Archive of SID

تولید و مطالعه آنتی بادی پلی کلونال علیه سیکلوسپورین – A و استفاده از آن در طراحی سیستم الیزای غیر مستقیم برای تعیین غلظت دارو در خون و مایعات بیولوژیک

مرتضی حسین‌زاده * ، دکتر عباس قادری **

چکیده

سیکلوسپورین داروی سرکوب کنندهٔ سیستم ایمنی بوده و در سطح وسیعی در پیوند اعضا بیماران خودایمن و جلوگیری از بروزGRHD به دنبال پیوند مغز استخوان مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در ایـن تحقـیق با تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه سیکلوسپورین، امکان اندازه گیری غلظت دارو در خون توسط سیستم الیزای غیر مستقیم ارزیابـی شـده است. بدین صورت که سیکلوسپورین خالص (Sandoz) با استفاده از گلوتار آلدئید به آلبومین گاوی (BSA) و هموسـیانین (KLH) متصـل و ترکیـبات حاصـل جهـت تولید آنتی بادی به خرگوش و بز تزریق گردید. سپس فراکسیون گاما از سرم ایمـیون حـیوانات جـدا شـده و با آنزیم پراکسید از کونژوگه گردید. اختصاصی بودن این آنتی بادی برای سیکلوسپورین – A به روش الـیزای غـیر مسـتقیم مورد تأئید قرار گرفت. عیار آنتی بادی خرگوشی علیه ترکیب سیکلوسپورین و کازئین کوت شده ۱۲۰۰۰ :۱ و عیار آنتـی بـادی بز ۸۰۰۰ :۱ تعیین گردید. این آنتی بادی خالص شده در الیزای غیر مستقیم توانایی اندازه گیری غلظت های مختلف CSA را داراسـت و کـم تریـن غلظت قابل اندازه گیری ۱۰۰mg/ml می‌باشد. با استفاده از این آنتی بادی ها می‌توان سیستم‌های آزمایشی مختلفی چـون تکنـیک‌هـای ELISA، ایمونوهیستوشـیمی، ایمیونوسیتوشـیمی و ابمـیونوفلورنس را طراحی کرده و برای تعیین غلظت یا حضور سیکلوسپورین در خون و مایعات بیولوژیک از آن ها استفاده نمود.

واژه های کلیدی: سیکلوسپورین، E LISA، پیوند کلیه

مقدمه

عموماً دو روش اختصاصی و غیر اختصاصی برای اندازه‌گیری سیکلوسپورین وجود دارد. در روش اختصاصی غلظت داروی اصلی (Parent CSA) اندازه گیری شده و در روش‌های غیر اختصاصی غلظت CSA به انضمام متابولیت های مختلف آن نیز تعیین می‌گردد .روش رفرنس در اندازه‌گیری‌اختصاصی CSA اصلی،

* عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام
**عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

www.SID.ir

Archive of SID

HPLC[1] می‌باشد و روش های ساده‌تری چون S.mc/RIA و S.mc/FPIA نیز جهت جایگزینی مراحل پیچیده و دشوار H PLC طراحی گردیده‌اند. در حقیقت اولین روشی که برای تعیین غلظت CSA در مایعات بیولوژیک و خون مورد استفاده قرار گرفت ، E IA بود و تکنیک های مختلفی چون (الیزای مستقیم ، غیر مستقیم یا رقابتی) هم برای تعیین عیار آنتی بادی های پلی کلونال و مونوکلونال تولید شده علیه CSA و هم برای تعیین غلظت CSA در مایعات بیولوژیک مورد بهره برداری قرار گرفت. اولین مرحله در اندازه گیری سیکلوسپورین تولید آنتی بادی‌های پلی کلونال یا مونوکلونال علیه آن است و برای این مسئله بایستی داروی سیکلوسپورین را که یک داروی سرکوب کنندهٔ سیستم ایمنی است بوسیلهٔ پروتئین حامل (Carrier) کونژوگه کرده تا از ورود آن به سلول های صلاحیت دار سیستم ایمنی بویژه (T-cell) ممانعت به عمل آورده و حیوان بتواند علیه سیکلوسپورین تحریک شده و آنتی بادی تولید نماید. در مطالعات مختلف از پروتئین های حامل متفاوتی استفاده شده و کونژوگه‌های متنوعی ازCSA تهیه گردیده است. در برخی مطالعات از کونژوگهٔ سیکلوسپورین CSC که فاقد گروههای فعال است بهمراه ایمنوگلبولین جوجه استفاده کرده‌اند [۱٤]، همین مسئله سبب تقویت عیار آنتی بادی به دست آمده نسبت به تزریق CSC خالص به مقدار ۳۵۰ مرتبه گردیده است. در این روش ترکیب CSC وChiken- Ig به کمک کاربودی‌آمید صورت گرفته، زیرا در مرحله اول C SC تبدیل به CSC-[2] ECDI شده و سپس به ایمنوگلبولین جوجه متصل می‌گردد. آنتی بادی به دست آمده نیز توسط روش الیزای غیر مستقیم قابل ارزیابی است [۱٤].

