu, atenția noastră s-a concentrat asupra posibilității de a încapsula nanoparticule magnetice noi pe bază de fier cu diferite caracteristici structurale și morfologice care sunt preferențial internalizate în eritrocitele umane prin porii deschiși ai membranelor fără a afecta viabilității celulelor.

Din analiza rezultatelor obținute se observă că este posibilă încapsularea nanoparticulelor pe bază de fier într-un mediu hipoton, concentrația optimă de soluție salină fiind în jur de 0,7% NaCl – 0,5 % NaCl. La această concentrație, analiza SEM a arătat și confirmat menținerea caracteristicilor morfologice ale eritrocitelor purtătoare de nanoparticule

S-a observat că prezența nanoparticulelor, nu produce moarte celulară, dimpotrivă, chiar o aparentă ușoară creștere a viabilității eritrocitare, probabil printr-un mecanism de activare enzimatică a esterazelor intraeritrocitare, fenomen biochimic ce urmează a fi studiat în detaliu.

Determinarea gradului de apoptoză a evidențiat un ușor efect de inducere a apoptozei eritrocitare sub influența nanoparticulelor, procentul fiind aproape dublu, fără a demonstra un puternic caracter toxic, știut fiind că procentul de celule apoptotice in vivo este de $1\% \pm 0,5$.

Analiza EDX (raze X cu dispersie energetică) permite determinarea compoziției elementale la scală microscopică în timpul interacțiunilor inelastice dintre fasciculul incident electronic și materia care urmează a fi analizată cu ajutorul microscopului electronic de baleiaj

Analiza EDX a eritrocitelor native comparativ cu eritrocitele dializate în prezența nanoparticulelor feroase în diferite soluții de diluții saline hipotonice a permis evaluarea celor mai bune diluții pentru încapsulare.

Se remarcă faptul că eritrocitele native, luate ca spectru de control, nu conțin urme de fier. Determinarea a fost efectuată pe 10 eșantioane diferite. Analiza celor 20 de probe de eritrocite incubate cu nanoparticule pe bază de Fe la diluție izotonă, 0,9%, a arătat că o compoziție procentuală de fier variază între un minim de 10,24% și un maxim de 43,00%, cu o medie de 19,57%, ceea ce denotă o încapsulare de nanoparticule feroase în celule.

Pentru eritrocitele din diluția hipotonă de 0,7%, incubate cu nanoparticule, compoziția procentuală pentru fier a variat de la un minim de 8,14% și un maxim de 69,25%, cu o medie de 38,58%, ceea ce arată o încapsulare superioară a nanoparticulelor feroase în hematii, în concordanță cu rezultatele obținute la restul testelor.

La analiza eritrocitelor din diluțiile saline hipotone, 0,45% în prezența nanoparticulelor feroase, compoziția procentuală a fierului variază de la un minim de 6,31% și un maxim de 41,94%, cu o medie de 16,35%, ceea ce arată o

încapsularea mai mică comparativ cu cea anterioară.

Hematiile incubate cu nanoparticule la diluția de 0,3%, compoziția procentuală pentru fier variază de la minimum 7,15% și maximum 26,62%, cu o medie de 18,58%, ceea ce arată o încapsulare similară celei obținute la diluția de 0,45%.

Eficiența procedurii de încapsulare a fost, de asemenea, dovedită de imaginile TEM care demonstrează în mod clar prezența intracelulară a nanoparticulelor de fier, confirmând eficiența procedurii de încapsulare și o distribuție uniformă a nanoparticulelor pe bază de fier în întreaga citoplasmă a celulei, fără acumulare în membrana eritrocitară.

În cazul probei de eritrocite incubate cu nanoparticule feroase în soluție de 0,7% NaCl, se observă, la nivelul membranei eritrocitare difuzia nanoparticulelor.

