



پوشش دهی سطح سلول های جزایر لانگرهانس با پلی اتیلن گلیکول فعال شده

سمیره هاشمی نجف آبادی^۱، ابراهیم واشقانی فراهانی^{۱*}، سید عباس شجاع الساداتی^۱، یاسوهیرو ایواناگا^۲

۱- تهران، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی ۱۴۱۱۵/۱۴۳

۲- کیوتو، بیمارستان دانشگاه کیوتو، گروه ایمونولوژی کاشت

دریافت: ۸۶/۲/۵، پذیرش: ۸۶/۷/۱۷

چکیده

درمان قطعی بیماری دیابت، کاشت سلول های جزایر لانگرهانس است. از روش هایی که برای حفاظت ایمنی شناختی سلول های پیوندی در سال های اخیر پیشنهاد شده است، پوشش دهی سطح سلول ها با پلی اتیلن گلیکول است. در این پژوهش، سطح سلول های جزایر لانگرهانس با متوکسی پلی اتیلن گلیکول فعال شده با سیانوریک کلرید پوشش داده شد. اثر این پوشش پلیمری در مدت زمان واکنش و غلظت های پلیمر متفاوت، با بررسی های ایمنی شناختی و شکل شناختی سلول ها ارزیابی شد. مشاهدات تجربی نشان دادند، پاسخ ایمنی شناختی در برابر سلول های پوشش داده شده، در مقایسه با حالت کنترل، ۴۷-۷۶/۵ درصد کاهش یافت. همچنین، این سلول ها از نظر شکل ظاهری نیز پایدارترند.

واژه های کلیدی

سلول های جزایر لانگرهانس،
متوکسی پلی اتیلن گلیکول،
سیانوریک کلرید، لمفوسیت ها،
پوشش پلیمری

* مسئول مکاتبات، پیام نگار:

evf@modares.ac.ir

Surface Coating of Islets of Langerhans by Activated Polyethylene Glycol

S. Hashemi Najafabadi¹, E. Vasheghani-Farahani^{1*}, S.A. Shojasadati¹ and Y. Iwanaga²

1. Tarbiat Modares University, P.O. Box: 14115/143, Tehran, Iran

2. Department of Transplantation Immunology, Kyoto University Hospital, Japan

Abstract

The final treatment for diabetes is transplantation of islets of Langerhans. One of the new proposed methods for immunological preservation of transplanted cells is coating of cell surface by polyethylene glycol. In this study, the surface of islets of Langerhans was coated by cyanuric chloride activated methoxy polyethylene glycol. The effect of polymer coating, at two different reaction times and polymer concentrations, by immunological and morphological tests on the cells, was studied. A decrease of 47-76.5% in the immunological response against the coated cells, in comparison to control samples, was observed. Also, morphologically, these coated cells were more stable.

Key Words

islets of Langerhans,
methoxy polyethylene glycol,
cyanuric chloride, lymphocytes,
polymer coating

(* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: evf@modares.ac.ir

مقدمه

پیوند سلول به عنوان یک راه حل نهایی، به منظور جایگزینی عضو یا ترمیم بافت، در درمان انواع بیماری‌ها نظیر دیابت و پارکینسون پیشنهاد شده است [۱-۳]. دیابت بیماری متابولیکی است که ۵-۲ درصد از جمعیت بزرگ سال را در کشورهای پیشرفته تحت تأثیر قرار داده است [۴]. بر اساس گزارش وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی ایران، در سال ۱۳۸۱، شیوع دیابت در کل جمعیت کشور، ۵-۲ درصد و در افراد بالای ۳۰ سال، ۷/۳ درصد برآورد شده است که این نسبت در حال افزایش است [۵].

امید به درمان دیابت در اوایل دهه ۱۹۲۰، با استخراج انسولین از حیوانات افزایش یافت. تا چند دهه پس از آن، اغلب مردم می‌پنداشتند که تزریق‌های روزانه این هورمون، معادل با بهبودی واقعی است. اما پس از سال‌ها، پزشکان کم‌کم متوجه شدند که بسیاری از بیماران، در نهایت از عوارض این بیماری رنج می‌برند. دلیل بروز این مشکلات، غلظت زیاد گلوکوز در خون است. آشکار است که تزریق انسولین قادر نیست به طور دقیق، در ترشح میزان انسولین مورد نیاز مشابه لوزالمعده طبیعی عمل کند [۶-۸].

درمان قطعی دیابت، کاشت سلول‌های جزایر لانگرهانس است [۲،۸]. اما وقتی بدن یک موجود زنده، با یک ماده پادتن بیگانه، در اثر تزریق یا عفونت رو به رو می‌شود، مجموعه پیچیده‌ای از واکنش‌های سامانه ایمنی رخ می‌دهد [۳،۹]. برای اجتناب از پاسخ ایمنی شناختی میزبان، داروهای متوقف‌کننده پاسخ ایمنی برای بیماران تجویز می‌شود. اما مصرف طولانی مدت این داروها، آثار جانبی خطرناکی مانند عفونت، سرطان و نقص کلیه را به دنبال دارند [۱۰-۱۲، ۲، ۳]. سلول‌ها و بافت‌های جایگزین، با سامانه‌هایی که آنها را در برابر قدرت مخرب واکنش‌های ایمنی میزبان محافظت می‌کنند، امید بیشتری را برای بهبود سلامتی عمومی فراهم کرده‌اند. زمینه توسعه این جایگزین‌ها، با فناوری مهندسی بافت فراهم می‌شود [۱۳]. یکی از روش‌های حفاظت ایمنی شناختی که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است، پوشش دادن پادتن‌های سطح سلول‌ها، با پلی‌اتیلن گلیکول است. بر اساس نتایج ارائه شده برای اصلاح پروتئین‌ها با متوکسی پلی‌اتیلن گلیکول (mPEG)، فرض شده است که اگر این پلیمر به سطح سلول‌ها پیوند زده شود، می‌تواند با حرکت زنجیرهای بسیار آب‌دار خود، مانع از نزدیک شدن اجزای سامانه ایمنی میزبان به سلول‌های پیوندی شده و از آنها حمایت کند [۱۴، ۲، ۳]. برای سلول‌های جزایر لانگرهانس، mPEG روی شبکه کلاژن غشای کپسول آنها پیوند زده می‌شود که پروتئین‌های پایدارتری دارد. سلول‌های جزایر لانگرهانس موش، سگ و انسان،

