Original Article

Investigating the Stability of Polymer Coating of Methoxy Polyethylene Glycol Activated by Succinimidyl Valerate on the Surface of Red Blood Cells under In Vitro and In Vivo Conditions

Shahin Haghdoost[1], Sameereh Hashemi-Najafabadi[2*], Masoud Soleimani[3]

1- M.Sc., Department of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: s.hashemi@modares.ac.ir

Received: 22/Dec/2014, Accepted: 15/Jul/2015

Abstract

Objective: The host immune response against minor donor blood groups may be considered a significant problem in certain groups of patients that undergo transfusions such as those who require repeat transfusions (thalassemia). A proposed solution is to coat the surface antigens on red blood cells (RBCs) by covalent binding of methoxy polyethylene glycol (mPEG). This study aims to determine the storage time of PEGylated cells before injection and its effective time during in vivo conditions.

Methods: We used mPEG activated by succinimidyl valerate (SVA) to PEGlayte the cells. The stability of the created coating during in vitro conditions was investigated by three methods: counting the numbers of free cells, flow cytometry and qualitative investigation. The appropriate concentration of mPEG for rabbit RBC PEGylation was determined by electron microscopy. The effective time of PEGylated rabbit RBCs was determined with flow cytometric analysis after the injection. In addition, we investigated the serum biochemical properties at 24 hours after the injection.

Results: The appropriate concentration of 15 mg/mL for rabbit RBC PEGylation was determined. At 48 hours after injection, 83% of the cells that were alive in the host circulatory system kept their polymeric coating.

Conclusion: We determined that 18 days was an appropriate storage time for PEGylated RBCs under in vitro conditions. The effective time of 14 days was determined for PEGylated RBCs by tracking the cells in vivo. An investigation of the serum biochemical properties of rabbits at 24 hours after the injection showed that the RBC coating significantly inhibited stimulation of the host immune system and cell destruction.

Keywords: Blood transfusion, Red blood cells, Methoxy polyethylene glycol, Succinimidyl valerate

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No. 2, Pages: 13-26

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-17]

مقاله اصیل

بررسی میزان پایداری پوشش پلیمری متوکسی پلی اتیلن گلایکول فعال شده با سوکسینمیدیل والرات روی سطح سلول‌های قرمز خون در شرایط برون تنی و درون تنی

شاهین حقدوست[۱]، سمیره هاشمی نجف آبادی[۲*]، مسعود سلیمانی[۳]

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست پزشکی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه زیست پزشکی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه زیست پزشکی
Email: s.hashemi@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۳/۱۰/۰۱ پذیرش مقاله: ۹۴/۰۴/۲۴

چکیده

هدف: به دلیل پاسخ سامانه ایمنی میزبان در برابر گروه‌های خونی فرعی دهنده، انتقال خون می‌تواند در برخی موارد، به‌خصوص برای بیماران نیازمند به دریافت مکرر خون (مانند افراد مبتلا به تالاسمی) به‌عنوان یک مشکل مهم مطرح شود. یک روش پیشنهادی، پوشش‌دهی پادگن‌های سطح سلول‌های قرمز خون با اتصال کووالانسی متوکسی پلی اتیلن گلایکول (mPEG) است. هدف از این پژوهش، تعیین زمان نگهداری سلول‌های پگیله شده پیش از تزریق و زمان مؤثر آن در شرایط درون تنی بود.

مواد و روش‌ها: برای پگیله کردن سلول‌ها، از متوکسی پلی اتیلن گلایکول فعال شده با سوکسینیمیدیل والرات (SVA) استفاده شد. در بخش برون تنی پژوهش، پایداری پوشش ایجاد شده با سه روش شمارش سلول‌های آزاد منعقد نشده، آزمون فلوسایتومتری و سنجش کیفی ارزیابی شد. با استفاده از بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی، غلظت مناسب برای پگیله کردن سلول های قرمز خون خرگوشی تعیین شد و پس از تزریق، با استفاده از آزمون فلوسایتومتری، زمان مؤثر سلول‌های پگیله شده در خون خرگوش تعیین شد. همچنین خواص بیوشیمیایی سرم خرگوش‌ها در ۲٤ ساعت اولیه پس از تزریق بررسی شد.

نتایج: غلظت مناسب برای پگیله کردن سلول‌های قرمز خرگوشی با mPEG-SVA، ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. ٤۸ ساعت پس از تزریق، حدود ۸۳ درصد سلول‌ها در سامانه گردش خون میزبان همچنان زنده بودند و موفق به حفظ پوشش پلیمری خود شدند.

نتیجه‌گیری: زمان ۱۸ روز به‌عنوان زمان مناسب برای ذخیره‌سازی سلول‌های پگیله شده در شرایط آزمایشگاهی به‌دست آمد. همچنین با ردیابی سلول‌ها در شرایط درون‌تنی، زمان مؤثر پایداری ۱٤ روز برای سلول‌های پگیله شده تعیین شد. نتایج بررسی خواص بیوشیمیایی سرم خرگوش‌ها در ۲٤ ساعت اولیه پس از تزریق، نشان داد که پوشش‌دهی سلول‌های قرمز خون به‌طور قابل توجهی مانع از تحریک سامانه ایمنی میزبان و تخریب آن‌ها توسط میزبان شده است.

کلیدواژگان: انتقال خون، سلول‌های قرمزخون، متوکسی پلی اتیلن گلایکول، سوکسینیمیدیل والرات

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، صفحات: ۱۳-۲۶

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-17]

مقدمه

پیوند سلول‌های قرمز خون (Red Blood Cells: RBCs)، یکی از رایج‌ترین موارد انتقال سلول و سلول درمانی محسوب می‌شود [۱]. اما مشکل مهم در انتقال خون، پاسخ سامانه ایمنی میزبان به سلول‌های خونی دریافتی و تخریب آن‌ها است. این پاسخ ایمنی به دلیل حضور گلیکولیپیدهای غشایی، به‌عنوان پادگن‌های (Antigens) گروه خونی، ایجاد می‌شود. عموماً در فرآیندهای انتقال خون، سازگاری بین پادگن‌های اصلی خون (A، B) و Rh(D) بررسی می‌شود. اما علاوه بر این‌ها، پادگن‌های فرعی دیگری (مانند Kell) نیز روی سطح سلول قرمز خون قرار دارند که کمتر مورد بررسی قرار می‌گیرند. این امر در بیماران مبتلا به کم خونی تالاسمی و سلول‌های داسی شکل که به دلیل ماهیت مزمن بیماری، نیاز به تزریق مداوم خون دارند، موجب تحریک سامانه ایمنی میزبان و حساس شدن به یک یا چند پادگن فرعی (حدود ۵-۳۰ درصد) می‌شود [۱، ۲]. یافتن دهنده مناسب برای این بیماران دشوار است، راه حل پیشنهادی که در سه دهه اخیر مورد توجه قرار گرفته، پوشش دهی پادگن‌های سطح سلول‌های قرمز با استفاده از یک مولکول زیست‌سازگار همچون پلی اتیلن گلایکول (Polyethylene glycol: PEG) است [۳، ٤].

