



نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران

دانشگاه علم و صنعت ایران  
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

## بررسی میزان اتصال متوکسی پلی اتیلن گلیکول فعال شده به سطح سلولهای قرمز خون

سمیره هاشمی نجف آبادی<sup>۱\*</sup>، ابراهیم واشقانی فراهانی<sup>۱</sup>، سید عباس شجاع  
الساداتی<sup>۱</sup>، محمد جواد رسائی<sup>۲</sup>

۱. گروه بیوتکنولوژی، بخش مهندسی شیمی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه تربیت  
مدرس، کدپستی ۱۴۳-۱۴۱۱۵، تهران.

۲. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، کدپستی ۳۳۱-۱۴۱۱۵،  
تهران.

*hashemis@modares.ac.ir*

### چکیده

متوکسی پلی اتیلن گلیکول فعال شده (وزن ملکولی ۵۰۰۰) با پیوند کووالانسی به سطح سلولهای قرمز خون انسان متصل شده و اثرات این پوشش محافظ، پس از واکنش سلولها با پادتن های مربوطه، با روش ساده شمارش سلولهای منفرد بررسی شد. اثر متغیرهای فرایند روی میزان اتصال پلیمر به سلولها با روش تاگوچی بررسی شد. شرایط بهینه واکنش عبارتند از: دما، ۱۲ درجه سانتیگراد؛ غلظت پلیمر، ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر و pH، ۱۰.

**کلمات کلیدی:** سلول قرمز خون، متوکسی پلی اتیلن گلیکول، سیانوریک کلرید، پوشش پلیمری.

## مقدمه

پاسخ ایمنی میزبان در برابر سلولهای بیگانه، همواره مهمترین مانع در پیوند سلول و بافت بوده است. مهمترین مثال از رد شدن سلول بیگانه توسط میزبان، انتقال سلولهای قرمز خون (RBC) به فردی با گروه خونی متفاوت است. سطح سلول به عنوان یک مانع مهم بیولوژیکی و بیوشیمیایی عمل می کند. اما در پیوند سلول یا انتقال خون، از یک فرد به فرد دیگر، پروتئینها، کربوهیدراتها و لیپیدهای سطح سلول به عنوان نقاط اصلی و اولیه در رد شدن سلول بیگانه توسط میزبان محسوب می شوند. با کشف Landsteiner در ۱۹۰۱ [۱]، دلیل اصلی این واکنش میزبان شناسایی شد. نمونه خون دهنده ها و گیرنده ها تست شد و ۴ گروه خونی O, A, B, AB - شناسایی شدند. گیرنده و دهنده در نوع گروه خونی باید هماهنگ باشند [۲]. در اغلب فرایندهای انتقال خون، هماهنگی نوع گروه های اصلی، برای شناسایی دهنده مناسب، کافی است. اما در مورد بیماریهایی که تزریق خون مداوم دارند، نظیر بیماران تالاسمی، وجود آنتی ژنهای فرعی سطح سلولهای قرمز خون، شناسایی میزبان مناسب را با مشکل مواجه می کند [۳، ۴، ۵].

بیش از ۲۰ سال قبل، Abuchowski روشی را بر مبنای اتصال کووالانسی پلی اتیلن گلیکول (PEG)، برای حفاظت از پروتئینها در برابر سیستم ایمنی میزبان پیشنهاد داد [۶]. اتصال کووالانسی PEG امروزه برای اصلاح عملکرد انواع پروتئینها، آنزیمها، داروها و سطوح مصنوعی استفاده می شود [۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱]. اما سلولهای قرمز خون، اخیرا به عنوان سوبسترای این واکنش مورد توجه قرار گرفته اند. عموما مشتق متوکسی پلی اتیلن گلیکول (mPEG) با یک عامل هیدروکسیل آزاد استفاده می شود. از میان انواع فعال کننده های شیمیایی که برای اتصال mPEG به سلول استفاده شده اند، می توان به سیانوریک کلرید، سوکسینیمیدیل پروپیونات، بنزوتری آزولیل کربنات و ترسیل کلرید اشاره کرد. تمام این عوامل، عمدتا با گروه های اپسیلون آمینوی لیزین در صفحه پپتیدی خارج سلولی غشاء پلاسمایی واکنش می دهند [۱۲، ۱۳]. سیانوریک کلرید بدلیل پایداری شیمیایی و بازدهی بالا در اصلاح پروتئینها، کاربرد بیشتری داشته است [۱۴].