غشای کپسولی دارند و می‌توانند با mPEG اصلاح شوند [۶]. در این پژوهش برای نخستین بار، mPEG با وزن مولکولی ۵ کیلو دالتون که در مطالعات پیشین، نتیجه مطلوبی را در اتصال به سطح سلول‌های قرمز خون [۱۵] و جزایر لانگرهانس نشان داده بود، با استفاده از فعال‌کننده سیانوریک کلرید به سطح کپسول سلول‌های جزایر لانگرهانس موش پیوند زده شد. اثر متغیرهای فرایند، با بررسی‌های ایمنی‌شناختی و شکل‌شناسی ارزیابی شده و با نتایج به دست آمده از سایر فعال‌کننده‌ها مقایسه شد.

تجربی

مواد

در این پژوهش، موش‌های نر نوع Balb/c و C57B1/6 با ۱۲ هفته سن و ۲۵-۳۰ g وزن از شرکت Shimizu ژاپن تهیه شدند. همچنین، از ماده بیهوشی ایزوفلوران، آنزیم کلاژناز، متوکسی پلی‌اتیلن گلیکول فعال شده با سیانوریک کلرید با وزن مولکولی ۵ کیلو دالتون، Fetal calf serum (FCS)، اسیدهای آمینه غیر ضروری، Acridine orange (AO) و Propidium iodide (PI) ساخت شرکت Sigma، محلول نمکی HBSS، محیط کشت RPMI و آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین ساخت شرکت GIBCO و کیت الیزای موشی ساخت شرکت eBioscience استفاده شد.

روش‌ها

جداسازی سلول‌های جزایر لانگرهانس موشی

موش‌های نر نوع Balb/c با ۱۲ هفته سن و ۲۵-۳۰ g وزن، ابتدا با استفاده از ترکیب ایزوفلوران بیهوش شده و سپس مراحل جداسازی لوزالمعده و جداسازی و خالص‌سازی سلول‌های جزایر لانگرهانس با کمک آنزیم کلاژناز اجرا شدند.

واکنش فعال‌سازی mPEG با سیانوریک کلرید

در واکنش فعال‌سازی، روش آبوچوسکی [۱۶] به شکل اصلاح شده به کار برده شد. ابتدا ۳ g از mPEG (۵ کیلو دالتون) به مدت ۱۲ h زیر خلاء، در دمای ۸۰°C خشک شد. پس از حل کردن پلیمر خشک شده در ۱۴ mL بنزن خشک داغ و خنک شدن آن تا دمای ۱۵°C، محلول ۰/۵۵ g سیانوریک کلرید (۵ برابر مولی پلیمر) در ۱۰ mL بنزن، به آرامی با آن مخلوط شد. سپس ۰/۶ g کربنات سدیم بدون آب به این محلول اضافه

بررسی واکنش‌های ایمنی سلول‌های جزایر لانگرهانس با سلول‌های

مخلوط لمفوسیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی

سلول‌های لمفوسیت جدا شده با جزایر لانگرهانس پوشش داده شده با پلیمر، در شرایط آزمایشگاهی در پلیت ۹۶ خانه‌ای درب‌دار و دمای 37°C و ۵ درصد گاز CO_2 مجاور شدند تا میزان ترشح اینترلوکین ۲ (IL-۲) (مهم‌ترین پیامبر میان لمفوسیت‌ها، در زمان شناسایی سلول‌های بیگانه) توسط لمفوسیت‌ها (با استفاده از کیت الایزای موشی) و همچنین تعداد لمفوسیت‌های تکثیر شده، در حضور سلول‌های بیگانه بررسی شوند.

طراحی آزمایش‌ها

بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی‌های پیشین روی سلول‌های قرمز خون [۱۵]، دمای واکنش کمتر از 20°C ، برای اتصال این نوع پلیمر فعال شده به سلول‌های جزایر لانگرهانس در نظر گرفته شد. pH محلول HBSS به دلیل حساس بودن این نوع سلول به تغییرات شدید pH (۷/۶) نیز ثابت فرض شد. بنابراین، اثر دو متغیر مدت زمان واکنش (در دو سطح ۳۰ و ۹۰ min) و غلظت پلیمر (در دو سطح ۴ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعلیق سلولی) بررسی شدند. طراحی آزمایش‌ها در جدول ۱ بیان شده است. سلول‌های جزایر لانگرهانس، که در شرایط بیان شده در جدول ۱ با mPEG واکنش دادند، به منظور ارزیابی کارایی پوشش پلیمری با لمفوسیت‌ها مجاور شده و میزان ترشح IL-۲ توسط لمفوسیت‌ها با استفاده از کیت الایزا تخمین زده شد [۲۰].

نتایج و بحث

اتصال پلیمر فعال شده به سلول‌های جزایر لانگرهانس

در این بررسی، جزایر لانگرهانس موشی، به دلیل شباهت موجود، به عنوان مدلی برای نمونه انسانی استفاده شده است. در هر دو مورد، جزایر

جدول ۱- طراحی فاکتوریل کامل، با دو متغیر در دو سطح برای سلول‌های جزایر لانگرهانس.

شماره آزمایش	مدت زمان واکنش (min)	غلظت پلیمر (mg/mL)
۱	۳۰	۴
۲	۹۰	۴
۳	۳۰	۴۰
۴	۹۰	۴۰

شد. مخلوط به دست آمده، به مدت ۴h در دمای 15°C و زیر جریان گاز نیتروژن هم زده شد. سپس مخلوط واکنش، صاف شد تا کربنات سدیم حذف شود. مشتق فعال شده mPEG، با افزودن مقادیر زیادی سیکلو هگزان خشک رسوب کرده و با صافی زیر خلاء جمع‌آوری شد. رسوب به دست آمده، حداقل ۵ مرتبه در بنزن حل و با سیکلو هگزان بازیابی شد تا سیانوریک کلرید (واکنش نداده) حذف شود [۱۷]. محصول به دست آمده، به صورت پودر سفید رنگ، تحت خلاء خشک شده و در دمای 70°C - نگهداری شد [۱۸، ۱۹].