PEG با خواص منحصر به فرد خود، از طریق واسطه‌هایی به پادگن‌های اصلی و فرعی گروه‌های خونی متصل می‌شود و لایه آب پوشیده محافظی را در اطراف سلول‌های قرمز خون ایجاد می‌نماید که مولکول‌های بزرگ مانند پادتن‌ها را دور می‌کند، اما در برابر عبور مولکول‌های کوچک مانند گلوکز و اکسیژن ممانعتی ایجاد نمی‌کند. از بین مشتقات PEG، مفیدترین ترکیب برای پوشش دادن پروتئین‌ها، متوکسی پلی اتیلن گلایکول (methoxy Polyethylene Glycol: mPEG) است. mPEG تنها یک گروه هیدروکسیل داشته و از اتصالات متقاطع جلوگیری می‌کند. این پلیمر غیر ایمنی‌زا، خطی، بدون بار و قابل تهیه در انواع اندازه‌ها است. گروه هیدروکسیل mPEG برای اتصال به سطح سلول قرمز خون، نیاز به فعال‌سازی دارد، یکی از نمونه‌های mPEG فعال، با استفاده از سوکسینیمیدیل والرات (Succinimidyl Valerate: SVA) فراهم می‌شود [۳، ۵-۷].

تقریباً مطالعات اولیه در زمینه پگیلاسیون سلول‌های قرمز خون در سال ۱۹۹۷ توسط فیشر (Fisher) و همکارانش صورت گرفت. آن‌ها با پوشاندن سطح سلول‌های قرمز خون با استفاده از mPEG توانستند به نتایج خوبی در زمینه عدم شناسایی پادگن‌های سطحی سلول قرمز خون توسط سلول‌های سامانه ایمنی میزبان در هنگام انتقال سلول‌های خونی دست پیدا کنند [۸].

مطالعات زیادی بین سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۹ روی عوامل مؤثر در پگیله کردن سلول‌های قرمز خون انجام شد و عواملی از جمله غلظت پلیمر، وزن مولکولی پلیمر، pH، زمان واکنش، دما و غیره بررسی شد [۹-۱۲].

در سال ۲۰۱٤ غلامی و همکاران فرآیند پگیلاسیون سلول‌های قرمز خون را با استفاده از mPEG-SVA که در مقایسه با سایر PEGهای فعال استفاده شده در مطالعات پیشین گروه، مناسب‌تر شناخته شده بود، به‌منظور پوشش‌دهی همزمان پادگن‌های اصلی و فرعی برای افزایش نیمه عمر پلاسمایی سلول‌های قرمز خون در برابر سامانه ایمنی میزبان و ترشح پادتن‌ها بهینه کردند. در نهایت، شرایط بهینه مدت زمان واکنش ٤٥ دقیقه و pH واکنش برابر ۸/٦ گزارش شد. غلظت بهینه mPEG برابر ۱۷/۲۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و وزن مولکولی بهینه معادل پلیمر (که از ترکیب mPEGهای فعال در وزن‌های مولکولی ۱۰ و ۲۰ کیلو دالتون استفاده شد) نیز ۱۹/۱۲ کیلو دالتون گزارش شد [۱۲].

یک نکته مهم که در مطالعات پیشین به آن کمتر توجه شده، این است که پس از فرآیند پگیلاسیون سلول‌های قرمز خون، حفظ حداکثری پوشش پلیمری ایجاد شده روی سطح سلول‌های قرمز خون در مدت نگهداری نمونه‌های خونی در آزمایشگاه، پیش از تزریق به بیمار و در سامانه گردش خون گیرنده مهم است. این موضوع به زمان پایداری زنجیره‌های PEG متصل شده به سطح سلول‌های قرمز خون و زمان

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-17]

آبکافت (Hydrolysis) پیوند ایجاد شده ارتباط دارد [٦، ٩]. زمانی سلول‌های پگیله شده مناسب تزریق هستند که پوشش پلیمری تا زمان قابل قبولی روی سطح آن‌ها پایدار باشد. سلول‌های قرمز خون (بدون پوشش) ذخیره شده در بانک‌های خونی تا ۳۵ روز پیش از تزریق به بیماران، ماندگاری دارند [۱۳]. بنابراین بررسی زمان پایداری mPEG-SVA روی سطح سلول‌های قرمز خون، به‌منظور تعیین زمان مناسب ذخیره‌سازی سلول‌های پوشش‌دار پیش از تزریق و نیز با توجه به این موضوع، بررسی کارآمد بودن آن‌ها در شرایط درون‌تنی، به‌عنوان موضوع این پژوهش انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، mPEG فعال شده با SVA در وزن‌های مولکولی ۱۰ و ۲۰ کیلو دالتون از شرکت Lysan Bio (آمریکا) – پادتن گروه‌های خونی A و Rh (D) از شرکت سیناژن (ایران) و پادتن گروه خونی Kell از شرکت Diagast (فرانسه) خریداری شد. FITC (Fluorescein isothiocyanate) و کیت pkh-26 از شرکت Sigma (آمریکا) تهیه شد.

این پژوهش، توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به شناسه IR.TMU.REC.1394.43 مورخ ۹٤/۰٤/۰٦ تأیید شده است.

بخش برون‌تنی

تهیه سلول‌های قرمز خون انسانی

سلول‌های قرمز خون از نوع $Kell^{+}-A^{+}$ به شکل فشرده از سازمان انتقال خون ایران فراهم شدند.

پوشش‌دار کردن سلول‌های قرمز خون با mPEG فعال

ابتدا سلول‌های قرمز خون تا غلظت ۱۰ درصد در بافر فسفات (Phosphate Buffer Solution: PBS) تعلیق شدند. محلول تازه و سرد mPEG-SVA در غلظت و وزن مولکولی بهینه گزارش شده توسط غلامی و همکاران تهیه شد [١٤]. به‌طور خلاصه، برای تهیه وزن مولکولی بهینه ۱۹/۱۲ کیلو دالتون mPEG-SVA، از ترکیب دو وزن مولکولی ۱۰ و ۲۰ کیلو دالتون (با درصد وزنی ۹۱ به ۹) استفاده شد. غلظت ۱۷/۲۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پلیمر فعال، دمای ٤ درجه سلسیوس و زمان ٤٥ دقیقه برای انجام واکنش تعیین شد. بلافاصله پیش از استفاده، محلول پلیمر فعال، در بافر بازی (۵۰ میلی‌مولار K_2HPO_4 و ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl) تهیه شد و حجم‌های مناسبی از آن به تعلیق سلول‌های قرمز خون اضافه شد. نمونه‌ها با اختلاط ملایم در شرایط بیان شده، واکنش دادند. پس از ۳ مرتبه شستشو با PBS با استفاده از سانتریفوژ با دور ۲۰۰ x g و به‌مدت ۱۰ دقیقه، سلول‌های قرمز خون به‌منظور ارزیابی میزان پوشش پلیمری ایجاد شده، جدا و در بافر PBS در غلظت‌های مورد نیاز تعلیق شدند [١١، ١٤]. پایداری پوشش پلیمری ایجاد شده، در شرایط آزمایشگاهی، پیش از تزریق، در یک بازه زمانی حدود ۳۵ روزه، با سه روشی که در ادامه بیان می‌شوند، بررسی شد.