نقش حمایتی mPEG روی سلولها، ناشی از حرکت سریع و انعطاف پذیری ملکولی زنجیره های هیدراته PEG است [۵]. PEG یک لایه محافظ در اطراف سلولهای قرمز خون ایجاد می کند که ملکولهای بزرگ نظیر پادتن ها را از سلول دور می کند، اما مانع نفوذ ملکولهای کوچک نظیر گلوکز و اکسیژن نمی شود [۲].

تست انعقاد سلولهای قرمز خون، یک واکنش رایج برای تشخیص گروه های خونی است که ناشی از اثر ایمنوگلوبولین های IgM & IgG بر آنتی ژنهای سطحی سلولهای قرمز خون است، که نشان دهنده حضور یک آنتی ژن خاص روی سطح سلول است [۱۶]. فرض می شود که پوشش پلیمری، از لحاظ فیزیکی مانع نزدیک شدن سلولها به یکدیگر شده و در نتیجه امکان اتصال سلولها به یکدیگر، با واسطه پادتن ها، کمتر می شود. لذا میزان انعقاد و توده شدن سلولها کاهش یافته، در نتیجه تعداد سلولهای آزاد افزایش می یابد. در این مطالعه، اتصال mPEG به سلولهای قرمز خون، با بررسی ۳ فاکتور دما و pH و غلظت پلیمر، انجام شد.

## مواد و روشها

### فعال سازی پلیمر

۵ گرم mPEG خشک (به مدت یک شب تحت خلا در ۸۰ درجه سانتیگراد خشک شد) در ۴۰ میلی لیتر بنزن خشک گرم (با تقطیر روی سدیم خشک شد) حل شده و تا ۱۵ درجه سانتیگراد خنک شده و به آرامی به یک محلول سیانوریک کلرید در بنزن (۵ برابر مولی پلیمر) اضافه شد. سپس ۱ گرم انیدروس سدیم کربنات اضافه شد. این مخلوط به مدت ۴۸ ساعت در ۱۵ درجه سانتیگراد، تحت جریان ملایم نیتروژن هم زده شد. سپس سدیم کربنات با فیلتراسیون تحت خلا جدا شد. مشتق فعال شده mPEG، با افزودن حجم زیادی سیکلوهگزان خشک به مایع بدست آمده، رسوب کرد و با فیلتراسیون تحت خلا جدا شده و مجدداً در بنزن حل شد. این مراحل ۵ مرتبه تکرار شد تا کلیه سیانوریک کلریدهای واکنش نداده حذف شدند [۱۷، ۱۸]. محصول بدست آمده تحت خلا خشک شده و در ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد [۱۹].

### پوشش سلولهای قرمز خون با پلی اتیلن گلیکول

خون (نوع B<sup>+</sup>) از داوطلبان سالم، روی سترات سدیم جمع آوری شد. سلولهای قرمز خون جدا شده، دو مرتبه در بافر فسفات شسته شده و تا ۱۰٪ در بافر تری اتانول آمین سوسپانسیون شدند. محلول تازه mPEG فعال شده، بلافاصله پیش از استفاده، در آب مقطر حاوی ۰/۹٪ کلرید سدیم و ۱ میلی مولار اسید کلریدریک تهیه شده و به سوسپانسیون RBC اضافه شد [۱۸، ۲۰، ۲۱]. نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط واکنش داده و پس از دو مرتبه شستشو با بافر فسفات، ۱۰ دقیقه در ۲۰۰g، [۲۰] برای مرحله بعد آماده شدند.