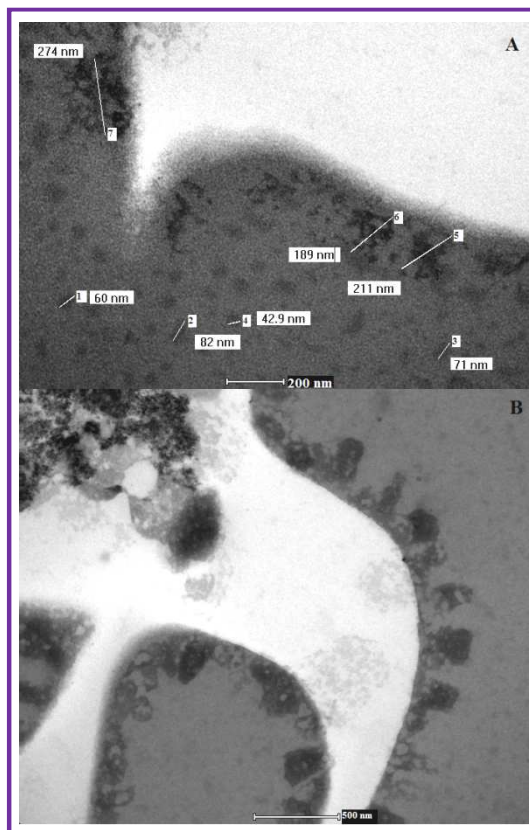


Figura 69. Analiza prin microscopie electronică de transmisie (TEM) a captării nanoparticulelor în eritrocite la o diluție de 0,7% NaCl (diluție hipotonă) și difuzia nanoparticulelor prin membrana celulară. A - 43 kx mărire, B - mărire 26500x

Așa cum era de așteptat în urma analizei citometrice, la aceasta diluție hematiile înglobează nanoparticule de oxid de fier.

Rezultatele procedurii de încărcare utilizate în acest studiu sunt diferite de cele descrise de alți autori (Brähler *et al.*, 2006) care au încapsulat nanoparticule de fier. În eritrocitele lor, nanoparticulele de fier sunt atașate puternic la membrana externă, fapt care reprezintă o restricție pentru utilizarea acestor eritrocite încărcate, in vivo deoarece supraviețuirea lor în fluxul sanguin ar putea fi compromisă, fiind predispuse la degradare de către macrofage.

În concluzie, există încrederea că aceste noi nanoparticule pe bază de Fe care au fost testate ar putea conduce la utilizarea lor în asociere cu eritrocitele, sub formă de substanțe de contrast intravasculare promițătoare pentru aplicații biomedicale în imagistică.

CAPITOLUL 10

Încapsularea de nanoparticule feroase în eritrocite utilizând medii speciale de conservare a sângelui (SAGM și PAGGSM) - obținere și caracterizare

O provocare semnificativă în obținerea transportorilor eritrocitari este asociată cu îmbunătățirea comportamentului (duratei) lor de viață in vivo. Eficacitatea lor este de multe ori compromisă datorită metodei de obținere, ceea ce poate diminua durata de viață și poate conduce la recunoașterea lor ca „non-self” de către sistemul reticuloendotelial (RES) al organismului, o dată cu injectarea intravenoasă a acestora.

Pentru aceste considerente, ne-am propus întreprinderea unor studii de înglobare (încapsulare) a nanoparticulelor feroase utilizând medii hipotonice plecând de la medii aditive utilizate în centrele de transfuzii pentru conservarea concentratului eritrocitar SAGM și PAGGSM. Prin compoziția lor am emis ipoteza că acestea vor asigura o mai bună conservare atât a morfologiei cât și a structurii și funcțiilor eritrocitare.

În urma studiilor comparative de înglobare a nanoparticulelor în eritrocite în medii hipotone plecând de la mediile aditive de conservare a CE în centrele de transfuzii pentru ameliorarea condițiilor de obținere a transportorilor eritrocitari, comparativ cu cercetările efectuate utilizând diluții hipotone de soluții de NaCl, se desprind următoarele concluzii:

În urma evaluării in vitro a calității transportorilor eritrocitari obținuți prin utilizarea mediilor de conservare a hematiilor SAGM și PAGGSM nu s-a observat o ameliorare importantă datorită complexității mediilor, respectiv prezența de dextroza, adenina, guanina, manitol, așa cum era de așteptat.

Deși mai complet, conținând guanozină, mediul PAGGSM s-a dovedit cel mai puțin adecvat obținerii de medii hipotone pentru încapsulare de nanoparticule.