شمارش سلول‌های آزاد منعقد نشده در مجاورت پادتن‌های گروه خونی

ابتدا تعلیقی از سلول‌های قرمز خون (با غلظت ٦ درصد) در بافر PBS تهیه شد. صد میکرولیتر از این تعلیق به همان حجم از محلول پادتن‌های گروه خونی A-Kell-Rh به‌صورت جداگانه در بافر فسفات (نسبت ۱:۳) اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و با اختلاط ملایم واکنش دادند. سپس سلول‌های قرمز خون به‌مدت یک دقیقه با سانتریفوژ در دور x ۲۰۰ g رسوب داده شدند. از رسوب به‌دست آمده، تعلیقی با غلظت ۰/۱ درصد در بافر PBS تهیه شد. رنگ‌آمیزی با تریپان آبی انجام شد و سلول‌های زنده، آزاد و منعقد نشده روی لام نئوبار زیر میکروسکوپ نوری شمرده شدند [١٤–١٧].

بررسی شدت فلورسنتی نمونه‌ها

اتصال فلورسین ایزو تیو سیانات (Fluorescein Iso

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-17]

thocyanate: FITC) به پادتن‌های Rh و Kell، به‌صورت جداگانه، بر اساس روش بیان شده توسط کلیگان و همکارانش انجام شد [۱۸]. به‌طور خلاصه، ابتدا دیالیز پادتن مورد نظر در کیسه دیالیز فعال شده با برش وزن مولکولی ۱۲ کیلو دالتون انجام شد، سپس FITC با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محیط دی متیل سولفوکسید تعلیق شد و به پادتن اضافه شد. پس از آن به‌منظور حذف FITC اضافی متصل نشده به پادتن، دیالیز انجام شد. در مرحله بعد به‌منظور اتصال پادتن نشان‌دار شده به سلول‌های قرمز خون، ٦٠ میکرولیتر تعلیق سلول قرمز خون با غلظت ۰/۱ درصد به ۲۰۰ میکرولیتر محلول پادتن با غلظت ۳۰ درصد اضافه شد. پس از دو دقیقه سانتریفوژ سلول‌ها با سرعت ۵۰۰ x g و دو بار شستشوی آن‌ها با بافر PBS، سلول‌ها در یک میلی‌لیتر بافر PBS تعلیق شدند و شدت فلورسنتی سلول‌های نشان‌دار شده با دستگاه فلوسایتومتری مدل SC-48 ساخت کمپانی Becton Dickinson (آمریکا) اندازه‌گیری شد [۱۹، ۲۰].

بررسی کیفی اثر پوشش دهی سلول‌های قرمز خون با mPEG فعال شده

ابتدا نمونه‌های پادتن‌های A-Kell-Rh، به‌صورت جداگانه در نسبت‌های حجمی مختلف از ۰/۱ تا ۱، با اضافه کردن بافر PBS تهیه شد و با استفاده از سنجش کیفی (چشمی)، غلظتی از پادتن که سبب شروع انعقاد سلول‌های قرمز می‌شود، ثبت شد. مقایسه این غلظت تعیین شده برای نمونه پوشش‌دار، نسبت به نمونه شاهد در دوره ۳۵ روزه ارزیابی شد [۲۱].

بخش درون‌تنی

تهیه سلول‌های قرمز خون خرگوشی

خرگوش‌های مورد استفاده در این پژوهش، دو خرگوش نر ۵ ماهه از نژاد نیوزلندی با وزن ۲/۵ کیلوگرم بودند که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. گروه‌های خونی خرگوش‌ها متفاوت بود و این تفاوت، با انجام آزمایش سازگاری خونی شناسایی شد. خون‌گیری در شرایط سترون با سرنگ‌های پلاستیکی آغشته به هپارین سدیم با حجم ۲۰ میلی‌لیتر از طریق قلب خرگوش‌های بیهوش شده با کلروفرم انجام شد. سپس نمونه خون به لوله‌های سترون آزمایش، حاوی مادهٔ ضد انعقاد اتیلن دی آمین ترا استیک اسید منتقل شد. نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ٤٠٠x g سانتریفوژ شد و پلاسما و سلول‌های سفید خون جدا شدند. RBCهای به‌دست آمده، ۳ مرتبه (به‌مدت ۵ دقیقه و با سرعت ٤٠٠x g) با بافر فسفات شسته شدند [۲۲].

بررسی تغییر شکل‌پذیری RBC خرگوشی با میکروسکوپ الکترونی

به‌منظور به‌دست آوردن غلظت مناسب برای ایجاد پوشش بر سطح سلول‌های قرمز خون خرگوش، سلول‌ها با غلظت‌های معادل ۱۵–۱۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پلیمر فعال، در شرایطی مشابه سلول‌های قرمز خون انسانی پگیله شدند. سپس به‌منظور تثبیت سلول‌های قرمز خون و بررسی با میکروسکوپ الکترونی (Scanning Electron Microscopy: SEM)، اختلاط تعلیق سلولی (حدود ۷ درصد) در PBS، با ۵ برابر حجمی محلول ۰/۵ درصد گلوتارآلدیید در PBS انجام شد. محلول گلوتارآلدیید، به‌صورت تازه از یک محلول پایه ۲۵ درصد تهیه شد. پس از هم زدن این مخلوط به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق، سلول‌ها ۳ مرتبه با آب مقطر و با سرعت ۳۰۰x g شسته شدند. این شستشو حداکثر تا یک ساعت پس از تثبیت باید انجام شود [۲۳-۲۵]. در نهایت شکل سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مدل EM-208 ساخت کمپانی Philips (هلند) بررسی شد.

نشان‌دارکردن غشای RBCهای خرگوشی

به‌منظور رنگ‌آمیزی سلول‌ها با کیت pkh-26، ابتدا ۱۵ میلی‌لیتر از محلول c داخل کیت به ۵ میلی‌لیتر RBC اضافه شد. به میزان ۱۵ میکرولیتر از رنگ داخل کیت نیز به ۱۵

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-17]

میلی‌لیتر از محلول c اضافه شده، سپس سلول‌ها به رنگ تهیه شده اضافه شدند و به‌مدت ۵ دقیقه با اختلاط ملایم در دمای اتاق برای انجام واکنش، به آن‌ها زمان داده شد. در مرحله بعد، به‌مدت ۱ دقیقه برای اختتام واکنش رنگ‌آمیزی سلول‌ها، ۲۵ میلی‌لیتر از محلول آلبومین ۰/۱ درصد به ظرف واکنش اضافه و مخلوط شد. سپس سانتریفوژ سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با دور ۳۰۰xg در دمای ٤ درجه سلسیوس در مدت ۵ دقیقه انجام شد. سلول‌ها ۳ مرتبه با بافر فسفات در شرایط مشابه شست و شو و برای تزریق به خرگوش‌ها آماده شدند [۲٦، ۲۷].

تزریق سلول‌های نشان‌دار شده به خرگوش‌ها

سلول‌های رنگ‌آمیزی شده در شرایط کاملاً سترون، با نسبت ۱ به ۳ در بافر فسفات تعلیق شده و برای تزریق آماده شدند. مقدار ۱۵ میلی‌لیتر از این تعلیق، از طریق رگ‌های پشت گوش خرگوش‌ها به آن‌ها تزریق شد [۲۸].