واکنش اتصال mPEG فعال شده به سطح سلول‌های جزایر لانگرهانس

سلول‌های جزایر لانگرهانس خالص شده، در دمای 4°C ، با سرعت ۱۰۰۰ rpm به مدت ۱ min سانتریفوژ شده و با محلول نمکی HBSS شسته شدند. تعلیق سلولی، با غلظت ۱۵۰ جزیره در ۵۰۰ mL HBSS، به طور مستقیم به mPEG فعال شده با سیانوریک کلرید، با غلظت مورد نظر اضافه شده و در دمای معمولی و مدت زمان لازم گرماگذاری شدند (غلظت پلیمر و مدت زمان واکنش، در بخش طراحی آزمایش‌ها بیان می‌شود). سپس، سلول‌ها ۳ مرتبه در شرایط یاد شده، سانتریفوژ شده و با محیط کشت RPMI، حاوی ۱۰ درصد FCS، ۱ درصد اسیدهای آمینه غیر ضروری و ۲ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین شسته شده و در این محلول تعلیق شدند [۲۰، ۲۱].

بررسی زنده بودن سلول‌های جزایر لانگرهانس

بررسی زنده بودن سلول‌های جزایر لانگرهانس، به وسیله رنگ آمیزی با رنگ‌های فلورسنتی Acridine orange (AO) و Propidium iodide (PI) انجام شد. یک حجم تعلیق سلولی با ۲۵ درصد حجمی محلول رنگی (AO از $0.67 \mu\text{mol/L}$ و PI از $75 \mu\text{mol/L}$) مخلوط شده و با میکروسکوپ نوری مجهز به آشکارساز UV بررسی شد. با این روش، سلول‌های زنده، سبز رنگ و سلول‌های مرده قرمز رنگ می‌شوند [۲۰، ۲۱].

جداسازی مخلوط لمفوسیت‌های موشی

موش‌های نر نوع C57B1/6 با ۱۲ هفته سن و ۲۵-۳۰g وزن، با بخارات دی‌اتیل اتر کشته شدند. سپس طحال حیوان به آرامی جدا شده و در محلول HBSS، حاوی ۱ درصد FCS، روی یخ قرار داده شد. طحال‌ها، درون محلول، روی صافی ۲۰۰ میکرومتری فشرده شدند. تعلیق به دست آمده، در دمای 4°C ، با سرعت ۳۰۰-۴۰۰ xg به مدت ۵ min، سانتریفوژ شد. رسوب حاصل با بافر لیزکننده سلول‌های قرمز خون مخلوط شده و به مدت ۵ min در یخ نگهداری شد. سپس، نمونه‌ها، ۲ مرتبه با محیط کشت RPMI شست و شو داده شدند تا مخلوط لمفوسیت‌ها به دست آید.

جدول ۲- نتایج واکنش های مخلوط لمفوسیت ها با سلول های جزایر لانگرهانس الف.

مدت زمان (روز) ب	سلول های لمفوسیت کنترل ج	سلول های جزایر لانگرهانس کنترل د	واکنش ۱ ه (۴ mg/mL و ۳۰ min)	واکنش ۲ (۴ mg/mL و ۹۰ min)	واکنش ۳ (۴۰ mg/mL و ۳۰ min)	واکنش ۴ (۴۰ mg/mL و ۹۰ min)
۲	۱۷/۳	۲۳/۳	۲۷/۶	۴۹/۲	۳۷/۷	۱۵/۲
۴	۲۷/۸	۲۷/۲	۳۰/۰	۸۶/۲	۴۶/۵	۲۷/۶
۶	۱۶/۰	۸/۰	۷/۰	۱۹/۵	۲۵/۶	۴/۶

الف) پاسخ ها، به شکل میزان IL-۲ (pg/mL) ترشح شده توسط سلول های لمفوسیت بیان شده اند، ب) تعداد روزهای پس از شروع گرمگذاری لمفوسیت ها با سلول های کنترل یا پوشش داده شده با پلیمر، ج) حالت پایه که لمفوسیت ها با هیچ سلول بیگانه ای تحریک نشده اند، د) حالتی که سلول های جزایر لانگرهانس بدون پوشش پلیمری با لمفوسیت ها مجاور شده اند و ه) سلول های جزایر لانگرهانس، مطابق واکنش های ۱ تا ۴ بیان شده در جدول ۱ با پلیمر پوشانده شده و با لمفوسیت ها مجاور شده اند.

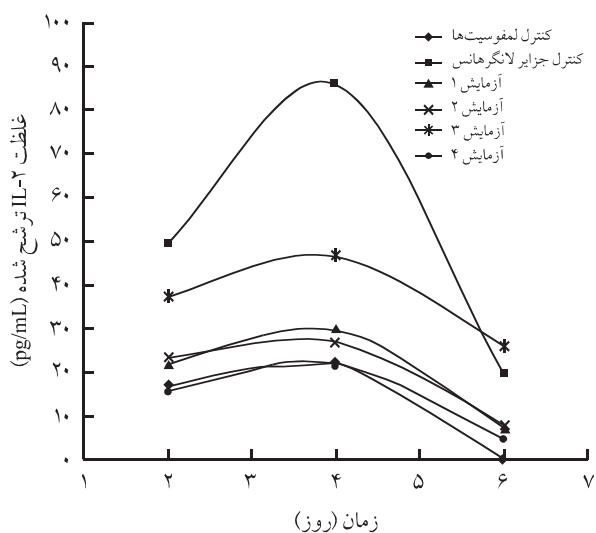
نتایج واکنش های مخلوط لمفوسیت ها با سلول های جزایر لانگرهانس، که مطابق شرایط بیان شده در جدول ۱ با پلیمر پوشش داده شده بودند، در جدول ۲ و شکل ۱ بیان شده اند. پاسخ ها، میزان IL-۲ ترشح شده از لمفوسیت ها، به صورت میانگین ۳ تکرار اند. منحنی کنترل لمفوسیت ها، بیانگر حالت پایه، بدون تحریک است. منحنی کنترل جزایر لانگرهانس، پاسخ لمفوسیت ها را در برابر سلول های جزایر لانگرهانس، بدون پوشش پلیمری نشان می دهد و منحنی های مربوط به آزمایش های ۱ تا ۴، پاسخ لمفوسیت ها را در برابر سلول های جزایر لانگرهانس که بر اساس جدول ۱، با پلیمر پوشانده شده اند، بیان می کنند.