### انعقاد RBC با پادتن گروه B

این تست به منظور ارزیابی میزان مهار واکنش پادتن گروه B با سلول، توسط اتصال کووالانسی پلیمر به سلول، انجام شد. ۴۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون ۰/۶٪ از سلولهای قرمز خون (شاهد یا پوشش داده شده) با محلول پادتن B (با رقت ۱/۴) در بافر فسفات مخلوط شده و با اختلاط ملایم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق مجاور شدند. سپس سلولهای قرمز خون در ۲۰۰g به مدت ۱ دقیقه رسوب کردند. ۱ میکرو لیتر از سلولهای رسوب کرده در ۱۰۰۰ میکرو لیتر بافر فسفات سوسپانسیون شد. پس از رنگ آمیزی سلولها با تریپان بلو (سلولهای مرده، آبی شده و سلولهای زنده بی رنگ باقی می ماندند)، روی لام نئوبار و زیر میکروسکوپ نوری، سلولهای منفرد زنده در ۵ خانه لام (۴ تا ۴ گوشه و یکی در وسط لام) شمارش شدند. هرچه تعداد سلولهای منفرد بیشتر باشد، نشانه درجه بالاتر اتصال پلیمر به سطح سلول است.

### طراحی تاگوچی

یک آرایه M16 [۲۲] برای ۳ متغیر در ۴ سطح (جدول ۱) طراحی شد. ۱۶ آزمایش با دو تکرار اجرا شد.

جدول ۱- متغیرهای فرایند با مقادیر مربوطه در ۴ سطح برای طراحی تاگوچی.

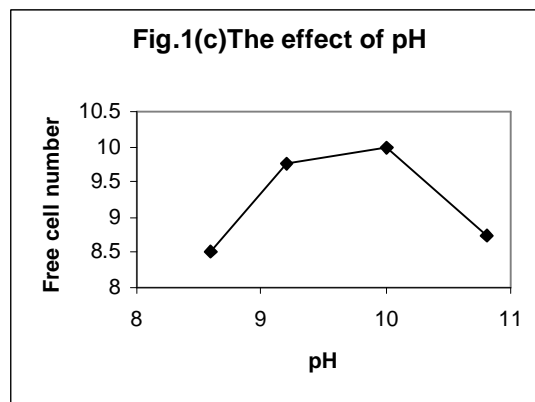
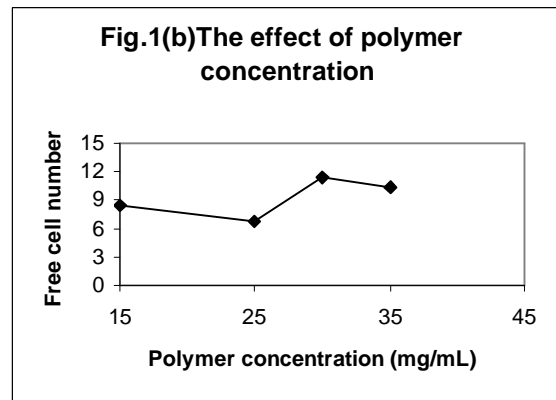
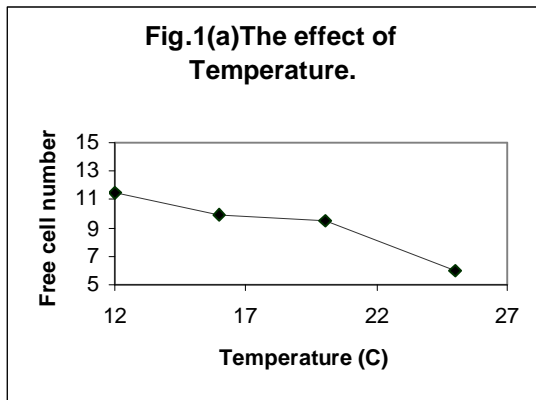
| سطح ۴ | سطح ۳ | سطح ۲ | سطح ۱ | متغیر                                      |
|-------|-------|-------|-------|--|
| ۲۵    | ۲۰    | ۱۶    | ۱۲    | دمای واکنش (°C)                            |
| ۳۵    | ۳۰    | ۲۵    | ۱۵    | غلظت پلیمر در بافر تری اتانول آمین (mg/mL) |
| ۱۰/۸  | ۱۰    | ۹/۲   | ۸/۶   | PH بافر تری اتانول آمین                    |