در اغلب تحقیقات چهار نوع آنتی بادی CSA مورد استفاده قرار گرفته است :

۱) آنتی سرم خرگوش یا گوسفندی (بز) حاصل از ایمیونیزاسیون با کونژوگه‌های

CSC- ECDI & Chiken-Ig (Hemi. Suc .CSA & Hexanoic acid)- CSC (CSA & BSA)

۲) آنتی سرم موشی حاصل از ایمنونیزاسیون با

(CSC + ovalbumin)

۳) آنتی بادی مونوکلونال IgM موشی حاصل از ایمنونیزاسیون با C SC آزاد

٤) آنتی بادی مونوکلونال IgG موشی حاصل از ایمنونیزاسیون با C SC آزاد .

از این آنتی بادی ها در روش های مختلف اندازه گیری غلظت سیکلوسپورین استفاده شده است و در یک مطالعهٔ گسترده توسط Quesniaux نتایج بسیار جالبی از مقایسه سه روش *ELISA* و دو روش RIA برای اندازه گیری غلظت سیکلوسپورین به دست آمده است [۱٤]. این بررسی با هدف تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه CSA انجام گردید تا با استفاده از آن در تکنیکهای مختلف برای اندازه گیری غلظت CSA مورد بهره برداری قرار گیرد .

مواد و روش ها

۱- تهیهٔ کونژوگه از سیکلوسپورین با BSA LH : مراحل تهیهٔ هردوکونژوگه یکسان است و با هم توضیح داده می‌شود. در ابتدا ۱/۵mg پودر CSA (Sandoz) را

1. High performance liquide chromatography
2. CSC-ethyldimcthylaminopropyl Carbodiimide dihyrdochloride

www.SID.ir

Archive of SID

در دو قطره متوسط اتانول خالص حل کرده و هم زمان ۲/۵mg پودر BSA یا پودر KLH در mg ۵/ ۲ آب مقطر حل می‌شود. پس هر دو را ترکیب کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال (c 4^{o}) بر روی همزن مغناطیسی قرار داده می‌شود. بعد از این مدت ml۱از گلوتارآلدئید ۲۱ میلی مولار در بافر فسفات ۰/۱ مولار به محلول قبل اضافه می‌شود. این عمل بایستی به آرامی و در مدت ۱۰ دقیقه و بر روی همزن انجام گیرد. سپس محلول را به مدت ۳ ساعت در دمای آزمایشگاه و بر روی همزن به حال خود رها کرده و بعد از این مدت محلول در کیسهٔ دیالیز ریخته شده و به مدت ۱۸ ساعت شدیداً علیه P BS دیالیز می‌گردد.

بعد از آن محلول کونژوگه از کیسهٔ دیالیز خارج شده و درلوله‌های eppendorf به مقدارموردنیاز تقسیم شده و برای نگهداری طولانی مدت منجمدمی‌گردد [۱۰].

۲- اندازه‌گیری‌غلظت‌کونژوگه‌به‌روش‌اسپکتروفتومتری : می‌دانیم که به هنگام ترکیب یک هاپتن و یک پروتئین حامل،غلظت نهایی کونژوگه برابر با غلظت پروتئین حامل به تنهایی می‌باشد و از غلظت هاپتن صرفنظر می‌گردد. در اینجا نیز ۲/۵mg از BSA یا KLH در mg ۲/۵ آب مقطر حل شده و غلظت نهایی ظاهراً همان ۱mg/ml خواهد بود ولی به علت دیالیز و خروج سیکلوسپورین کونژوگه نشده، گلوتارآلدئید و الکل اضافی در محلول بهتر است به روش اسپکتروفتومتری تعیین غلظت انجام گیرد. برای این منظور دو کووت مورد نیاز است که اولی حاوی P BS (به عنوان شاهد) و دومی حاوی محلول کونژوگه می باشد. به وسیله شاهد دستگاه تنظیم و در طول موج‌های ۲۸۰nmو۲۶۰، میزان جذب (OD) محلول کونژوگه اندازه گیری شد وبا استفاده ازفرمول (عکس ضریب رفت × [(۲۶۰ OD×(۰/۷۷)-(۱/۵۵ × OD۲۸۰)]=mg/ml) غلظت، تعیین گردید [۱].

