مجله علوم و تکنولوژی پلیمر ، سال هجدهم،
شماره ۵، صفحه ۳۱۷-۳۱۱، ۱۳۸۴
ISSN : 1016-3255

بررسی اصلاح سطح سلولهای قرمز خون با پوشش پلیمری

Evaluation of the Surface Treatment of Red Blood Cells by Polymer Coating

سمیره هاشمی نجف آبادی[۱]، ابراهیم واشقانی فراهانی[۱*]، سید عباس شجاع الساداتی[۱]، محمد جواد رسایی[۲]

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، ۱ - بخش مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، صندوق پستی ۱۴۱۱۵/۱۴۳

۲ - دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوتکنولوژی، صندوق پستی ۱۴۱۱۵/۳۳۱

دریافت: ۸۳/۱۰/۳۰، پذیرش: ۸۴/۵/۲

چکیده

در این پژوهش، پلی اتیلن گلیکول فعال شده، با وزن مولکولی ۵ kDa، با پیوند کووالانسی به سلولهای قرمز خون انسانی متصل و برای بررسی اثر متغیرهای فرایند بر مقدار پوشش ایجاد شده روی سطح سلولها، از طراحی آزمایشها به روش تاگوچی استفاده شد. میزان مهار انعقاد سلولهای قرمز خون با پادتن گروه خونی (از نوع B)، به عنوان معیاری برای ارزیابی مقدار پوشش دهی سطح سلولها با پلیمر در نظر گرفته شد. سلولهای آزاد منعقد نشده، در مجاورت با پادتن گروه B، با روشی ساده شمارش شدند و شکل ظاهری آنها با میکروسکوپ الکترونی بررسی شد. محاسبات آماری و تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان دادند که pH=۸/۶ و دمای $12\ ^{\circ}C$ شرایط بهینه واکنش هستند اما در این پژوهش، میزان بهینه‌ای برای غلظت پلیمر بدست نیامد و مقدار ۵mg/mL مناسب در نظر گرفته شد.

واژه‌های کلیدی

سلولهای قرمز خون، متوکسی پلی اتیلن گلیکول، سیانوریک کلرید، پوشش پلیمری، پادتن گروه B

مقدمه

پاسخ سامانه ایمنی میزبان به سلولها و بافت پیوندی، مانعی مهم در پیوند بافت و انتقال خون است. سطح سلول به عنوان فصل مشترکی مهم درحفظ حیات سلولها مطرح است. اما پیچیدگی فراوان پروتئینها، کربوهیدراتها و لیپیدهای تشکیل دهنده آن، دلیل اصلی رد شدن سلول بیگانه توسط میزبان است. در اغلب فرایندهای انتقال خون، سازگاری در گروههای (پادژنهای) اصلی خونی A، B، O و D میان گیرنده و دهنده خون کافی است. مشکلات زمانی ایجاد می شود که بیمار به دفعات خون دریافت می کند، مثل بیمارانی که مبتلا به کم

* مسئول مکاتبات، پیام نگار : evf@modares.ac.ir

Key Words

red blood cells,methoxy polyethylene glycol, cyanuric chloride, polymer coating, anti-B sera

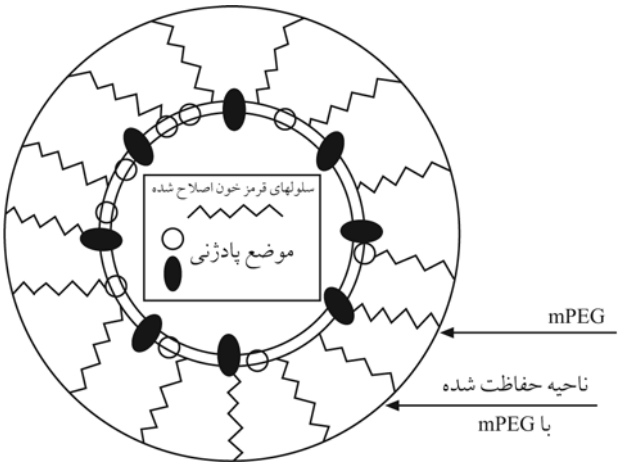
خونی سلولهای داسی شکل یا تالاسمی هستند. در این حالت، حساسیت بیمار نسبت به پادژنهای فرعی سلولهای خونی تزریق شده، در دراز مدت اجتناب ناپذیر است [۳-۱].