## نتایج و بحث

داده های بدست آمده، با استفاده از نرم افزار 4 - qualitek بررسی شدند. اثرات اصلی متغیرهای فرایند روی میزان اتصال پلیمر به سلولهای قرمز خون (تعداد سلولهای زنده منفرد) در شکل ۱ نشان داده شده است. این شکل نشان می دهد که با افزایش دما، تعداد سلولهای منفرد کاهش می یابد. این نتیجه احتمالا به فعالیت پایین پلیمر فعال شده در دماهای بالا مربوط می شود (قبلا اشاره شد که دمای نگه داری این پلیمر ۷۰- درجه سانتیگراد است). همانگونه که تصور می شد، با افزایش غلظت پلیمر تا ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر، تعداد سلولهای منفرد افزایش یافتند. اما با افزایش بیشتر غلظت پلیمر، تعداد سلولهای منفرد کمی کاهش یافت. این نتیجه احتمالا مربوط به اثرات معکوس پلیمر روی بازدهی واکنش می تواند باشد. تعداد سلولهای منفرد، با افزایش pH محیط واکنش تا ۱۰ افزایش یافت، اما افزایش بیشتر pH، باعث کاهش تعداد سلولهای منفرد شد. این نتیجه می تواند به کاهش تعداد گروههای  $\text{NH}_3^+$  - اسید آمینه لیزین، با نقطه ایزوالکتریک ۹/۷۴، روی سطح RBC مربوط شود. آنالیزهای آماری نشان دادند که شرایط بهینه واکنش عبارتند از: دما، ۱۲ °C؛ غلظت پلیمر، ۳۰ mg/mL و pH، ۱۰. پاسخ بدست آمده در شرایط بهینه از لحاظ تئوری، ۱۴/۵ است که با پاسخ تجربی بدست آمده در این شرایط، ۱۴، مطابقت دارد.

## نتیجه گیری

در این مطالعه، mPEG-5000 فعال شده با سیانوریک کلرید، با پیوند کووالانسی به سلولهای قرمز خون متصل شده و شرایط بهینه واکنش، تعیین شد. دمای بهینه بدست آمده، ۱۲ °C، با نظر سایر محققین که یا یک دمای خنک ۴ °C [۲۳،۲۲] و یا دمای ملایم اتاق [۲۴،۲۰] را پیشنهاد داده اند، مطابقت دارد. غلظت بهینه پلیمر، ۳۰ mg/mL بدست آمد. مطالعات دیگر نیز نشان داده اند که با افزایش غلظت پلیمر تا ۲۵ mg/mL بازدهی واکنش افزایش می یابد [۲۰]. pH بهینه ۱۰ بدست آمد. اما این پاسخ، نزدیکی زیادی به پاسخ بدست آمده در pH برابر ۹/۲ که در سایر مطالعات به عنوان بهترین pH واکنش معرفی شده است [۲۳،۲۲]، دارد. در نهایت می توان نتیجه گرفت که روش شمارش سلولهای منفرد، یک روش مناسب برای ارزیابی میزان اتصال پلیمر به سلول می باشد.



شکل ۱- اثر متغیرهای فرایند روی میزان اتصال پلیمر به سلولهای قرمز خون.