În aceste condiții se impun studii suplimentare pentru utilizarea mediilor de conservare a concentratului eritrocitar, atât in vitro cât și in vivo pentru determinarea duratei de viață a transportorilor eritrocitari obținuți și corelarea acestor rezultate cu examene de microscopie electronică SEM și TEM.

CAPITOLUL 11

Înglobarea în eritrocite a unei substanțe de contrast utilizată în diagnosticul imagistic

Imagistica prin rezonanță magnetică (IRM) este o tehnică medicală imagistică neinvazivă, foarte frecvent utilizată în medicina clinică pentru a vizualiza structura și funcția țesuturilor, IRM este în măsură să furnizeze imagini anatomiche de înaltă rezoluție, prin utilizarea agenților de contrast care îmbunătățesc diferențierea țesutului malign de cel sănătos (Reimer & Tombach, 1998). Pentru aceste motive, IRM are multe aplicații clinice în medicina cardiovasculară, inclusiv leziunea miocardică, ateroscleroza și alte afecțiuni vasculare (Waters & Wickline, 2008).

Gadoliniul (Gd) este un element chimic, catalogat ca metal rar, cu numărul de ordine 64 în tabelul periodic al elementelor. Imagistica prin rezonanță magnetică nucleară se bazează pe câmpul magnetic generat de molecule de apă din organismul uman. Când este injectat în corp, Gd interacționează cu molecula de apă. În urma interacțiunii, moleculele de apă vor emite un semnal semnificativ mai puternic, contribuind la obținerea imaginilor de rezonanță magnetică nucleară mai clare.

Aceste molecule au însă tendința a fi nespecifice, arătând o extravazare rapidă în interstițiu și sunt excretate rapid prin rinichi ($t_{1/2} \sim 1,5$ ore), permițând astfel doar achiziția de imagini în ferestre scurte de timp. Mai mult, chelații de Gd pot induce riscul de insuficiență renală acută după administrarea la pacienții cu patologii renale și care prezintă factori de risc renal, precum: vârsta înaintată, valoarea inițială redusă a clearance-ului creatininei, nefropatie diabetică și niveluri scăzute de hemoglobină și albumină (Ergun *et al.*, 2006; Kuo *et al.*, 2009).

Probele incubate cu Omniscan prezintă valori mai mici ale parametrilor obținuți prin citometrie în flux comparativ cu probele cu eritrocite fără gadodiamidă, probabil datorită interferențelor date de încărcarea hematiilor cu substanța de contrast dar și de degradarea celulelor aflate în soluții hipotone.

Datorită riscului pentru insuficiență renală pe care îl prezintă chelații de gadolinu (clasă din care face parte și Omniscanul) precum și al timpului scurt de înjumătățire, substanțele de contrast utilizate în imagistica prin rezonanță magnetică ar putea fi încapsulate în eritrocite pentru a le scădea toxicitatea și a le crește eficiența. Cu toate acestea rezultatele obținute nu sunt suficiente pentru a preciza clar că Omniscanul poate fi înglobat eficient în eritrocite. Sunt necesare teste suplimentare de viabilitate eritrocitară cu Anexină-V-FITC și Calceină-AM pentru evaluarea citotoxicității acestei substanțe de contrast la nivelul hematiilor.

CAPITOLUL 12

Înglobarea albuminei marcate cu FITC în eritrocite

Pentru a pune în evidență capacitatea eritrocitelor de a încapsula particule mici și molecule, atunci când se află într-o soluție hipotonă, am continuat seria experimentelor cu albumină marcată cu FITC.

Albumina-FITC prezintă o fluorescență verde, fapt care o face ușor detectabilă prin citometrie în flux în FL1. Analizele de citometrie în flux au fost realizate exact ca în cazul nanoparticulelor feroase.