بیش از ۲۰سال قبل آبوچوسکی و همکارانش [۴،۵] روشی جدید برای اصلاح پروتئینها پیشنهاد کردند. آنها نشان دادند که پروتئین آلبومین گاوی که با پیوند کووالانسی به متوکسی پلی اتیلن گلیکول متصل شده است، نیمه عمر بیشتری در بدن موش دارد. در حال حاضر، پیوند کووالانسی پلی اتیلن گلیکول برای اصلاح انواع پروتئینها، آنزیمها، داروها و سطوح مصنوعی استفاده می شود [۹-۶]. اما، سلولهای قرمز خون اخیراً با این فرایند اصلاح شده اند.

انواع مشتقات فعال شده متوکسی پلی اتیلن گلیکول برای اتصال به سطح سلولهای قرمز خون استفاده شده اند [۱۳-۱۰]. از میان پرمصرفترین فعال کننده های متوکسی پلی اتیلن گلیکول، می توان به سیانوریک کلرید اشاره کرد که گروه اپسیلون آمینولیزینهای سطح خارجی سلولها را هدف قرار می دهد [۱۴،۱۵].

پوشش پلی اتیلن گلیکول، لایه ای آبکافته محافظ در اطراف سلولهای قرمز خون ایجاد می کند که مولکولهای بزرگ مانند پادتنها را از سلول دور می کند، اما همزمان اجازه عبور مولکولهای کوچک مثل گلوکوز و اکسیژن را می دهد (شکل ۱) [۱۵].

در این پژوهش، سلولهای قرمز خون با مشتقی فعال از متوکسی پلی اتیلن گلیکول، (جرم مولکولی kDa ۵) پوشش داده شده، اثر متغیرهای فرایند شامل غلظت پلیمر، دما وpH برمقدار پوشش دهی ارزیابی و طراحی تاگوچی برای شناسایی شرایط بهینه فرایند به کار برده شد. به منظور ارزیابی میزان تأثیر پوشش پلیمری، با شمارش سلولهای منعقد نشده مقدار مهار انعقاد سلولهای قرمز خون با پادتن مربوط



شکل ۱ نمایی از روش پیوند mPEG با سطح سلولهای قرمز خون [۲۳].

بررسی و تغییرات شکل شناسی سطح سلولها در فرایند پوشش دهی به کمک پلی اتیلن گلیکول فعال شده، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مطالعه شد.

تجربی

مواد

در این پژوهش، از متوکسی پلی اتیلن گلیکول با وزن مولکولی kDa ۵ و تری اتانول آمین ساخت شرکت Sigma، سیانوریک کلرید، بنزن و سدیم کربنات بدون آب محصول شرکت Merck و سیکلوهگزان ساخت شرکت Roth استفاده شد. همچنین، سلولهای قرمز خون از نوع B^+، به شکل فشرده از سازمان انتقال خون ایران و پادتن گروه خونی B از شرکت سیناژن تهیه شد.

دستگاهها

در این پژوهش، پلیمر فعال شده با خشک کن انجمادی ساخت شرکت Zirbus خشک شده و سلولهای منعقد نشده با میکروسکوپ نوری ساخت شرکت Nikon ژاپن مدل Eclipse E۲۰۰ شمارش شدند. شکل شناسی سلولها با میکروسکوپ الکترونی ساخت شرکت Philips هلند مدل XL ۳۰ بررسی شد.

روشها

فعالسازی پلیمر

فعال سازی متوکسی پلی اتیلن گلیکول (وزن مولکولی kDa ۵) با سیانوریک کلرید (۶،۴،۲ - تری کلرو ۵،۳،۱ - تری آزین)، با اصلاح روش بیان شده توسط آبوچوسکی و همکارانش [۴] انجام شد. به طور خلاصه، g ۵ متوکسی پلی اتیلن گلیکول خشک شده در خلأ (به مدت یک شب دردمای ۸۰°C) در mL ۴۰ بنزن خشک در دمای ۵۰°C حل شد. محلول بدست آمده تا ۱۵ °C خنک شده، به آرامی به محلولی از تری کلروتری آزین در بنزن (۵ برابر مولی پلیمر) اضافه شد. سپس g۱سدیم کربنات بدون آب به محلول یاد شده اضافه، مخلوط حاصل به مدت h ۴۸ در دمای ۱۵ °C و در اتمسفر نیتروژن، همزده شد. سپس سدیم کربنات با صاف کردن در خلأ از مخلوط واکنش جدا شد. همچنین، مشتق فعال شده پلی اتیلن گلیکول با سیکلوهگزان خشک رسوب داده شده، با صاف کردن در خلأ جمع آوری شد. این محصول ۵ مرتبه در بنزن حل شده، با سیکلوهگزان رسوب داده شد تا سیانوریک کلریدهای واکنش نداده حذف شوند [۱۶]. محصول نهایی در خلأ با خشک کن انجمادی خشک و دردمای ۷۰°C- نگهداری شد [۱۷].