نتایج حاکی از آن است که لمفوسیت ها حدود دو روز زمان نیاز دارند تا سلول های جزایر لانگرهانس بیگانه را شناسایی کنند. روزهای سوم و

لانگرهانس یک کپسول غشای خارجی دارند که پروتئین های سطح غشای این کپسول، هدف اصلاح با پلیمر هستند. پروتئین های این غشا، نسبت به پروتئین های غشای سلولی پایدارتر بوده و شدت جایگزینی آنها کمتر است. بنابراین، پوشش پلیمری مدت زمان بیشتری حفظ می شود [۶]. زنجیرهای پلیمری به درون جزایر لانگرهانس نفوذ نمی کنند، بلکه با کپسول کلاژنی آنها پیوند برقرار می کنند. در نتیجه، پلیمر نمی تواند با سلول های داخل جزایر واکنش دهد [۲۰].

بررسی واکنش های ایمنی سلول های جزایر لانگرهانس با سلول های مخلوط لمفوسیت ها در شرایط آزمایشگاهی

سلول های بیگانه یا به طور مستقیم توسط سلول های سامانه ایمنی میزبان، به عنوان پادتن شناخته شده یا در اثر آزاد شدن و تماس پروتئین های سطحی یا ترشحی خود با سلول های ایمنی تماس برقرار می کنند. پس از این شناسایی اولیه، لمفوسیت ها فعال شده و انواع سیتوکین ها (مانند IL-۲) را ترشح می کنند که باعث فعال شدن و تکثیر سایر لمفوسیت ها شده و تخریب سلول های بیگانه (جزایر لانگرهانس) را به آنها القا می کند. اما، پوشش دادن سطح سلول های جزایر لانگرهانس با mPEG، از سلول ها در برابر سامانه ایمنی حمایت می کند. اثر حمایتی این نوع پلیمر، به طور عمده ناشی از حجم فضای بزرگ اشغال شده به وسیله زنجیرهای بسیار آبدار، انعطاف پذیر و متحرک mPEG در اطراف سلول است. این پوشش پلیمری، به طور مؤثری از تماس سلول - سلول با لمفوسیت ها و نیز آزاد شدن آنتی ژن های سطح سلول های پیوندی (جزایر لانگرهانس) جلوگیری می کند. در نتیجه ترشح IL-۲ کم شده، لمفوسیت ها کمتر تکثیر شده و امکان شناسایی سلول های جزایر لانگرهانس کمتر می شود. افزون بر این، پوشش پلیمری بار الکتریکی خالص سلول ها را می پوشاند که این عامل نیز از تماس سلول - سلول جلوگیری می کند [۲۰، ۲۲].



شکل ۱- نمودار اثر پوشش پلیمری بر سطح سلول های جزایر لانگرهانس، در حضور لمفوسیت ها.

جدول ۳- تعداد لمفوسیت‌های زنده، پس از ۷ روز مجاورت با جزایر لانگرهانس.

نوع واکنش انجام شده در هر چاهک	سلول‌های لمفوسیت کنترل الف	سلول‌های جزایر لانگرهانس کنترل ب	واکنش ۱ ج	واکنش ۲	واکنش ۳	واکنش ۴
تعداد لمفوسیت‌های زنده (×۱۰ ^{-۵})	۰/۶۴	۱/۶۰	۱/۳۹	۱/۳۹	۰/۸۵	۰/۶۴

(الف) حالت پایه که لمفوسیت‌ها با هیچ سلول بیگانه‌ای تحریک نشده‌اند، (ب) حالتی که سلول‌های جزایر لانگرهانس، بدون پوشش پلیمری با لمفوسیت‌ها مجاور شده‌اند و (ج) سلول‌های جزایر لانگرهانس، مطابق واکنش‌های ۱ تا ۴ بیان شده در جدول ۱ با پلیمر پوشانده شده و با لمفوسیت‌ها مجاور شده‌اند.

بین سلولی، به شدت تکثیر شده و بیشترین رشد را دارند. البته شایان یادآوری است که نتایج شمارش لمفوسیت‌های زنده، یک پاسخ تقریبی است، زیرا این احتمال وجود دارد که تعدادی از لمفوسیت‌ها به درون کپسول جزایر لانگرهانس نفوذ کرده یا برخی سلول‌های جزایر لانگرهانس، پس از پارگی غشای کپسول، وارد محیط اطراف شده‌اند و امکان جداسازی دقیق این دو دسته سلول از یک دیگر وجود ندارد.