Eritrocitele folosite pentru înglobarea de albumină-FITC au fost în prealabil incubate în soluție de 1% albumină nemarcată, pentru saturarea situsurilor de legare de pe suprafața membranei eritrocitare, cunoscuta fiind proprietatea albuminei de atașare la suprafața celulei. Ulterior eritrocitele au fost incubate cu albumina-FITC la o concentrație de 2 mg/ml, în diferite soluții hipotone de NaCl pornind de la un mediu izoton de NaCl 0,9%, așa cum au fost descrise în capitolul Material și metode și la capitolele de cercetări privind încapsularea unor nanoparticule pe bază de fier.

Pentru probele de eritrocite incubate cu albumină-FITC s-a efectuat o analiză de microscopie optică (figura 88A) și la microscopul optic cu fluorescență (figura 88B), ceea ce a permis evidențierea clară a înglobării albuminei-FITC în interiorul celulelor.

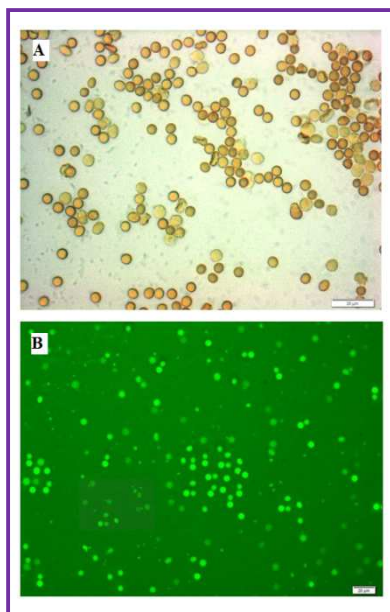


Figura 88. Analiza prin microscopie optică în contrast de fază - 20x (A) și microscopie de fluorescență -10x (B) a eritrocitelor incubate cu albumină-FITC în 0, 0,65 % NaCl.

În urma cercetărilor derulate în vederea înglobării de albumină-FITC, ca model de stabilire a condițiilor de lucru și a metodologiei de evidențiere a încărcării acesteia în eritrocite se pot rezuma următoarele:

- Înglobarea moleculelor de albumină-FITC prin metoda mediilor hipotone se dovedește utilă și pentru înglobarea de molecule farmaceutice;

- Randamentul cel mai bun s-a obținut la medii hipoosmotice de la 0,7%NaCl până la 0,5% NaCl, asemănător celor pentru înglobarea de nanoparticule.
- Analiza prin citometrie în flux s-a dovedit adecvată evidențierii încapsulării de molecule fluorescente, fiind în acord și confirmată de rezultatele obținute prin microscopie de fluorescență.

CONCLUZII GENERALE

Din ansamblul rezultatelor obținute de noi, conform scopului și obiectivelor formulate, așa cum au fost prezentate în capitolul 5, reies următoarele concluzii generale care au caracter de noutate și originalitate:

1. Cercetările efectuate pentru înțelegerea mai bună a mecanismelor celulare și moleculare care au loc în patologia hematologică, respectiv implicarea apoptozei eritrocitare în anemii, au demonstrat:

a. Aplicarea analizei directe prin citometrie în flux, în sistem FSC/SSC a hematiilor provenind de la diferite tipuri de anemii a permis:

- i.** identificarea modificărilor de morfologie reflectată în aspectul dot-plot-ului clasic sau în density-plot,
- ii.** cuantificarea modificărilor de talie eritrocitară exprimată prin valoarea medie XMean, respectiv a microcitozei,
- iii.** cuantificarea conținutului celular prin valori YMean, permite măsurarea conținutului de Hb (*valorile YMean au fost compatibile cu nivelurile de Hb determinate biochimic*) ceea ce permite posibilitatea înlocuirii determinării cantității de Hb pentru scopul diagnostic cu o analiză mult mai simplă, rapidă și fără costuri ridicate de reactivi.