پوشش دادن سلولهای قرمز خون با متوکسی پلی اتیلن گلیکول فعال شده

سلولهای قرمز خون (از نوع B^+) تا ۱۰درصد در بافر تری اتانول آمین (۳۰ mM تری اتانول آمین، ۱۱۰ mM سدیم کلرید، ۴ mM پتاسیم کلرید و ۵ mM گلوکوز) معلق شد. محلول تازه و سردی از پلیمر فعال شده، بلافاصله پیش از استفاده در محلول ۱ mM کلریدریک اسید دارای ۰/۹ درصد سدیم کلرید تهیه شده، حجمهای مناسبی از آن به تعلیق سلولهای قرمز خون اضافه شد تا غلظت پلیمر بین ۲۵-۵ mg/mL تنظیم شود. این محیط اسیدی، آبکافت پلیمر فعال شده را پیش از مجاورت با سلولها، به تأخیر می اندازد. از آنجا که حجم کمی از محلول به سلولها اضافه می شود، pH نهایی بدون تغییر باقی می ماند. نمونه ها با اختلاط ملایم در شرایط متفاوت (pH، دما و غلظت پلیمر که در بخشهای بعدی بیان می شود) در محیط رشد قرار گرفتند. پس از دو مرتبه شستشو با بافر فسفات (pH=۷/۴) در سانتریفوژ با سرعت ۲۰۰g و به مدت ۱۰min، سلولهای قرمز خون فشرده به منظور ارزیابی مقدار پوشش پلیمری ایجاد شده جدا شدند [۱۸].

انعقاد سلولهای قرمز خون با پادتن B

این آزمایش برای ارزیابی مقدار توانایی پوشش پلیمری ایجاد شده، در مهار انعقاد سلولهای خونی گروه B با پادتن مربوط انجام شد. ۴۰۰μL تعلیق ۶ درصد سلولهای قرمز خون اصلاح شده با پلی اتیلن گلیکول یا سلولهای کنترل [۱۹]، با محلولی از پادتن گروه خونی نوع B در بافر فسفات (بافر فسفات: پادتن B به نسبت ۱:۴) مخلوط شده، با اختلاط ملایم به مدت ۳۰ min در دمای اتاق رشد داده شدند. سپس، سلولهای قرمز خون به مدت ۱ min با سانتریفوژ در ۲۰۰g رسوب داده شدند. ۱ μL از رسوب حاصل، در ۱ mL بافر فسفات معلق شده، با استفاده از آزمایش رنگ آمیزی با محلول تریپان آبی رنگ و میکروسکوپ نوری بررسی شد. در این رنگ آمیزی، سلولهای زنده بی رنگ باقی می مانند، اما سلولهای مرده آبی رنگ می شوند. این تعلیق رنگ آمیزی شده، روی لام نئوبار و زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد. لام نئوبار دارای تیغه ای با ابعاد $3\times3\ mm^2$ است که به ۹ مربع کوچکتر با ابعاد $1\times1\ mm^2$ تقسیم شده است. همچنین، مربع مرکزی به ۲۵ دسته ۱۶ خانه ای تقسیم شده است. سلولهای قرمز خون منفرد و منعقد نشده در ۵ دسته ۱۶ خانه ای (۴ دسته در چهار گوشه و یکی در وسط) شمارش شدند. به منظور بدست آوردن تعداد سلولهای منفرد در ۱ mL تعلیق سلولی، تعداد سلول شمارش شده در ۵ دسته یاد شده در 5×10^7 ضرب شد. هرچه تعداد سلولهای منفرد بیشتر باشند، نشان دهنده آن است که پوشش پلیمری اثر بیشتری در مهار انعقاد سلولی با پادتن مربوط داشته است.

بررسی شکل شناسی سلولها با میکروسکوپ الکترونی

شکل ظاهری سلولها با میکروسکوپ الکترونی بررسی شد. به منظور آماده سازی نمونه ها، از روش بدست آمده توسط کیدن و همکارش [۲۰] استفاده شد.