تهیه سرم خون خرگوشی و بررسی خواص بیوشیمیایی آن

پس از گذشت ۲٤ ساعت از تزریق، بدون اضافه کردن ماده ضد انعقاد، نمونه خونی از خرگوش‌ها جمع آوری شد. نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس قرار داده شد تا انعقاد خون صورت پذیرد. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ٤۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد و مایع زرد رنگ لایه بالایی که به‌عنوان سرم خون شناخته می‌شود از RBCها جدا شد. پس از جداسازی سرم، میزان ترکیبات بیوشیمیایی آن [بیلی‌روبین (Bilirubin) کل، آسپارتات آمینوترنسفراز، آلانین آمینو ترنسفراز و لاکتاید دهیدروژناز] با روش نورسنجی، توسط اتو آنالیزر مدل Selestra XL ساخت کمپانی Philips (هلند) تعیین شد [۲۹-۳۱].

بررسی دوام و پایداری RBCهای تزریق شده با آزمون فلوسایتومتری

خرگوش‌های مورد آزمایش، به‌مدت ۲۰ روز در شرایط آب و غذایی یکسان نگهداری شدند. هر ۲ روز یک بار، خون‌گیری از گوش خرگوش‌ها انجام شده و پس از جداسازی RBCها، درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده موجود در نمونه خونی خرگوش‌ها با دستگاه فلوسایتومتر مدل SC-٤٨ ساخت کمپانی Becton Dickinson (آمریکا) به‌دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری

همه نتایج به‌صورت متوسط ± خطای استاندارد از میانگین گزارش شده است. هر آزمایش با سه بار تکرار برای نمونه‌ها انجام شده و $P < ۰/۰۵$ برای تمام داده‌ها ثبت شد.

نتایج

ارزیابی زنده بودن سلول‌های قرمز خون انسانی قبل و بعد از پگیله کردن با شمارش سلول‌های زنده

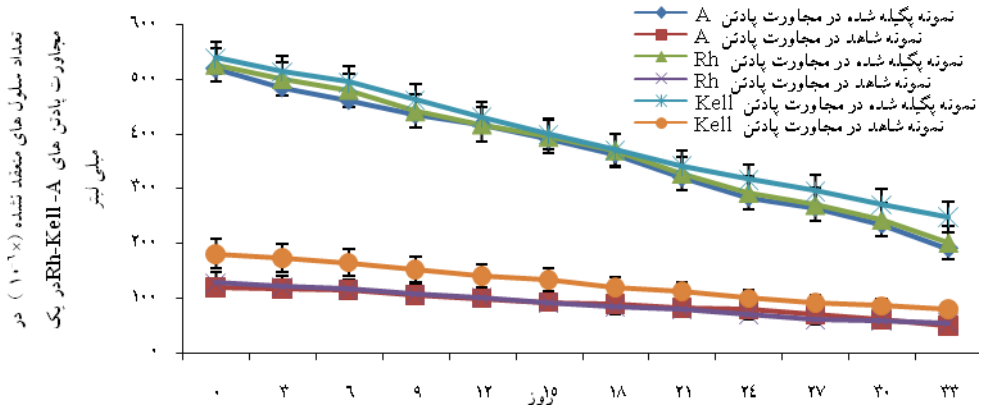
ارزیابی زنده بودن سلول‌ها، پس از رنگ‌آمیزی با تریپان آبی (Trypan blue) انجام شد. نتایج شمارش سلول‌های قرمز در دو نمونه پوشش‌دار و شاهد (بدون پوشش) به‌صورت جداگانه نشان داد که پگیله کردن سلول‌های قرمز خون، تأثیر منفی بر زنده بودن سلول‌های قرمز ندارد و تنها ۰/۵ درصد مرگ سلولی در سلول‌های قرمز دیده شد.

شمارش تعداد سلول‌های قرمز خون انسانی منعقد نشده در مجاورت با پادتن‌های Rh-kell-A پس از رنگ‌آمیزی با تریپان آبی

شمارش‌ها در ۱۲ مرحله آزمایش طی ۳۳ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس برای نمونه‌های شاهد و پوشش‌دار با ۳ تکرار انجام شد و نتایج آن در شکل ۱ ارایه شده است. نتایج نشان دادند که نمونه پوشش‌دار با شرایط بهینه استفاده شده، توانسته در مجاورت پادتن در مقابل انعقاد، مقاومت خوبی داشته باشد. همچنین در مدت زمان حدود ۲۰ روز، پوشش

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-17]

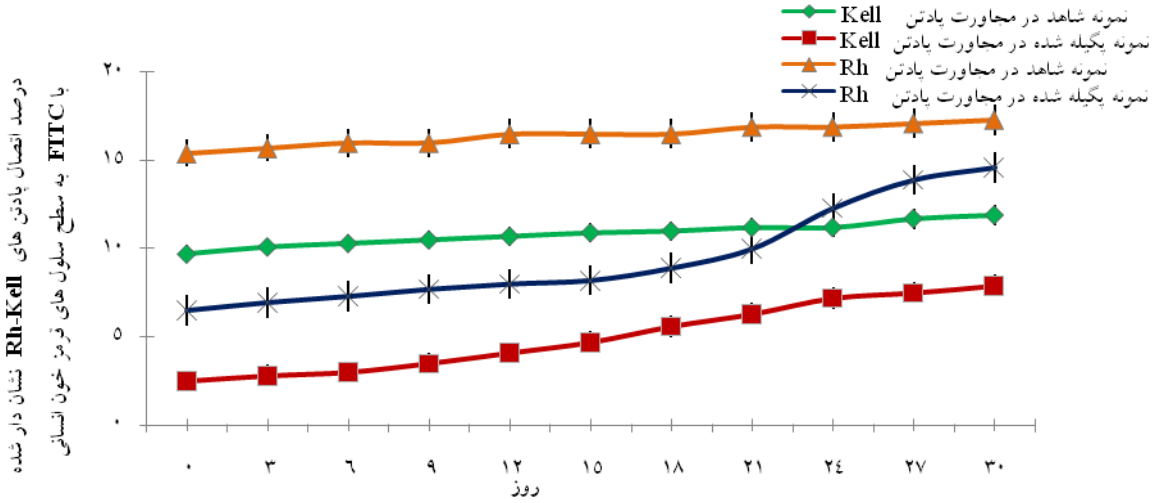
قابل قبولی را نشان دهد. آرام آرام این پوشش از دست رفت و نمونه پوشش‌دار به نمونه شاهد نزدیک شد؛ اما حتی پس از گذشت ۳۳ روز، نمونه پوشش‌دار، شرایط بهتری نسبت به نمونه شاهد دارد.