b. Modificările de morfologie eritrocitară observate prin citometrie în flux au fost confirmate și corelate cu observațiile de microscopie optică și electronică de scanare. În majoritatea cazurilor la pacienții diagnosticați cu anemii, imaginile obținute atât cu ajutorul microscopului optic cât și a celui electronic cu baleiaj, au prezentat eritrocite mai mici decât în cazul lotului martor cu subiecți aparent sănătoși;

c. Pentru diferitele tipuri de anemii luate în studiu rezultatele obținute prin citometrie în flux nu au demonstrat o externalizare masivă de fosfatidilserină măsurabilă cu Annexina-V-FITC în comparație cu valorile pentru eritrocitele normale;

d. Viabilitatea eritrocitară măsurată prin nivelul activității esterazelor intracelulare cu Calceină-AM a evidențiat o medie a intensității fluorescenței (MFI) al calceinei eritrocitelor mai mare la subiecții cu anemie față de lotul martor, explicabilă prin rata de eritropoieză crescută pentru compensarea pierderii hematiilor, în circulație existând un număr mare de eritrocite tinere la pacienții cu anemii, comparativ cu persoanele normocitare. Toate aceste aspecte rămân a fi investigate în continuare;

e. Per ansamblu, rezultatele obținute pledează în favoarea aplicării analizei prin citometrie în flux (CMF analizează celulele individual oferind informații despre talia, morfologia și structura acestora) ca o metodă rapidă și eficientă pentru

diagnosticarea și caracterizarea anemiilor precum și în monitorizarea bolnavilor în timpul tratamentului și după tratament;

f. De asemenea, analiza prin citometrie în flux poate constitui o metodă importantă în industria biotehnologiei medicale pentru dezvoltarea de medicamente pentru tratarea anemiei.

2. Studiile de determinare a rezistenței eritrocitelor efectuate cu soluții saline hipotone și analizate prin metode de citometrie în flux și microscopie electronică de scanare (SEM) au permis:

a. Obținerea de informații importante în evaluarea formei eritrocitelor (cuantificabila prin XMean-uri obținute în FSC) și s-a putut confirma umflarea eritrocitelor fiind stabilit intervalul osmotic optim de încărcare a hematiilor în vederea transformării acestora în transportori de nanoparticule și/sau medicamente, cele mai bune rezultate pentru încapsularea de nanoparticule și molecule în eritrocit obținându-se pentru soluții variind între 0,7% și 0,5% NaCl;

b. În urma evaluării fragilității osmotice eritrocitare s-a observat că hematiile sunt lizate începând cu soluția hipotonă de 0,45% NaCl iar la diluția de 0,3% NaCl, eritrocitele sunt aproape integral lizate;

c. Determinarea expunerii de resturi de PS (ca marker de fagocitoză și de scoatere a acestora din circulație *in vivo*) la suprafața eritrocitelor supuse șocului osmotic reprezintă un test de valoare în aprecierea calității hematiilor transporter pentru obținerea unor produse cu durată crescută *in vivo*;

d. Tehnica citometriei în flux reprezintă o tehnică rapidă și mai ușoară decât metodele convenționale pentru determinarea comportamentului osmotic al eritrocitelor, meritând investigații ulterioare.

3. Cercetările noastre concentrate pe încapsularea unor noi nanoparticulelor pe bază de fier, obținute în scopul utilizării acestora ca agenți de contrast pentru IRM au demonstrat:

a. Posibilitatea încapsulării de nanoparticule magnetice prin porii deschiși ai membranelor eritrocitare, într-un mediu hipoton, concentrația optimă de soluție salină fiind în jur de 0,7 - 0,5 % NaCl, fără a afecta viabilitatea celulelor;

b. La această concentrație, analiza SEM a arătat și confirmat menținerea caracteristicilor morfologice ale eritrocitelor purtătoare de nanoparticule;

c. Analiza EDX (raze X cu dispersie energetică) a eritrocitelor native comparativ cu eritrocitele dializate în prezența nanoparticulelor feroase în diferite soluții saline hipotonice a permis evaluarea celor mai bune diluții pentru încapsulare, respectiv o diluție hipotonă variind între 0,7 și 0,5% NaCl, în concordanță cu rezultatele obținute la restul testelor;

d. Eficiența procedurii de încapsulare a fost, de asemenea, dovedită de imaginile TEM care demonstrează în mod clar prezența intracelulară a nanoparticulelor de fier *aliniată la nivelul feței interne a membranei*, confirmând eficiența procedurii de încapsulare și o distribuție uniformă a nanoparticulelor pe bază de fier în întreaga citoplasmă a celulei, fără acumulare în membrana eritrocitară;

e. Per ansamblu, aceste noi nanoparticule pe bază de Fe testate ar putea conduce la utilizarea lor în asociere cu eritrocitele, sub formă de substanțe de contrast

intravasculare promițătoare pentru aplicații biomedicale în imagistică.