طراحی آزمایشها

به منظور بدست آوردن شرایط بهینه واکنش پیوند متوکسی پلی اتیلن گلیکول با سلولهای قرمز خون، یک آرایه L_9 تاگوچی [۲۱] برای ۳ متغیر در ۳ سطح طراحی شد. با توجه به روش ارائه شده توسط لسلی [۲۲] و آزمایشهای مقدماتی که با سه تکرار و به روش شمارش سلولی انجام شده بود، هر آزمایش در این پژوهش دو مرتبه تکرار شد. متغیرها و مقادیر سطوح انتخابی در جدول ۱ ارائه شده اند.

نتایج و بحث

انعقاد سلولهای قرمز خون در نتیجه پیوند بین سلولها به وسیله پادتن انجام می شود. پادتنها به عنوان پلهای دو قطبی بین سلولهای مجاور و متصل کننده آنها به یکدیگر عمل می کنند. پیوند پلی اتیلن گلیکول به سلول به معنی آن است که امکان پیوند پادتن به آن وجود نداشته باشد، بنابراین، آن سلول امکان پیوند با سایر سلولها را ندارد و آزاد است. پلی اتیلن گلیکول تنها مانعی فیزیکی برای این پیوند ایجاد می کند. اسکات و همکارش آزمون انعقاد را به عنوان شاخصی از وجود پلی اتیلن گلیکول مورد استفاده قرار دادند اما آن را به شکل ماکروسکوپی بررسی کردند [۲۳]. دراین پژوهش، برای اولین بار انعقاد به شکل میکروسکوپی بررسی و روش شمارش سلول به عنوان معیار سنجش در طراحی آزمایشها در نظر گرفته شده است.

طراحی تاگوچی

انتخاب سطوح عوامل، بر اساس محدوده اشاره شده در منابع مربوط

جدول ۱ متغیرهای آزمایش و مقادیر سه سطح انتخابی برای طراحی تاگوچی.

متغیر	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
دمای واکنش (°C)	۴	۱۲	۲۰
غلظت پلیمر (mg/mL)	۵	۱۵	۲۵
pH بافر تری اتانول آمین	۸	۸/۶	۹/۲

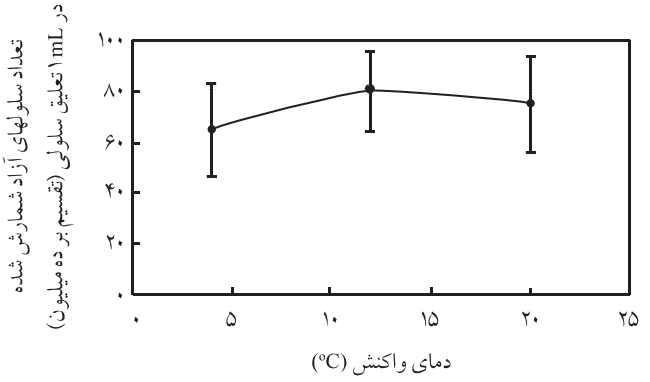
است. جکسون و همکارانش [۲۴] درسال ۱۹۸۷ نشان دادند که pH=۹/۲ برای واکنش بین متوکسی پلی اتیلن گلیکول فعال شده با سیانوریک کلرید و پروتئین مناسب است. بر این اساس، سایر پژوهشگران pH= ۸-۹/۲ را در واکنش بین پلیمر فعال شده و سلولهای قرمز خون اعمال کردند [۱۸،۲۵]. همچنین، محدوده دمایی ۲۵ ۴-°C استفاده شده است. فیشر در مقاله مروری خود [۱۵] اشاره کرده است که در غلظتهای کمتر از ۱ mM (حدود ۵ mg/mL) متوکسی پلی اتیلن گلیکول، پلیمر فعال شده با وزن مولکولی ۵ kDa اثر قابل توجهی بر اصلاح سلولها ندارد. بنابراین، در این شرایط پلیمر نمی تواند سلولها را در مقابل واکنشهای ایمنی محافظت کند. معمولاً آزمون انعقاد به عنوان اولین شاخص استفاده می شود و مشاهده مقدار زیادی از سلولهای منعقد شده به این معنا ست که این روش اثر قابل توجهی در حفاظت از سلولها در برابر واکنشهای ایمنی نداشته است. به غلظتهای بیشتر تا ۵۰ mg/mL نیز اشاره شده است ، اما تا حدی تغییر شکل سلولها نیز گزارش شده اند [۱۱]. طی فرایند پیوند پلیمر به سطح سلولها، کمتر از ۱درصد آنها دچار مرگ سلولی شدند. در واقع حتی غلظتهای بیش از پلیمر نیز باعث لیز شدن سلولها نشده است. آرایه L_9 طراحی شده و نتایج بدست آمده (با استفاده از نرم افزار Qualitek-۴) بر اساس شمارش سلولهای آزاد و منعقد نشده در جدول ۲ ارائه شده اند. اثر متغیرهای فرایند روی تعداد سلولهای آزاد شمارش شده، به عنوان معیار بررسی واکنش پیوند پلیمر با سلول، در

جدول ۲ آرایه L_9 تاگوچی و نتایج بدست آمده.