شکل ۱ مقایسه تعداد سلول‌های قرمز خون انسانی (آزاد منعقد نشده) در نمونه‌های شاهد بدون پوشش و پگیله شده در مجاورت با پادتن‌های A-Rh-Kell پس از رنگ‌آمیزی با تریپان آبی در زمان‌های مختلف سنجش

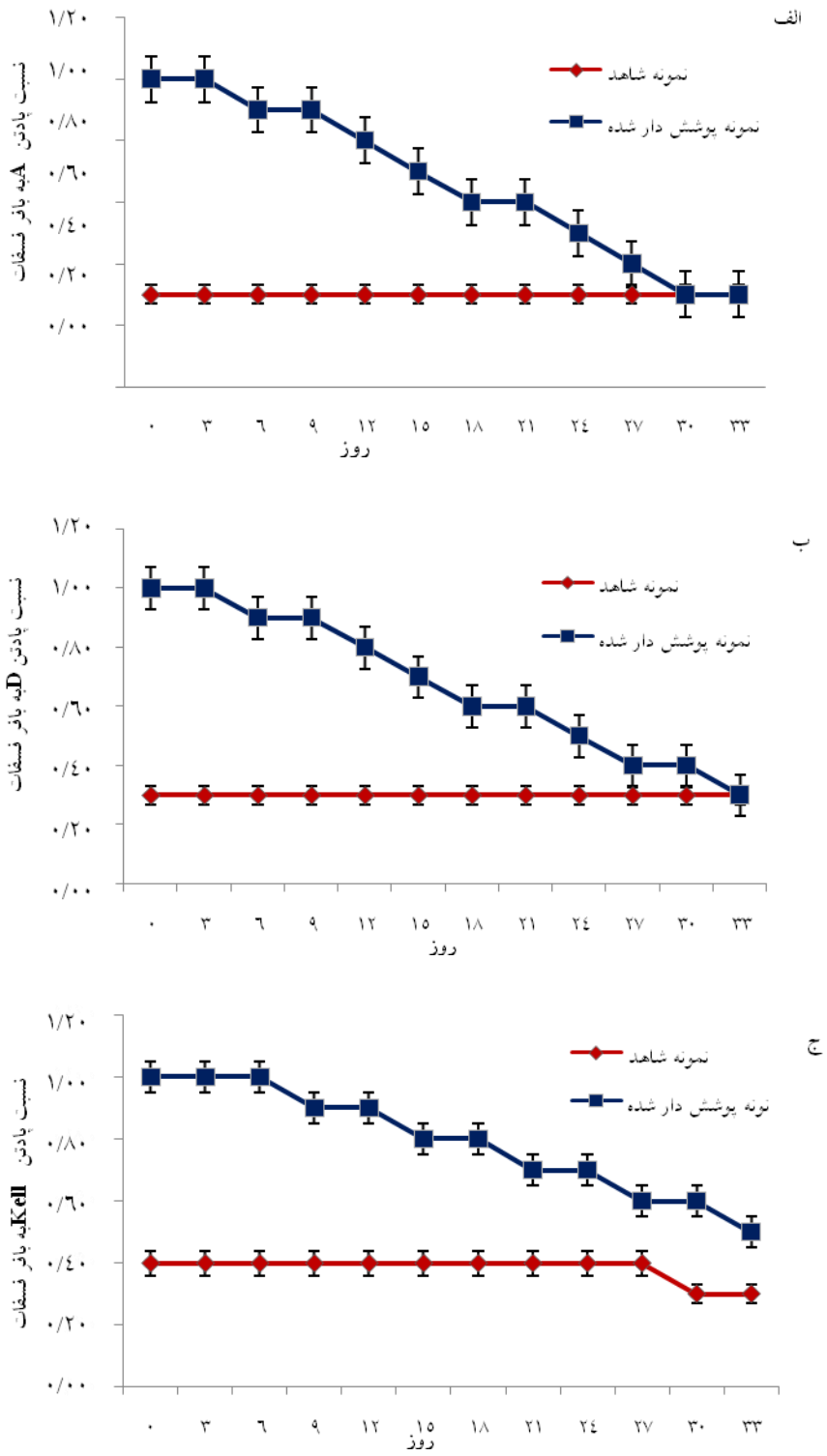
بررسی درصد اتصال پادتن‌های Rh-Kell نشان‌دار شده با FITC به سلول‌های قرمز خون انسانی

در این بررسی با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری درصد اتصال پادتن‌های نشان‌دار شده با FITC به سلول‌های قرمز خون در نمونه شاهد و پوشش‌دار، در ۱۱ مرحله طی ۳۰ روز و در نظر گرفتن ۳ تکرار برای هر نمونه ثبت شد. بررسی‌ها نشان دادند که به دلیل پوشش‌دار شدن سطح سلول‌ها در نمونه پگیله شده، درصد اتصال پادتن نشان‌دار شده در این نمونه‌ها بسیار کمتر است. اما با گذشت زمان، این پوشش توان خود را رفته رفته از دست می‌دهد و از سطح سلول‌ها جدا می‌شود. اما درصد تغییرات تا حدود ۱۸ روز مطلوب‌تر است و پس از آن، توان پوشش پلیمری کاهش چشمگیری پیدا می‌کند. نتایج در شکل ۲ نشان داده شده‌است.



شکل ۲ مقایسه درصد پادتن‌های نشان‌دار شده با FITC، متصل شده به سلول‌های قرمز خون انسانی در نمونه‌های شاهد بدون پوشش و پگیله شده، با گذشت زمان

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-17]



شکل ۳ نسبت پادتن به بافر PBS که در این نسبت، سلول‌های قرمز خون انسانی شروع به منعقد شدن می‌کنند. پادتن الف) A ب) Rh ج) kell

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-17]

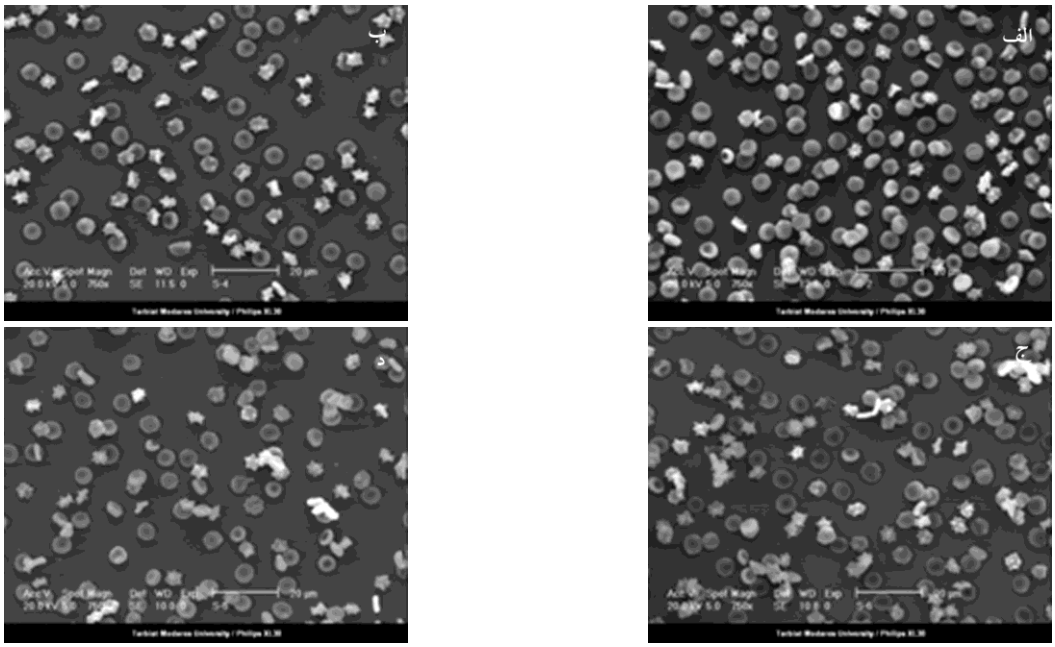
بررسی کیفی شروع به انعقاد سلول‌های قرمز خون انسانی با پادتن‌های Rh-Kell–A