4. Cercetările derulate în vederea dezvoltării unor sisteme avansate de livrare a medicamentelor pentru reducerea toxicității și a efectelor secundare adverse utilizând cărași biodegradabili și neimunogeni prin care substanțele terapeutice pot fi diseminate în tot corpul prin intermediul sistemului circulant sanguin având ca model albumina marcată cu FITC, au evidențiat:

a. Înglobarea moleculelor de albumină-FITC prin metoda mediilor hipotonice se dovedește utilă și pentru înglobarea de molecule farmaceutice;

b. Rândamentul cel mai bun s-a obținut la medii hipoosmotice de la 0,7% NaCl până la 0,5% NaCl, asemănător celor pentru înglobarea de nanoparticule.

5. Studiile cu privire la încapsularea nanoparticulelor pe bază de fier în eritrocite utilizând mediile speciale de conservare a sângelui SAGM și PAGGSM pentru ameliorarea condițiilor de obținere a transportorilor eritrocitari, comparativ cu cercetările efectuate utilizând diluții hipotone de soluții de NaCl, au condus la următoarele concluzii:

a. În urma evaluării *in vitro* a calității transportorilor eritrocitari obținuți prin utilizarea mediilor SAGM și PAGGSM nu s-a observat o ameliorare importantă datorită complexității mediilor, respectiv prezența de dextroză, adenină, guanină, manitol, așa cum era de așteptat.

b. Deși mai complet, conținând guanozină, mediul PAGGSM s-a dovedit cel mai puțin adecvat obținerii de medii hipotone pentru încapsulare de nanoparticule.

În aceste condiții se impun studii suplimentare pentru utilizarea mediilor de conservare a concentratului eritrocitar, atât *in vitro* cât și *in vivo* pentru determinarea duratei de viață a transportorilor eritrocitari obținuți și corelarea acestor rezultate cu examene de microscopie electronică SEM și TEM.

6. Studiile de încapsulare a unui agent de contrast (Omniscan) utilizat în prezent în imagistica IRM, având ca substanță activă gadodiamida, în acord cu cercetările internaționale pentru diminuare a riscurilor și efectelor secundare, au demonstrat posibilitatea înglobării acestuia în eritrocit, în special la probele suspendate în soluție salină de 0,7%.

7. Analiza prin citometrie în flux s-a dovedit adecvată evidențierii încapsulării de nanoparticule/molecule fluorescente, fiind în acord și confirmată de rezultatele obținute prin microscopie electronică TEM și SEM sau de fluorescență.