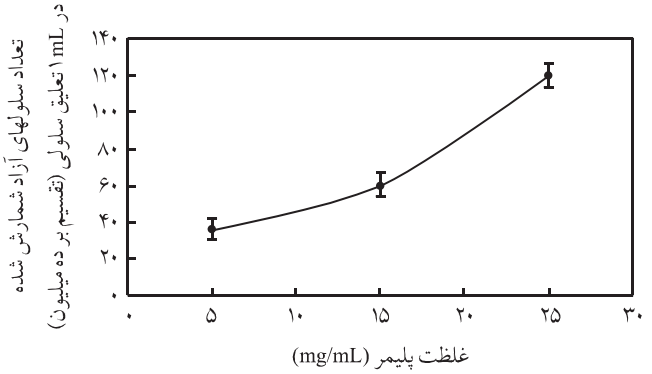
شماره آزمایش	دمای واکنش (°C)	غلظت پلیمر (mg/mL)	pH بافر تری اتانول آمین	پاسخ * ×۱۰$^{-۷}$
۱	۴	۵	۸	۲۰
۲	۴	۱۵	۸/۶	۶۰
۳	۴	۲۵	۹/۲	۱۲۰
۴	۱۲	۵	۸/۶	۴۰
۵	۱۲	۱۵	۹/۲	۷۵
۶	۱۲	۲۵	۸	۱۲۵
۷	۲۰	۵	۹/۲	۴۵
۸	۲۰	۱۵	۸	۵۰
۹	۲۰	۲۵	۸/۶	۱۲۵

* هر پاسخ به شکل میانگین دو تکرار انجام شده، بر اساس شمارش تعداد سلولهای آزاد و منعقد نشده در mL ۱ تعلیق سلولی، بیان شده است.

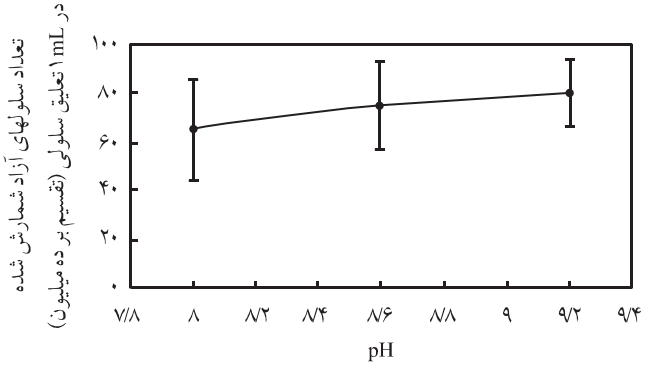
شکلهای ۴-۲ نشان داده شده است. با توجه به آنکه در طراحی انجام شده ۹ آزمایش با ۲ تکرار در نظر گرفته شد و در طراحی تاگوچی، تأثیر هر متغیر همزمان با تغییر سایر متغیرها بررسی می شود، بنابراین هر نقطه در شکلهای ۴-۲ نماینده میانگین پاسخ ۳ آزمایش با ۲ تکرار (۶ آزمایش) است. به همین دلیل متغیری که اثر بیشتری دارد (در اینجا غلظت پلیمر)، خطای استاندارد کمتری را نشان می دهد. نتایج مندرج در این شکلها نشان می دهد که دمای ۱۲ °C و pH=۹/۲ شرایط بهینه واکنش هستند. در



شکل ۲ اثر دما بر تعداد سلولهای آزاد شمارش شده.



شکل ۳ اثر غلظت پلیمر بر تعداد سلولهای آزاد شمارش شده.



شکل ۴ اثر pH واکنش بر تعداد سلولهای آزاد شمارش شده.