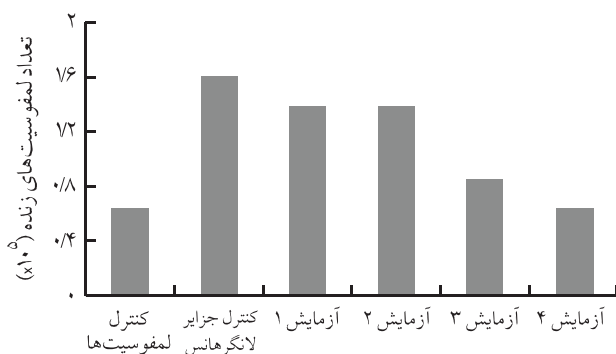
بررسی شکل ظاهری سلول‌های جزایر لانگرهانس

نتایج بررسی شکل ظاهری سلول‌های جزایر لانگرهانس، کنترل (بدون پوشش پلیمری) و با پوشش پلیمری، پس از مجاورت با لمفوسیت‌ها با میکروسکوپ نوری، به ترتیب در شکل‌های ۷-۳ ارائه شده‌اند. شکل ۳ نشان‌دهنده شکل ظاهری سلول‌های کنترل (بدون پوشش پلیمری) جزایر لانگرهانس، پس از ۴ روز مجاورت با لمفوسیت‌هاست. تجمع لمفوسیت‌هایی که سلول‌های بیگانه را شناسایی کرده و تکثیر شده‌اند، در اطراف جزایر لانگرهانس و تهاجم به سمت آنها به طور کامل مشهود است. در یک مورد، مشاهده می‌شود که لمفوسیت‌ها توانسته‌اند غشای کپسول‌ها را پاره کرده و وارد جزایر شوند. اشکال ۷-۴ به ترتیب، نمایانگر شکل ظاهری سلول‌های جزایر لانگرهانس هستند که بر

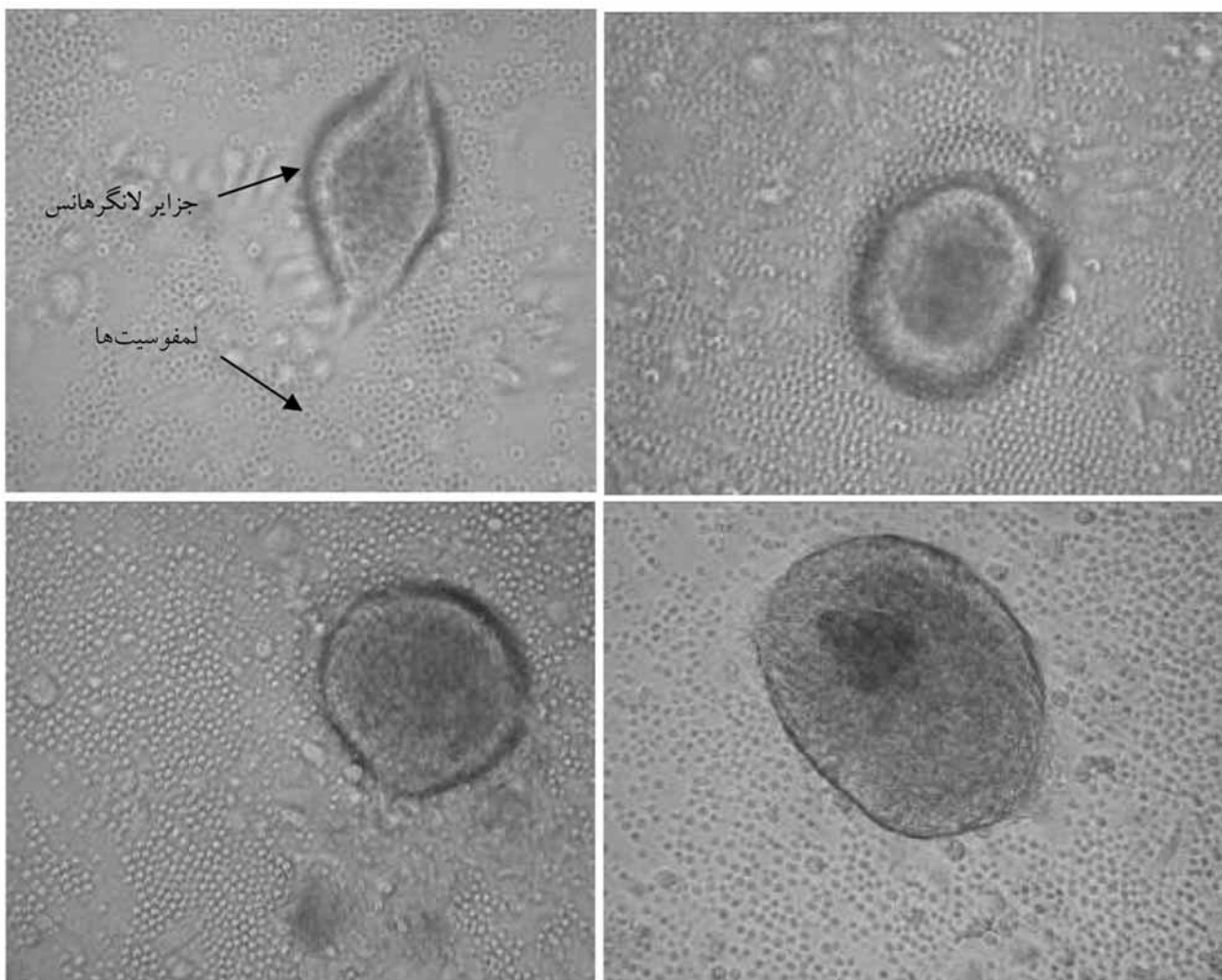
چهارم پس از گرماگذاری، بیشترین ترشح IL-۲ (به عنوان مهم‌ترین واسطه پیامبر بین لمفوسیت‌ها) مشاهده شده و روزهای پنجم تا ششم، به طور تقریبی بیشتر لمفوسیت‌ها سلول‌های بیگانه را شناسایی کرده و حداکثر تلاش خود را برای نفوذ به درون کپسول جزایر لانگرهانس و از بین بردن سلول‌های بیگانه انجام می‌دهند، بنابراین میزان ترشح IL-۲ کاهش می‌یابد. نتایج روز چهارم نشان می‌دهد، پوشش پلیمری در چهار آزمایش بررسی شده، بین ۷۶/۵-۴۷ درصد باعث کاهش ترشح IL-۲ توسط لمفوسیت‌های مجاور شده با سلول‌های حاوی پلیمر، در مقایسه با حالت کنترل جزایر لانگرهانس، شده است. این نتیجه، در مقایسه با گزارش‌های ارائه شده توسط سایر محققان، قابل توجه است. زای و همکاران [۲۳] نشان دادند که پس از واکنش سلول‌های جزایر لانگرهانس و محلول ۴۰-۱۰ درصد سوکسینیمیدیل متوکسی پلی اتیلن گلیکول، در وزن ملکولی ۵ کیلو دالتون، پاسخ ایمنی ۳۸-۸ درصد کاهش یافت. همچنین، جانگ و همکاران [۲۰]، در کشت هم‌زمان سلول‌های جزایر لانگرهانس پوشش داده شده با متوکسی پلی اتیلن گلیکول سوکسینیمیدیل پروپیونات و لمفوسیت‌ها، پس از ۳ و ۵ روز گرماگذاری، به ترتیب ۳۱ و ۵۶ درصد کاهش ترشح IL-۲ را مشاهده کردند.