Ansamblul cercetărilor noastre, prin rezultatele obținute, se înscrie într-o nouă direcție modernă și de mare actualitate internațională de investigare a fenomenului de apoptoză eritrocitară atât în patologia eritrocitului cât și în valorificarea biotehnologică a hematiilor umane ca transportor cu multiple calități pentru medicamente sau nanoparticule.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Antonelli A., Sfara C., Manuali E., Bruce I.J., Magnani M., Encapsulation of superparamagnetic nanoparticles into red blood cells as new carriers of MRI contrasts agents *Nanomedicine* 6(2), 211–223 ISSN 1743-5889, 2011
2. Barshtein G., Gural A., Manny N., Zelig O., Yedgar S., Arbell D., Storage-induced damage to red blood cell mechanical properties can be only partially reversed by rejuvenation, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 41(3):197-204, 2014
3. Berceanu S., *Hematologie clinică*, Editura Medicală, 1977.
4. Berg C. P., Engels I. H., Rothbart A., Lauber K., Renz A., Schlosser S. F., Schulze-Osthoff K., and Wesselborg S., Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis, *Cell. Death Differ.* 8, 1197– 1206, 2001
5. Beutler E., Lichtman M. A., in: B.S. Collier, T.J. Kipps (Eds.), *Williams Hematology*, Fifth Edition, McGraw-Hill, Inc., New York, pp. 349–425, 1995
6. Birka C., Lang P. A., Kempe D. S., Hoefling L., Tanneur V., Durantou C., Nammi S., Henke G., Myssina S., Krikov M., Huber S. M., Wieder T., and Lang F., Enhanced susceptibility to erythrocyte “apoptosis” following phosphate depletion. *Pflügers Arch.* 448, 471–477, 2004
7. Brand V. B., Sandu C. D., Durantou C., Tanneur V., Lang K. S., Huber S. M., and Lang F., Dependence of plasmodium falciparum in vitro growth on the cation permeability of the human host erythrocyte. *Cell. Physiol. Biochem.* 13, 347–356, 2003
8. Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Arnoult D., Quatannens B., Tissier J.P., Slomianny C., Sartiaux C., Alonso C., Huart J.J., Montreuil J., Ameisen J.C., Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria, *Cell. Death. Differ.*, 8, 1143 - 1156, 2001a.
9. Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Tissier J.P., Trandaburu I., Slomianny C., Huart J.J., Ameisen J.C., Montreuil J., Molecular and cellular mechanism of erythrocyte cell death. An apoptotic phenomenon, *Biochimie*, 81, 361, 1999.
10. Bratosin D., Mazurier J., Debray H., et al. Flow cytofluorimetric analysis of young and senescent human erythrocytes probed with lectins. Evidence that sialic acids control their life span, *Glycoconj J.*; 12(3):258-267, 1995
11. Bratosin D., Mazurier J., Motas C., et al. Etude comparée par cytométrie en flux de diverses méthodes d'isolement des érythrocytes humaines en fonction de leur age physiologique, *Rev. Roum. Biochim.* 1996;33(3-4):147-159, 1996
12. Bratosin D., Mazurier J., Tissier J., Estaquier J., Huart J.J., Ameisen J.C., Aminoff D. and Montreuil J., Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages, A review, *Biochimie* 80, 173 - 195, 1998.
13. Bratosin D., Tcacenco L., Sidoroff, M., Cotoraci C., Slomianny C., Estaquier, J., Montreuil J., Active Caspases-8 and -3 in Circulating Human Erythrocytes Purified on Immobilized Annexin-V, A Cytometric

- Demonstration, Cytometry Part A, 75A, 236 - 244, 2009 a.
14. Chambers, E., Mitragotri, S. Long circulating nanoparticles via adhesion on red blood cells: mechanism and extended circulation. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 232, 958–966, 2007
 15. Cohen WD. The cytomorphic system of anucleate non-mammalian erythrocytes. *Protoplasma*; 113:23–32, 1982
 16. Daugas E., Cande C., and Kroemer G., Erythrocytes: death of a mummy. *Cell. Death Differ.* 8, 1131–1133, 2001
 17. Dharmarajan T.S., Anemia in the long-term care setting: routine screening and differential diagnosis. *Consult Pharm.*;23 Suppl A:5-10, 2008
 18. Dzierzak E., Philipsen S., Erythropoiesis: Development and Differentiation, *Cold Spring Harb Perspect Med*;3:a011601, 2013
 19. Fratemale A., Rossi L., Magnani M., Encapsulation, metabolism and release of 2-fluoro-ara-AMP from human erythrocytes, *Biochimica et Biophysica Acta* 1291, 149-154, 1996
 20. Godfrin Y., Goineau P.O., ERYTECH PHARMA, Erythrocytes containing arginine deiminase, US patent no. 20080274092, 2005
 21. Hamidi M., Zarrin A., Foroozesh M., Mohammadi-Samani S., Applications of carrier erythrocytes in delivery of biopharmaceuticals, *Journal of Controlled Release* 118, 145–160, 2007.
 22. Han X., Wang C., Liu Z., Red Blood Cells as Smart Delivery Systems, *Bioconjugate Chem*, DOI:10.1021/acs.bioconjchem.7b00758, 2018
 23. Harisa G.E.I., Ibrahim M. F., Alanazi F. K., Characterization of Human Erythrocytes as Potential Carrier for Pravastatin: An In Vitro Study, *Int J Med Sci*; 8(3):222-230, 2011
 24. Jaitely V., Kanaujia P., Venkatesan N., Jain S., Vyas S.P., Resealed erythrocytes: drug carrier potentials and biomedical applications, *Indian Drugs*; 33: 589–594; 1996
 25. Janz T.G, Johnson R.L, Rubenstein S.D. Anemia in the emergency department: evaluation and treatment. *Emerg Med Pract.*;15:1-15; quiz -6, 2013
 26. Jelkmann W: Functional significance of erythrocytes; in Lang F, Föller M (eds): *Erythrocytes*. London, Imperial College Press, 2012
 27. Kempe D. S., Akel A., Lang P. A., Hermle T., Biswas R., Muresanu J., Friedrich B., Dreischer P., Wolz C., Schumacher U., Peschel A., Gotz F., Doring G., Wieder T., Gulbins E., and Lang F., Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J. Mol. Med.* 85, 269–277, 2007.
 28. Kempe D.S., Ackermann T.F., Fischer S.S., Koka S., Boini K.M., Mahmud H., et al. Accelerated suicidal erythrocyte death in Klotho-deficient mice. *Pflugers Arch.*;458:503-12, 2009
 29. Koury M.J., Abnormal erythropoiesis and the pathophysiology of chronic anemia. *Blood Rev.*;28:49-66, 2014
 30. Lang K. S., Lang P. A., Bauer C., Durantton C., Wieder T., Huber S. M., and Lang F., Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell. Physiol. Biochem.* 15, 195–202, 2005
 31. Lang K. S., Roll B., Myssina S., Schittenhelm M., Scheel-Walter H. G., Kanz L.,