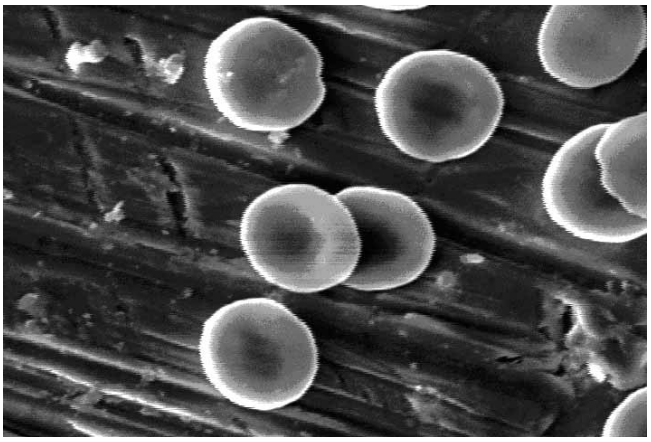
جدول ۳ جدول تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از طراحی تاگوچی.

متغیر	درجه آزادی	مجموع مربعات	واریانس	درصد اهمیت متغیر
دما (°C)	۲	۲۶۶/۶۷	۱۳۳/۳۳۳	۱/۵۳۸
غلظت (mg/mL)	۲	۱۲۳۱۶/۶۷	۶۱۵۸/۳۳۴	۹۴/۲۳
pH	۲	۳۵۰	۱۷۵	۲/۱۷۹
خطاها	۲	۶۶/۶۶۴	۳۳/۳۳۲	۲/۰۵۳
جمع	۸	۱۳۰۰۰		٪۱۰۰

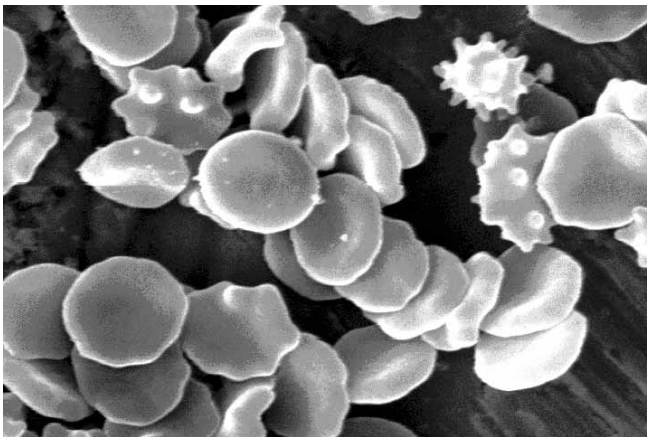
دمای ۴ °C شدت واکنش کم بوده، زمان بیشتری برای تکمیل فرایند مورد نیاز خواهد بود. بالاتر از دمای ۲۰°C پلیمر فعال شده ممکن است فعالیت کمتری از خود نشان دهد [۲۴]. بنابراین، دمای ملایم ۱۲°C مناسبتر است. همان‌طور که در ابتدای ارائه نتایج اشاره شد، pH قلیایی برای این واکنش مناسبتر است، زیرا کمتر باعث تخریب پلیمر فعال می‌شود. همچنین، اسیدآمینه لیزین که بیشترین واکنش را در میان اسیدهای آمینه پروتئینهای سطح سلولی با پلیمر فعال دارد، در این شرایط واکنش خوبی از خود نشان می‌دهد. pK' گروه جانبی لیزین که دارای $-NH_3^+$ است، برابر ۱۰/۵۳ است و تقریبا از حدود pH=۹/۵ به بالا، گروههای $-NH_3^+$ به $-NH_2$ تبدیل می‌شوند و فعالیت اولیه را ندارند [۲۶]. از طرف دیگر، pH بسیار بالاتر از شرایط زیستی طبیعی، باعث آسیب دیدن سلولها می‌شود. بنابراین، با توجه به تفاوت ناچیز پاسخ بدست آمده در مقادیر pH برابر ۸/۶ و ۹/۲، مقدار pH=۸/۶ بیشتر توصیه می‌شود. شکل ۳ نشان می‌دهد که افزایش هرچه بیشتر غلظت پلیمر، باعث بهبود نتیجه می‌شود. بنابراین، در این مرحله امکان تعیین غلظت بهینه پلیمر وجود ندارد، اما بررسیهای شکل شناسی نشان داد که غلظتهای بیشتر پلیمر سلولها را از حالت طبیعی خارج می‌کند. در جدول ۳ تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از طراحی تاگوچی آورده شده است.