نتایج این بررسی نیز طی ۳۳ روز و در ۱۲ مرحله آزمایش برای پادتن‌های A-Rh-Kell، به‌صورت جداگانه، برای هر دو نمونه پوشش‌دار و شاهد، هم‌سو با دو روش ارزیابی قبل بود و توانایی پوشش پلیمری در پوشاندن پادگن‌های فرعی و اصلی را روی سطح سلول قرمز خون نشان داد. در شکل ۳-الف و ب برای پادتن‌های A-Rh در دو نقطه، تغییر شیب‌ها را نشان می‌دهد که اولین تغییر شیب در حدود روز ۹ و دومین تغییر حدود روز ۲۱ ارزیابی است. شکل۳-ج برای پادتن Kell این تغییرات را در حدود روزهای ۱۲ و ۲٤ ارزیابی نشان می‌دهد که احتمالاً اولین تغییر شیب، مربوط به آستانه کنده شدن پوشش پلیمری و مهیا شدن شرایط آبکافت پیوند پلیمر با سلول است و تغییر شیب دوم می‌تواند معرف زمانی باشد که پس از آن، پوشش پلیمری توان چندانی برای مقابله با سامانه ایمنی میزبان را ندارد و عملاً در حال از دست رفتن است.

تعیین غلظت مناسب برای پگیله کردن سلول‌های قرمز خون خرگوشی با بررسی تصاویر SEM

غلظت مناسب برای پگیله کردن سلول‌های موشی ۱٤/۵ و برای سلول‌های انسانی ۱۷/۲۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است [۱۳، ۲۳]. با توجه به این که سطح سلول‌های خرگوشی از سلول‌های قرمز خون موشی بزرگ‌تر و از سلول‌های قرمز خون انسانی کوچک‌تر است، محدودهٔ غلظتی بین ۱۵–۱۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انتخاب شد. از سلول‌های پگیله شده در هر غلظت، در ۵ ناحیه لام، تصاویر SEM تهیه شد که در شکل ٤ گزارش شده است.

با توجه به درصد سلول‌های با شکل طبیعی، در مقابل سلول‌های خاردار، با ارزیابی تصاویر به‌دست آمده (جدول ۱)، غلظت مناسب انتخاب شد. بنابراین، غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان غلظت مناسب برای پگیله کردن سلول‌های قرمز خون خرگوشی انتخاب شد، چرا که در این غلظت از پلیمر، حدود ۹۲ درصد سلول‌های قرمز خون پگیله شده، ساختار طبیعی خود را حفظ کرده‌اند.



شکل ٤ تصاویر میکروسکوپ الکترونی سلول‌های پگیله شده خرگوشی در غلظت‌های (الف) ۱۵، (ب) ۱٦، (ج) ۱۷ و (د) ۱۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر PEG

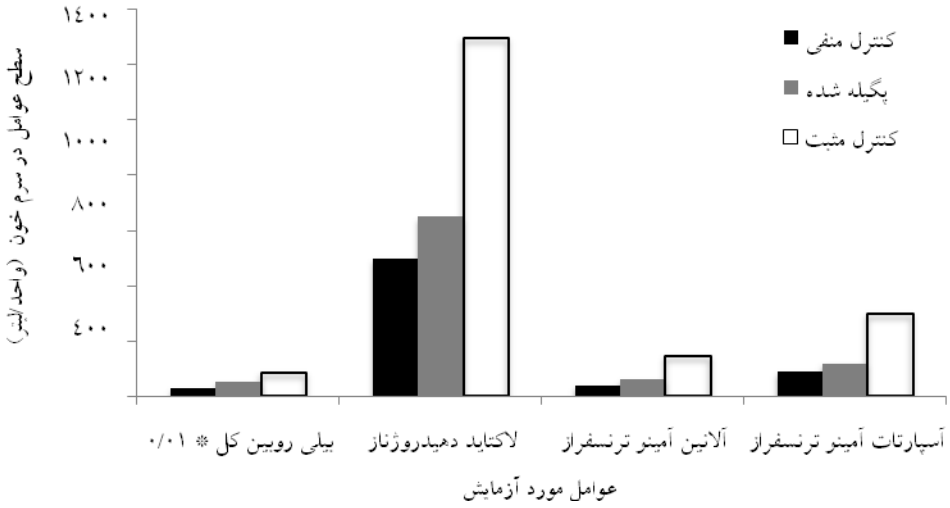
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-17]

جدول ۱ درصد سلول‌های قرمز خرگوشی با شکل طبیعی، پس از پگیله کردن با غلظت‌های مختلف mPEG

ردیف	غلظت پلیمر (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)	درصد سلول‌های با شکل طبیعی (پس از پگیله شدن)
۱	۱۵	۹۲
۲	۱۶	۸٤
۳	۱۷	۷۳
٤	۱۸	٦٤

بررسی پاسخ اولیه سامانه ایمنی میزبان در برابر تزریق سلول‌های پگیله شده خرگوشی

برای بررسی پاسخ اولیه سامانه ایمنی میزبان، سه گروه تزریق به‌صورت جداگانه انتخاب شدند که عبارت بودند از: الف) تزریق سلول‌های قرمز خون خرگوش به خودش (کنترل منفی) ب) تزریق سلول‌های قرمز خون پگیله شده خرگوش‌ها به یکدیگر که گروه خون متفاوت داشتند ج) تزریق سلول‌های قرمز خون خرگوش‌ها (شاهد بدون پوشش) به هم که گروه خون متفاوت داشتند (کنترل مثبت). پس از گذشت ۲٤ ساعت از تزریق، از هر یک از گروه‌های خرگوش‌ها، نمونه‌گیری به عمل آمد و نمونه سرم آن‌ها مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمایش‌ها در شکل ۵ ارایه شده است.