نتایج شمارش تعداد لمفوسیت‌های زنده، پس از ۷ روز مجاورت با جزایر لانگرهانس، در جدول ۳ و شکل ۲ بیان شده‌اند. پاسخ‌ها، به شکل تعداد سلول‌های زنده در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای و میانگین سه تکراراند. کنترل لمفوسیت‌ها، بیانگر حالت پایه، بدون تحریک است. کنترل جزایر لانگرهانس، تعداد لمفوسیت‌ها را در برابر سلول‌های جزایر لانگرهانس، بدون پوشش پلیمری نشان می‌دهد و نمودار مربوط به آزمایش‌های ۱ تا ۴، تعداد لمفوسیت‌ها را در برابر سلول‌های جزایر لانگرهانس که بر اساس جدول ۱، با پلیمر پوشانده شده‌اند، بیان می‌کنند.

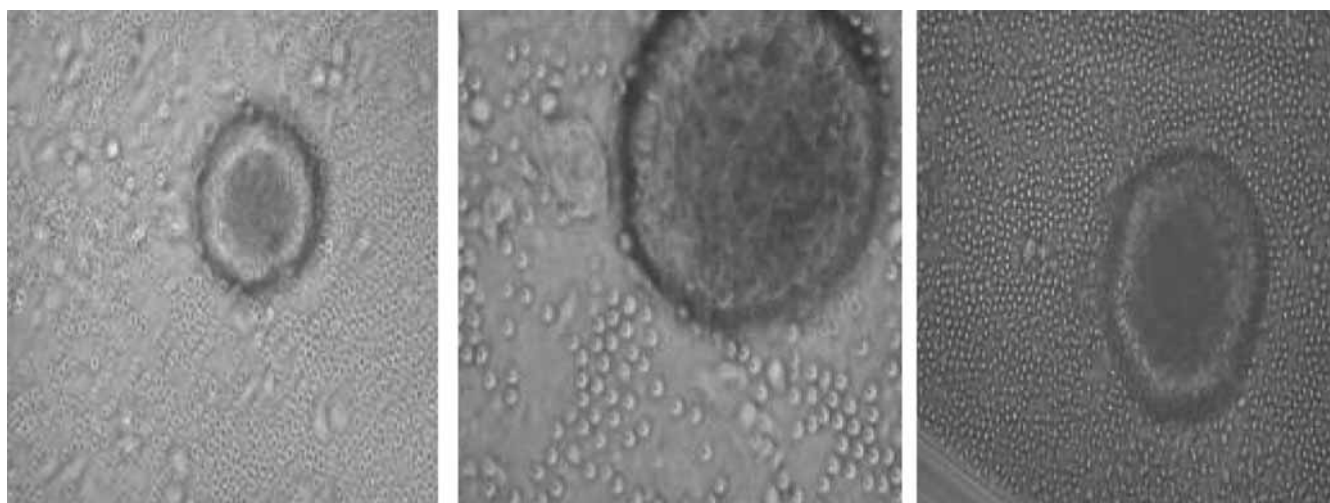
نتایج حاکی از آن است که لمفوسیت‌ها در مجاورت سلول‌های جزایر لانگرهانس بدون پوشش، به دلیل ترشح مقدار زیاد IL-۲ (پیامبر



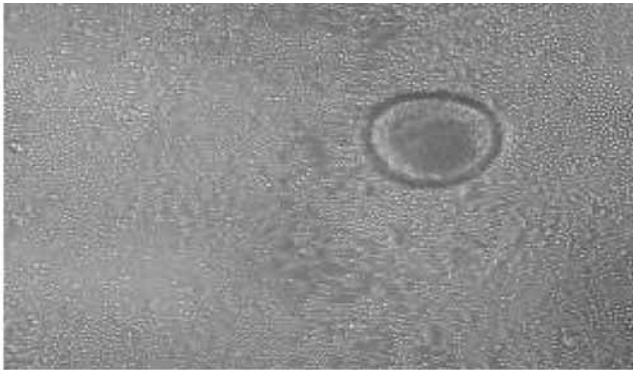
شکل ۲- تعداد لمفوسیت‌های زنده، پس از ۷ روز مجاورت با جزایر لانگرهانس.



شکل ۳- شکل ظاهری سلول‌های جزایر لانگرهانس (کنترل، بدون پوشش پلیمری) پس از ۴ روز مجاورت با لمفوسیت‌ها با میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی $400\times$.



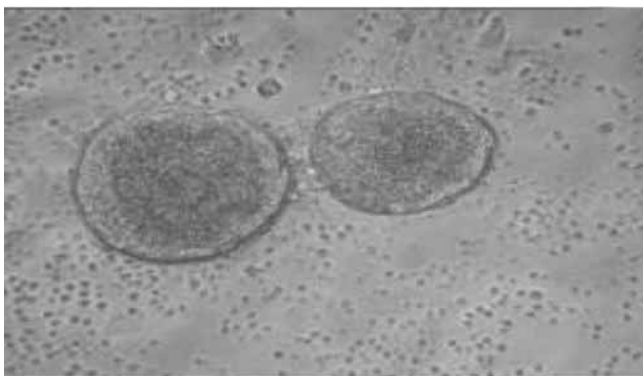
شکل ۴- شکل ظاهری سلول‌های جزایر لانگرهانس (با پوشش پلیمری، مطابق آزمایش ۱ جدول ۱) پس از ۴ روز مجاورت با لمفوسیت‌ها با میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی $400\times$.