بررسی شکل شناسی سلولها با میکروسکوپ الکترونی

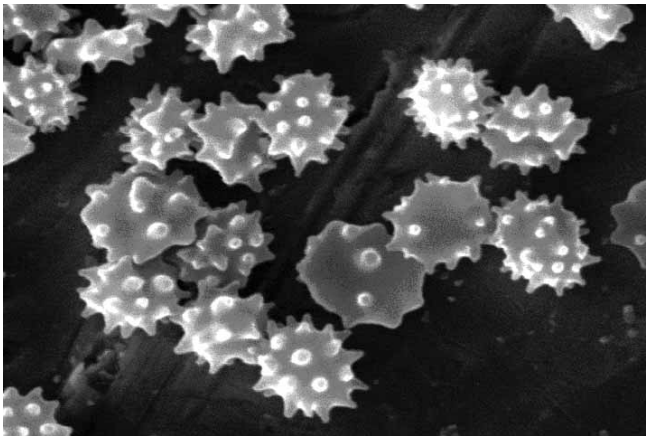
بررسیهای انجام شده با میکروسکوپ الکترونی که در شکلهای ۷-۵ ارائه شده‌اند، نشان می‌دهد که در غلظتهای پلیمر بیش از ۵ mg/mL، شکل طبیعی سلولها تغییرمی‌کند. این تغییر شکل، مانع پیوند پادتن گروه B با سلولهای خونی و انعقاد آنها می‌شود. سلولهای قرمز خون نقش حاملهای اکسیژن را در بدن دارند و شکل آنها باید کاملا مقعر باشد تا قابلیت عبور از مویرگها را داشته باشند. طبق پژوهشهای انجام شده [۲۷] و همچنین در این پژوهش، با وجود زنده بودن، سلولها تغییر شکل داده‌اند بنابراین، انجام وظیفه آنها که همان انتقال اکسیژن است امکان پذیر نیست. البته اشاره به این نکته ضروری است که در غلظتهای بیش از mPEG (۳۰mg/mL) بعد از ۲۴ h دوره رشد در دمای ۳۷ °C (نه در دمای کمتر) سلولها کاملا لیز می شوند [۲۷]. همچنین، وقتی که سلولهای قرمز خون تغییر شکل می‌دهند، تعدادی از جایگاههای مربوط به پیوند پادتن



شکل ۵ سلولهای کنترل (بدون پوشش پلیمری) با بزرگنمایی ۳۰۰۰ برابر.



شکل ۶ سلولهای اصلاح شده با ۵ mg/mL پلیمر با بزرگنمایی ۳۰۰۰ برابر.



شکل ۷ سلولهای اصلاح شده با mg/mL ۲۵ پلیمر با بزرگنمایی ۳۰۰۰ برابر.

ممکن است برای پادتنها خارج از دسترس شوند. همچنین، تجمع مولکولهای پلی‌اتیلن گلیکول بر سطح سلول از دیگر موانع پیوند سلولهای قرمز خون با پادتن است بنابراین، در غلظت زیاد پلیمر تعداد بیشتری سلول آزاد مشاهده می‌شود. علی‌رغم زنده بودن سلولها و افزایش تعداد سلولهای آزاد و منعقد نشده، به دلیل کاهش وجود پادتن گروه B، سلولها حالت طبیعی نداشته، نقش زیستی خود را از دست می‌دهند. بنابراین، غلظت پلیمر بیش از mg/mL ۵ توصیه نمی‌شود. البته لازم به یاداوری است که این غلظت، توانایی پوشش دادن کامل سلولهای قرمز خونی را ندارد و بررسیهای تکمیلی به منظور دستیابی به شرایط بهتر در حال اجراست.

نتیجه گیری

در این پژوهش، متوکسی پلی‌اتیلن گلیکول (با وزن‌مولکولی kDa ۵) فعال شده با سیانوریک کلرید، با پیوند کووالانسی به سطح سلولهای قرمز خون متصل و شرایط بهینه این واکنش، با استفاده از طراحی تاگوچی معین شد. pH= ۸/۶ و دمای ۱۲°C شرایط بهینه واکنش هستند. در این بررسی امکان تعیین غلظت بهینه پلیمر وجود ندارد ولی با توجه به مشاهدات میکروسکوپ الکترونی، mg/mL ۵ مقدار مناسبی شناخته شد. با افزایش بیشتر غلظت پلیمر، شکل شناسی سلولها از حالت طبیعی خارج شد. گرچه این غلظت نمی‌تواند به طور کامل پادژنهای سطح سلولها را پوشش دهد، اما غلظتهای بیشتر نیز توصیه نمی‌شود و به منظور دستیابی به پوشش مناسبتر، بررسیهای بیشتری مورد نیاز است.