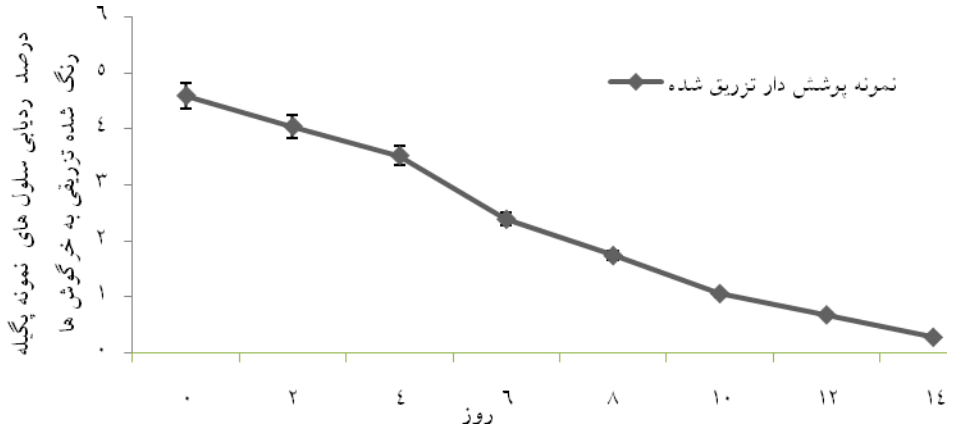
شکل۵ خواص بیوشیمیایی سرم نمونه خرگوشی پس از گذشت ۲٤ ساعت از تزریق

تعیین زمان مؤثر سلول‌های قرمز پوشش‌دار شده خرگوشی در شرایط درون تنی

پایداری و دوام سلول‌های تزریق شده، توسط آزمون فلوسایتومتری در ۷ مرحله بررسی شد. نتایج ردیابی سلول‌های رنگ‌آمیزی شده، پایداری سلول‌های تزریق شده را در سامانه گردش خونی میزبان طی ۱٤ روز نشان داد که در شکل ٦ گزارش شده است. از روز چهارم به بعد، شیب نمودار، نشان دهندهٔ شروع از بین رفتن پوشش پلیمری است. تنش‌های وارد شده به سلول‌ها در حرکت درون‌رگی و همچنین قرار گرفتن در محیط پلاسمای خرگوش، شرایط مؤثر برای کنده شدن پوشش پلیمری را فراهم آورده است. این در حالی است که این شیب، در شرایط نگهداری آزمایشگاهی، از روز نهم به بعد شروع شده است. با وجود در معرض قرار گرفتن سلول‌های پوشش‌دار در برابر عوامل آبکافت پوشش پلیمری در شرایط درون‌تنی، بخش‌هایی از این پوشش تا روز چهاردهم بر سطح سلول‌های قرمز خون خرگوشی باقی ماند و آزمون

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-17]

فلوسایتومتری تا ١٤ روز موفق به ردیابی سلول‌های پوشش‌دار در سامانه گردش خون میزبان شد.



شکل ٦ درصد ردیابی سلول‌های قرمز خرگوشی پگیله و نشان‌دار شده با Pkh-26 تزریق شده به خرگوش‌ها

بحث

با توجه به طول عمر ٣٥ روزه سلول‌های قرمز خون در شرایط نگهداری آزمایشگاهی در کیسه‌های خون، پیش از تزریق، این زمان به‌عنوان دوره ارزیابی کیفیت نمونه‌های پگیله شده در نظر گرفته شد تا بررسی شود که آیا این دوره زمانی برای حفظ پوشش سلول‌های پگیله شده نیز مناسب است یا خیر.

با مقایسه تغییرات تعداد سلول‌های قرمز در نمونه‌های قبل تزریق، با نمونه پوشش‌دار شده و تحلیل نتایج به‌دست آمده از سه روش ارزیابی، زمان ١٨ روز به‌عنوان مناسب ترین زمان برای ذخیره‌سازی نمونه خون پوشش‌دار شده در شرایط بهینه، گزارش شد. این نتیجه بیانگر آن است که آرام آرام این پوشش از دست رفته و نمونه پوشش‌دار به نمونه شاهد نزدیک شده، اما حتی پس از گذشت ٣٣ روز، نمونه پوشش‌دار، شرایط بهتری نسبت به نمونه شاهد دارد. کم شدن تعداد سلول‌های آزاد شمارش شده، نشانه‌ای از کنده شدن پوشش ایجاد شده روی سطح سلول‌ها و انعقاد سلول‌ها با پادتن است.

غلظت پلیمر برای پگیله کردن سلول‌های قرمز، یک عامل بسیار مهم است و ارتباط تنگاتنگی با میزان سطح سلول دارد. سلول‌های قرمز خرگوشی، سطحی به مراتب کوچک‌تر از سلول‌های قرمز انسانی دارند. با توجه به این اختلاف سطح، برای جلوگیری از تغییر شکل و به هم خوردن ساختار غشایی سلول‌های قرمز خرگوشی در اثر غلظت زیاد پلیمر [٢٥، ٢٩] بررسی‌هایی انجام شد. با توجه به درصد سلول‌های با شکل طبیعی، در مقابل سلول‌های خاردار، با ارزیابی تصاویر به‌دست آمده، غلظت مناسب ١٥ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان غلظت مناسب برای پگیله کردن سلول‌های قرمز خون خرگوشی انتخاب شد.

در بررسی پاسخ اولیه سامانه ایمنی میزبان در برابر تزریق سلول های پگیله شده خرگوشی مشخص شد که میزان بیلی‌روبین نمونه RBC پگیله شده، تفاوت قابل ملاحظه‌ای با نمونه کنترل منفی ندارد. اما، میزان این عامل در نمونه کنترل مثبت افزایش یافته، به این دلیل که بیلی‌روبین، از کاتابولیسم گروه هِم زنجیره گلوبین به‌وجود می‌آید و همولیز شدید سلول‌های قرمز، موجب افزایش سطح آن در سرم خون می‌شود. براساس نتایج ارائه شده، میزان خصوصیات بیوشیمیایی گزارش شده برای نمونه های پگیله شده، تفاوت قابل ملاحظه‌ای با نمونه کنترل منفی ندارد و تقریباً در حالت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-17]

طبیعی باقی مانده است. حال آن‌که میزان این خصوصیات، به‌طور قابل توجهی از میزان تعیین شده برای نمونه کنترل مثبت کمتر است. بنابراین، پوشش‌دهی سلول‌های قرمز به‌طور قابل توجهی مانع از تحریک سامانه ایمنی و تخریب آن‌ها توسط میزبان شده است. اما، سلول‌های قرمز بدون پوشش، به شدت توسط سامانه ایمنی میزبان تخریب شده و عوامل بیوشیمیایی را در سرم خون، در سطحی بالاتر از حد طبیعی (کنترل منفی) قرار داده است.

نتایج حاصل در بخش درون‌تنی پژوهش، نشان داد که پوشش پلیمری در شرایط درون‌تنی، در مقابل هجوم سلول‌های سامانه ایمنی میزبان برای از بین بردن سلول‌های قرمز بیگانه، توانسته تا ١٤ روز از سلول‌های قرمز تزریق شده حفاظت کند. باید توجه داشت که این سلول‌های پوشش‌دار تزریق شده به حیوان، سلول‌های پوشش‌دار، بلافاصله پس از پگیله کردن بودند. لازم به یادآوری است که در قسمت برون‌تنی پژوهش، زمان ١٨ روز به عنوان زمان مناسب برای ذخیره‌سازی سلول‌های قرمز پوشش‌دار بیان شد که در این فاصله زمانی به دلیل آبکافت پیوند ایجاد شده، زمان ماندگاری پوشش ایجاد شده روی سطح سلول‌ها در شرایط درون تنی را تحت تأثیر قرار خواهد داد. از این رو، توصیه می‌شود بیشینه زمان نگهداری سلول‌های پگیله تا ٩ روز پس از پگیله کردن در نظرگرفته شود. پس از گذشت ٩ روز، پیش‌بینی می‌شود که زمان مؤثر سلول‌های پگیله شده در شرایط درون‌تنی کاهش یافته و نیاز به تزریق مجدد خون دارد. این نوع فرآیند پوشش‌دهی می‌تواند به‌منظور بر طرف کردن مشکل حساسیت بیماران خاص به گروه‌های فرعی خون و همچنین نیاز به تزریق خون در شرایط حادی که یافتن گروه خونی دهنده سازگار امکان‌پذیر نیست، به‌کار برده شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست پزشکی، مصوب دانشکده مهندسی شیمی است که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. همچنین از سازمان انتقال خون ایران برای همکاری در تهیه نمونه خون مورد نیاز سپاسگزاریم.