- Fritz J., Lang F., Huber S. M., and Wieder T., Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell. Physiol. Biochem.* 12, 365–372, 2002
32. Lang P. A., Schenck M., Nicolay J. P., Becker J. U., Kempe D. S., Lupescu A., Koka S., Eisele K., Klarl B. A., Rubben H., Schmid K. W., Mann K., Hildenbrand S., Hefter H., Huber S. M., Wieder T., Erhardt A., Haussinger D., Gulbins E., and Lang F., Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat. Med.* 13, 164–170, 2007
 33. Meulenbroek E.M., Wouters D., Zeerleder S.S., Lyse or not to lyse: Clinical significance of red blood cell autoantibodies. *Blood Rev.*;29:369-76, 2015
 34. Pierigè F., Serafini S., Rossi L., Magnani M., Cell-based drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 286–295, 2008
 35. Qadri S.M., Bissinger R., Solh Z., Oldenburg P.A., Eryptosis in health and disease: A paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes, doi:10.1016/j.blre.2017.06.001, 2017
 36. Rapoport S. The regulation of glycolysis in mammalian erythrocytes. *Essays Biochem.*, 4:69–103, 1968
 37. Reimer P, Tombach B: Hepatic MRI with SPIO: detection and characterization of focal liver lesions. *Eur. Radiol.* 8, 1198–1204, 1998.
 38. Schaefer R.M., Schaefer L., Hypochromic red blood cells and reticulocytes. *Kidney Int. Suppl.* 69 S44–S48, 1999
 39. Slee E.A., Adrain C., Martin S.J.. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis, *J Biol Chem.*;276:7320–6, 2001
 40. Srinu R., Babu R.C., Srekanth N., Nagaveni B., Erythrocytes as Carrier for Drugs, Enzymes and Peptides, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (04); 166-176, 2012
 41. Turner J, Bhimji S.S., Anemia. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Jan-. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499994/> (ultima accesare la 15.06.2018), 2018
 42. Valbonesi M., Bruni R., Florio G., Zenella A., Bunkens H., Cellular contamination of plasma collected with various apheresis systems, *Transfus. Apher. Sci.* 24, 91–94, 2001
 43. Wood B. L., Gibson D. F., and Tait J. F., Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations. *Blood* 88, 1873–1880, 1996
 44. World Health Organisation. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia. Edited by Bruno de Benoist, Erin McLean, Ines Egli and Mary Cogswell. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43894/1/9789241596657_eng.pdf (ultima accesare la 15.06.2018), 2008

Număr total referințe bibliografice în teza de doctorat: 387