مراجع

1. Castro O., Sandler S.G., Houston-Yu P. and Rana S., Predicting the Effect of Transfusing only Phenotype-Matched RBCs to Patients with Sickle Cell Disease: Theoretical and Practical Implications, *Transfusion,* **42**, 684-690, 2002.
2. Rosse W.F., Gallagher D., Kinney T.R., Castro O., Dosik H., Moohr J., Wang W. and Levy P. S., Transfusion and Alloimmunization in Sickle Cell Disease: The Cooperative Study of Sickle Cell Disease, *Blood,* **76**, 1431-1437, 1990.
3. Vichinsky E.P., Earles A., Johnson R.A., Hoag M.S., Williams A. and Lubin B., Alloimmunization in Sickle Cell Anemia and Transfusion of Racially Unmatched Blood, *New Engl. J. Med.,* **322**, 1617-1621, 1990.
4. 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.
5. Abuchowski A., McCoy J.R., Palczuk N.C., Van Es T. and Davis F.F., Effect of Covalent Attachment of Polyethylene Glycol on Immunogenicity and Circulating Life of Bovine Liver Catalase, *J. Biol. Chem.,* **252**, 3582-3586, 1977.
6. Greenwald R.B., Choe Y.H., McGuire J. and Conover C.D., Effective Drug Delivery by PEGylated Drug Conjugates, *Adv. Drug Deliver. Rev.,* **55**, 217-250, 2003.
7. Hershfield M.S., PEG-ADA Replacement Therapy for Adenosine Deaminase Deficiency: An Update after 8.5 Years, *Clin. Immunol., Immunopathol,* **76**, S228-S232, 1995.
8. Keating M.J., Holmes R., Lerner S. and Ho D.H., L-Asparaginase and PEG Asparaginase -Past, Present, and Future, *Leuk. Lymphoma,* **10**, 153-157, 1993.
9. Thanou M. and Duncan R., Polymer-Protein and Polymer-Drug Conjugates in Cancer Therapy, *Curr. Opin. Invest. Drugs,* **4**, 701-709, 2003.
10. Armstrong J.K., Meiselman H.J. and Fisher T.C., Covalent Binding of Poly(ethylene glycol) (PEG) to the Surface of Red Blood Cells Inhibits Aggregation and Reduces Low-Shear Blood Viscosity, *Am. J. Hematol.,* **56**, 26-28, 1997.

11. Hortin G.L., Lok H.T. and Huang S.T., Progress Toward Preparation of Universal Donor Red Cells, *Artif. Cell. Blood Sub. Immob. Biotech.,* **25**, 487-491, 1997.
12. Jeong S.T. and Byun S.M., Decreased Agglutinability of Methoxy-Polyethylene Glycol Attached Red Blood Cells: Significance as a Blood Substitute, *Artif. Cell. Blood Sub. Immob. Biotech.,* **24**, 503-511, 1996.
13. 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.
14. 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.
15. Fisher T.C., PEG-Coated Red Blood Cells-Simplifying Blood Transfusion in the New Millennium?, *Immunohematology*, **16**, 37-46, 2000.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Bradley A.J., Murad K.L., Regan K.L. and Scott M.D., Biophysical Consequences of Linker Chemistry and Polymer Size on Stealth Erythrocytes: Size Dose Matter, *Biochim.Biophys. Acta,* **1561**, 147-158, 2002.
20. Kayden H.J. and Bessis M., Morphology of Normal Erythrocyte and Acanthocyte Using Nomarski Optics and the Scanning Electron Microscope, *J. Hematol.,* **35**, 427-436, 1970.
21. Roy R.K., *A Prime on the Taguchi Method,* Van Nostrand Reinhold, New York, 29-144, 1990.
22. Leslie D., *Efficiency in Research, Development, and Production: The Statistical Design and Analysis of Chemical Experiments,* Royal Society of Chemistry, Cambridge, 40-99, 1993.
23. Scott M.D. and Murad K.L., Cellular Camouflage, Fooling the Immune System with Polymers, *Curr. Pharm. Design,* **4**, 423-438, 1998.
24. Jackson C.C., Charlton J.L., Kuzminski K., Lang G.M. and Sehon A.H., Synthesis, Isolation and Characterization of Conjugates of Ovalbumin with Monomethoxypolyethylene Glycol Using Cyanuric Chloride as the Coupling Agent, *Anal. Biochem.,* **165**, 114-127, 1987.
25. Murad K.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.
26. Lehninger A.L., *Principles of Biochemistry,* Worth, New York, 95-120, 1982.
27. 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.