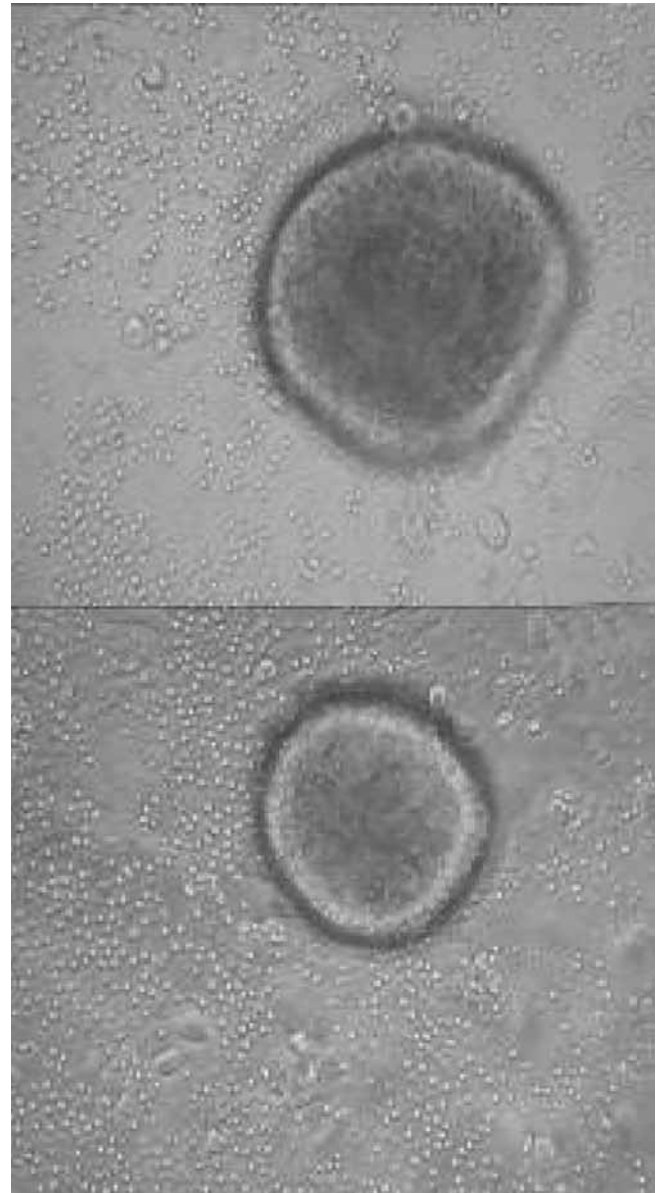
(الف)



(ب)



(ج)



شکل ۵- شکل ظاهری سلول‌های جزایر لانگرهانس (با پوشش پلیمری، مطابق آزمایش ۲ جدول ۱) پس از ۴ روز مجاورت با لمفوسیت‌ها با میکروسکوپ نوری بزرگ‌نمایی $\times 400$.

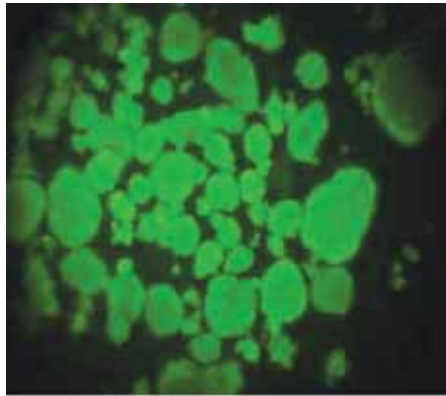
اساس شرایط بیان شده در جدول ۱ با پلیمر پوشانده شده و سپس با لمفوسیت‌ها مجاور شده‌اند. مشاهده می‌شود که وجود پوشش پلیمری روی سطح سلول‌های جزایر لانگرهانس، نقش تهاجمی و تخریبی لمفوسیت‌ها را کاهش داده است.

بررسی زنده بودن سلول‌های جزایر لانگرهانس

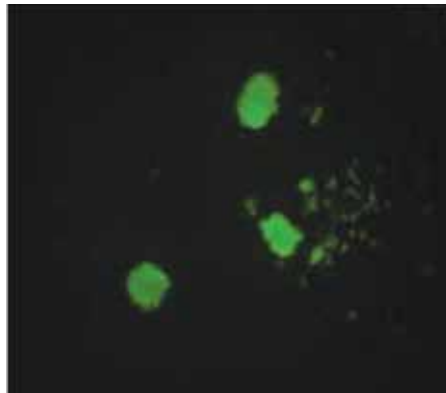
نتایج بررسی زنده بودن سلول‌های جزایر لانگرهانس، پس از واکنش با

شکل ۶- شکل ظاهری سلول‌های جزایر لانگرهانس (با پوشش پلیمری، مطابق آزمایش ۳ جدول ۱) پس از ۴ روز مجاورت با لمفوسیت‌ها با میکروسکوپ نوری بزرگ‌نمایی: (الف) و (ب) $\times 250$ و (ج) $\times 400$.

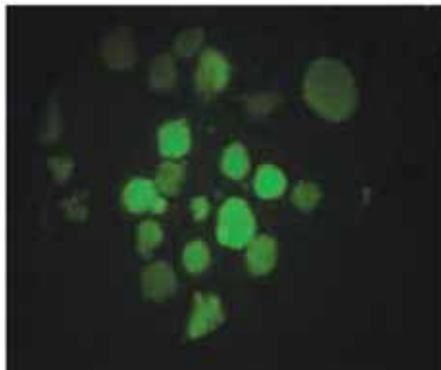
mPEG و مقایسه آن با سلول‌های واکنش نداده، در شکل ۸ بیان شده‌اند. سلول‌های سبز رنگ، زنده و قرمز رنگ، مرده هستند. مشاهده می‌شود که واکنش اتصال پلیمر به سطح سلول‌ها، باعث مرگ سلولی نشده است. سایر محققان نیز با استفاده از mPEG فعال شده با



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۸- نتایج بررسی زنده بودن سلول‌های جزایر لانگرهانس، به وسیله رنگ آمیزی با AO/PI: (الف) سلول‌های کنترل، بدون پوشش پلیمری، (ب) و (ج) سلول‌ها پس از واکنش با mPEG.