## منابع و مراجع

1. Landsteiner K. Uber agglutinationserscheinungen normalen menslichen blutes. Wien Klin. Wochenschr. , 14:1132-1134, 1901.
2. Lublin D.M. Universal RBCs. Transfusion , 40:1285-1289, 2000.
3. Castro O., Sandler S.G., Houston-Yu P., Rana S. Predicting the effect of transfusing only phenotype-matched RBCs to patients with sickle cell disease: theoretical and practical implications. Transfusion. , 42(6):684-690, 2002.
4. Rosse W.F., Gallagher D., Kinney T.R., Castro O., Dosik H., Moohr J., Wang W., Levy P.S. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Blood. , 76(7):1431-1437, 1990.
5. Vichinsky E.P., Earles A., Johnson R.A., Hoag M.S., Williams A., Lubin B. Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion of racially unmatched blood. New England Journal of Medicine. , 322(23):1617-1621, 1990.
6. Abuchowski A., Es T.V., Palczuk N.C. and Davis F.F. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. J. Biol. Chem. , 252:3578-3581, 1977.
7. Greenwald R.B., Choe Y.H., McGuire J., Conover C.D. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. Advanced Drug Delivery Reviews. , 55(2):217-250, 2003.
8. Harris J.M. Poly (ethylene glycol) chemistry: Biotechnical and biomedical applications; Plenum Press, New York., 1992.
9. Hershfield M.S. PEG-ADA replacement therapy for adenosine deaminase deficiency: an update after 8.5 years. Clin. Immunol. Immunopathol. , 76:S228-S232, 1995.
10. Keating M.J., Holmes R., Lerner S., Ho D.H. L-asparaginase and PEG asparaginase-past, present, and future. Leuk. Lymphoma , 10(Suppl):153-157, 1993.
11. Thanou M. and Duncan R. Polymer-protein and polymer-drug conjugates in cancer therapy. Current Opinion in Investigational Drugs. , 4(6):701-709, 2003.
12. Chen A.M. and Scott M.D. Current and future applications of immunological attenuation via PEGylation of cells and tissue. BioDrugs , 15:833-847, 2001.
13. Fisher T.C. PEG-coated red blood cells – simplifying blood transfusion in the new Millennium? Immunohematology , 16(1):37-46, 2000.

14. Scott M.D. and Murad K.L. Cellular camouflage: Fooling the immune system with polymers. *Curr. Pharmac. Des.* , 4:423-438, 1998.
15. Scott M.D. and Chen A.M. Beyond the red cell: PEGylation of other blood cells and tissues. *Trans. Clini. et Biol.* , 11:40-46, 2004.
16. Turgeon M.L. Fundamentals of immunohematology. Williams & Wilkins. Veronese F.M. and Morpurgo M. Bioconjugation in pharmaceutical chemistry. *Farmaco.* , 54:497-516, 1995.
17. Armstrong J.K., Meiselman H.J., and Fisher T.C. Evidence against macromolecular "bridging" as the mechanism of red blood cell aggregation induced by nonionic polymers. *Biorheology* , 36:433-437, 1999.
18. Neu B., Armstrong J.K., Fisher T.C., Baumler H. and Meiselman H.J. Electrophoretic mobility of human red blood cells coated with poly (ethylene glycol). *Biorheology* , 38:389-403, 2001.
19. Sabolovic D., Sestier C., Perrotin P., Guillet R., Tefit M. and Boynard M. Covalent binding of polyethylene glycol to the surface of red blood cells as detected and followed up by cell electrophoresis and rheological methods. *Electrophoresis* ,21:301-306, 2000.
20. Blackall D.P., Armstrong J.K., Meiselman H.J. and Fisher T.C. 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* , 97:551- 556, 2001.
21. Logothetis N. and Wynn H.P. Quality through design. Oxford University Press.,1989.
22. Murad B.L., Mahany K.L., Brugnara C., Kuypers F.A., Eaton J.W. and Scott M.D. Structural and functional consequences of antigenic modulation of red blood cells with methoxypoly(ethylene glycol). *Blood* , 93: 2121-2127, 1999.
23. Scott M.D., Murad K.L., Koumpouras F., Talbot M. and Eaton J.W. Chemical camouflage of antigenic determinants: Stealth erythrocytes. *Proc .Natl. Acad. Sci.USA*, 94:7566-7571, 1997.
24. Bradley A.J., Murad K.L., Regan K.L. and Scott M.D. Biophysical consequences