منابع

[1] Martin S, Harmening D. Modern Blood Banking and Transplantation Practices. Philadelphia: FA Davis Co, 1994; p: 105-11.

[2] Isbister JP, Shander A, Spahn DR, Erhard J, Farmer SL, Hofmann A. Adverse blood transfusion outcomes: establishing causation. Transfus Med Rev 2011; 25(2): 89-101.

[3] Bradley AJ, Scott MD. Separation and purification of methoxypoly(ethylene glycol) grafted red blood cells via two-phase partitioning. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2004; 807(1): 163-8.

[4] Wang D, Toyofuku WM, Scott MD. The potential utility of methoxypoly(ethylene glycol)-mediated prevention of rhesus blood group antigen RhD recognition in transfusion medicine. Biomaterials 2012; 33(10): 3002-12.

[5] Teramura Y, Iwata H. Cell surface modification with polymers for biomedical studies. Soft Matter 2010; 6: 1081-91.

[6] Bradley AJ, Test ST, Murad KL, Mitsuyoshi J, Scott MD. Interactions of IgM ABO antibodies and complement with methoxy-PEG-modified human RBCs. Transfusion 2001; 41(10): 1225-33.

[7] Fisher TC. PEG-coated red blood cells-

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-17]

simplifying blood transfusion in the new millennium? Immunohematology 2000; 16(1): 37-48.

[8] Pinholt C, Bukrinsky JT, Hostrup S, Frokjaer S, Norde W, Jorgensen L. Influence of PEGylation with linear and branched PEG chains on the adsorption of glucagon to hydrophobic surfaces. Eur J Pharm Biopharm 2011; 77(1): 139-47.

[9] Sarvi F, Vasheghani-Farahani E, Shojaosadati SA, Hashemi-Najafabadi S, Moin M, Pourpak Z. Surface treatment of red blood cells with monomethoxypoly(ethylene glycol) activated by succinimidyl carbonate. Iran Polym J 2006; 15(6): 525-34.

[10] Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. Chemistry for peptide and protein PEGylation. Adv Drug Deliv Rev 2002; 54(4): 459-76.

[11] Fee CJ, Van Alstine JM. PEG-proteins: reaction engineering and separation issues. Chemical Engineering Science 2006; 61(3): 924-39.

[12] Gholami Z, Hashemi-Najafabadi S, Soleimani M. Simultaneous camouflage of major and minor antigens on red blood cell surface with activated mPEGs. Iran J Biotechnol 2014; 12(2): e17776.

[13] Mero A, Schiavon M, Veronese FM, Pasut G. A new method to increase selectivity of transglutaminase mediated PEGylation of salmon calcitonin and human growth hormone. J Control Release 2011; 154(1): 27-34.

[14] Harmening D. Modern Blood Banking and Transfusion Practices. 5th ed. Philadelphia, PA: FA Davis, 2005; p: 242-62.

[15] Le Y, Scott MD. Immunocamouflage: the biophysical basis of immunoprotection by grafted methoxypoly(ethylene glycol) (mPEG). Acta Biomater 2010; 6(7): 2631-41.

[16] Li D, Hu T, Manjula BN, Acharya SA. Non-conservative surface decoration of hemoglobin: influence of neutralization of positive charges at PEGylation sites on molecular and functional properties of PEGylated hemoglobin. Biochim Biophys Acta 2008; 1784(10): 1395-401.

[17] Khambete H, Gautam SP, Karthikeyan C, Ramteke S, Hari Narayana Moorthy NS, Trivedi P. A new approach for PEGylation of dendrimers. Bioorg Med Chem Lett 2010; 20(14): 4279-81.

[18] Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. Current protocols in immunology. Vol. 1, NewYork: John Wiley & Sons, Inc., 1991.

[19] Veronese FM. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. Biomaterials 2001; 22(5): 405-17.

[20] Garratty G. Progress in modulating the RBC membrane to produce transfusable universal/stealth donor RBCs. Transfus Med Rev 2004; 18(4): 245-56.

[21] Gundersen SI, Palmer AF. Conjugation of methoxypolyethylene glycol to the surface of bovine red blood cells. Biotechnol Bioeng 2007; 96(6): 1199-210.

[22] Barani L, Vasheghani-Farahani E, Lazarjani HA, Hashemi-Najafabadi S, Atyabi F. Effect of molecular mass of methoxypoly(ethylene glycol) activated with succinimidyl carbonate on camouflaging pancreatic islets. Biotechnol Appl Biochem 2010; 57(1): 25-30.

[23] Blackall DP, Armstrong JK, Meiselman HJ,

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-17]

Fisher TC. Polyethylene glycol-coated red blood cells fail to bind glycophorin A-specific antibodies and are impervious to invasion by the Plasmodium falciparum malaria parasite. Blood 2001; 97(2): 551-6.

[24] Aghajani-Lazarjani H, Vasheghani-Farahani E, Hashemi-Najafabadi S, Shojaosadati SA, Zahediasl S, Tiraihi T, Atyabi F. Optimization of monomethoxy poly (ethylene glycol) grafting on Langerhans islets capsule using response surface method. Progress in Biomaterials 2013, 2: 7.

[25] Pasut G, Veronese FM. PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: an overview. Adv Drug Deliv Rev 2009; 61(13): 1177-88.

[26] Chen PC, Huang W, Stassinopoulos A, Cheung AT. Effects of pegylated hamster red blood cells on microcirculation. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2008; 36(4): 295-309.

[27] Murad KL, Gosselin EJ, Eaton JW, Scott MD. Stealth cells: prevention of major histocompatibility complex class II-mediated T-cell activation by cell surface modification. Blood 1999; 94(6): 2135-41.

[28] Bradley AJ, Murad KL, Regan KL, Scott MD. Biophysical consequences of linker chemistry and polymer size on stealth erythrocytes: size does matter. Biochim Biophys Acta 2002; 1561(2): 147-58.

[29] Kayden HJ, Bessis M. Morphology of normal erythrocyte and acanthocyte using Nomarski optics and the scanning electron microscope. Blood 1970; 35(4): 427-36.

[30] Thomas L. Clinical Labatory Diagnostics. 1st Edition, Frankfurt: TH-Book Verlagsgesellschaft, 1998; p: 192-202.

[31] Wang D, Kyluik DL, Murad KL, Toyofuku WM, Scott MD. Polymer-mediated immunocamouflage of red blood cells: effects of polymer size on antigenic and immunogenic recognition of allogeneic donor blood cells. Sci China Life Sci 2011; 54(7): 589-98.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-17]