نتیجه‌گیری

سلول‌های جزایر لانگرهانس با متوکسی پلی اتیلن گلیکول فعال شده با سیانوریک کلرید پوشش داده شدند. این پوشش پلیمری، توانست تا حد قابل قبولی، از سلول‌ها در برابر حمله لmfوسیت‌های بیگانه حفاظت



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۷- شکل ظاهری سلول‌های جزایر لانگرهانس (با پوشش پلیمری، مطابق آزمایش ۴ جدول ۱) پس از ۴ روز مجاورت با لmfوسیت‌ها با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی: (الف) و (ب) $\times 250$ و (ج) $\times 400$.

ایزوسیانات [۶] و سوکسینیمیدیل پروپیونات [۲۳،۲۰]، در مورد زنده بودن سلول‌ها، به نتیجه مشابهی دست یافتند. احتمالاً درمان با PEG، جزایر لانگرهانس را در محیط کشت حفظ می‌کند. PEG به محلول‌های نگه داری عضو یا بافت نیز اضافه می‌شود [۶].

قدردانی

از دانشگاه کیوتوی ژاپن که امکانات مورد نیاز این پژوهش را فراهم کرد و همچنین از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری ایران که زمینه این سفر تحقیقاتی را ایجاد کرد، تشکر و قدردانی می‌شود.

مراجع

- Cima L.G., Vacanti J.P., Vacanti C., Ingber D., Mooney D. and Langer R., Tissue Engineering by Cell Transplantation Using Degradable Polymer Substrates, *J. Biomech. Eng.*, **113**, 143-151, 1991.
- Lee D.Y., Park S.J., Nam J.H. and Byun Y., A New Strategy toward Improving Immunoprotection in Cell Therapy for Diabetes Mellitus: Long-Functioning PEGylated Islets In Vivo, *Tissue Eng.*, **12**, 615-623, 2006.
- Lee D.Y., Park S.J., Nam J.H. and Byun Y., A Combination Therapy of PEGylation and Immunosuppressive Agent for Successful Islet Transplantation, *J. Control. Rel.*, **110**, 290-295, 2006.
- Berna G., Leon-Quinto T., Ensenat-Waser R., Montanya E. and Martin F., Stem Cells and Diabetes, *Biomed. Pharmacother.*, **55**, 206-212, 2001.
- Delavari A., Mahdavi Hazaveh A., Nowroozingejad A. and Yarahmadi Sh., *National Program for Prevention and Diabete Control*, 2nd ed., Sadra, Tehran, 19-26, 2004.
- Panza J.L., Wagner W.R., Rilo H.L.R., Rao R.H., Beckman E.J. and Russell A.J., Treatment of Rat Pancreatic Islets with Reactive PEG, *Biomaterials*, **21**, 1155-1164, 2000.
- Sefton M.V., Heparin and Insulin: An Epic in Biomaterials and Controlled Release, *Biomaterials and Drug Delivery Toward New Mellenium*, Park K.D., Kwon I.C., Yui N., Jeong S.Y. and Park K. (Eds.), Ham Rim Won, Korea, 13-22, 2000.
- Lacy P.E., Treating Diabetes with Transplanted Cells, *Scient. Am.*, **273**, 40-46, 1995.
- Hyde R.M., *Immunology*, 2nd ed., Harwal, USA, 1-81, 1992.
- 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.
- Scott M.D. and Chen A.M., Beyond the Red Cell: Pegylation of Other Blood Cells and Tissues, *Transfus. Clin. Biol.*, **11**, 40-46, 2004.
- Chen A.M. and Scott M.D., Immunocamouflage: Prevention of Transfusion-Induced Graft-Versus-Host Disease via Polymer Grafting of Donor Cells, *J. Biomed. Mater. Res.*, **67A**, 626-636, 2003.
- Hubbell J.A. and Langer R., Special Report: Tissue Engineering, *C & E News*, March 13, 42-54, 1995.
- Lee D.Y., Yang K., Lee S., Chae S.Y., Kim K.W., Lee M.K., Han D.J. and Byun Y., Optimization of Monomethoxy-Polyethylene Glycol Grafting on the Pancreatic Islet Capsules, *J. Biomed. Mater. Res.*, **62**, 372-377, 2002.
- Hashemi-Najafabadi S., Vashghani-Farahani E., Shojaosadati S.A., Rasaee M.J., Armstrong J.K., Moin M. and Pourpak Z., A Method to Optimize PEG- Coating of Red Blood Cells, *Bioconjug. Chem.*, **17**, 1288-1293, 2006.
- 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.
- 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.
- Sabolovic D., Sestier C., Perrotin P., Guillet R., Tefit M. and Boyard 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.
- Jackson C.J.C., Charlton J.L., Kuzminski K., Lang G.M. and Sehon A.H., Synthesis, Isolation, and Characterization of Conjugates of Ovalbumin with Monomethoxy Polyethylene Glycol Using Cyanuric Chloride as the Coupling Agent, *Anal.*

- Biochem.*, **165**, 114-127, 1987.
20. Jang J.Y., Lee D.Y., Park S.J. and Byun Y., Immune Reactions of Lymphocytes and Macrophages Against PEG-Grafted Pancreatic Islets, *Biomaterials*, **25**, 3663-3669, 2004.
21. Bank H.L., Assessment of Islet Cell Viability Using Fluorescent Dyes, *Diabetologia*, **30**, 812-816, 1987.
22. Narang A.S. and Mahato R.I., Biological and Biomaterial Approaches for Improved Islet Transplantation, *Pharmacol. Rev.*, **58**, 194-243, 2006
23. Xie D., Smyth C.A., Eckstein C., Bilbao G., Mays J., Eckhoff D.E. and Contreras J.L., Cytoprotection of PEG-modified Adult Porcine Pancreatic Islets for Improved Xenotransplantation, *Biomaterials*, **26**, 403-412, 2005.