۳- ایمنونیزاسیون حیوانات علیه CSA: بعد از تهیه کونژوگه و استریل کردن آن با فیلتر ۰/۴۵μ m [۱۰]. جهت ایجاد پاسخ ایمنی بهتر از ادجوانت فروند کامل (CFA) استفاده شده و مقداری از پروتئین در نصف حجم مجاز تزریقی در بافر استریل حل شده و نصف دیگر حجم آن توسط CFA جایگزین شد [۷و۹]. سپس تزریق کونژوگه سیکلوسپورین به خرگوش‌ها و بزها طی سه مرحله صورت گرفت که برای هر دسته از حیوانات متفاوت بود. در خرگوش ها و بزها جهت تزریق اول بترتیب ۰/۵ و ۱ میلی گرم کونژوگه سیکلوسپورین با مقدار مساوی ادجوانت فروندکامل مخلوط و به صورت زیر جلدی در دو موضع تزریق گردید. تزریق های یادآور در خرگوش ها بترتیب روزهای ۱۴ و ۳۴ و ۶۴ بعد از تزریق اول و در بزها روزهای ۱۴ و ۶۴ و ۱۲۴ بعد از اولین تزریق انجام گردید. بعد از هر تزریق در فاصلهٔ ۱۴-۷ روز خون گیری انجام شده و مراحل پیشرفت ایمونیزاسیون تعقیب می‌گردید. در تزریق های یادآور از ادجوانت فروند ناقص استفاده شد [۱،۷،۹،۱۰]

۴- ارزیابی آنتی سرم تولید شده طی مراحل ایمونیزاسیون: در هر مرحله از خونگیری حیوانات، سرم آن ها جدا شده (۲۷ و ۶۶) و عیار آنتی بادی علیه سیکلوسپورین به روش الیزای غیر مستقیم تعیین گردید و در ابتدا غلظت‌های mg/ml ۱۰-۱ از کونژوگه سیکلوسپورین – کازئین در بافر کربنات (۰/۰۵M و ۹/۶ =PH)به مدت ۱۶-۱۲ ساعت در برودت c 4^{o} در حفرات پلیت الیزا کوت گردید.سپس جهت Blocking۱ از محلول ۲-۱ درصد کازئین یا ۵-۳ درصد S M در

۱- پوشاندن جایگاه های اتصالی خالی بر روی پلیت الیزا

www.SID.ir

Archive of SID

PBS استفاده شد. سرم حیوانات در رقت های متوالی تهیه و به حفرات اضافه گردیده و جهت شاهد از PBS خالی استفاده گردید. در مرحلهٔ بعد آنتی بادی کونژوگهٔ علیه ایمنوگلبولین خرگوش با رقت ۵۰۰ :۱ و در مورد بز با رقت ۲۰۰۰ :۱ اضافه شده و در نهایت از سوبسترای آنزیم پراکسید از [OPD + H202+ بافر ستیرات با PH =۵] استفاده کرده و جهت توقف واکنش از اسیدسولفوریک ۱۲/۵ درصد استفاده شد. پلیت ها در طول موج ٤۹۰nm توسط قرائت کنندهٔ الیزا خوانده شده میزان جذب نور با میزان آنتی بادی اختصاصی علیه سیکلوسپورین در آنتی سرم نسبت مستقیم داشت [۱۱،۱۰،٦] در تمام مراحل فوق زمان انکوباسیون یک ساعت در حرارت 37^0 c و محلول شستشو از بافر P ES (۰/۰۵ درصد) با Tween-20 استفاده شده است.

۵- جدا سازی IgG اختصاصی از سرم حیوانات: برای این منظور از روش کاپرلیک اسید استفاده شد [۱۳،۳، ۱٦].

٦- نشاندار کردن IgG با پراکسیداز: برای این منظور از روش پرآیدات سدیم استفاده شد [۹،۷].

۷- تعیین عیار آنتی بادی نشاندار شده با پراکسیداز به روش الیزای مستقیم: نحوهٔ انجام این عمل همانند الیزای غیر مستقیم (قسمت ٤) است. با این تفاوت که در این روش آنتی بادی اول وجود نداشته و آنتی بادی کونژوگه با پراکسیداز، مستقیماً با کونژوگه (CSA+Cas) متصل شده به حفرات پلیت الیزا واکنش می‌دهند [٦].

۸- الیزای غیر مستقیم برای تعیین غلظت‌های مختلف سیکلوسپورین: برای این منظور فراکسیون گامای خالص (Anti- CSA- IgG) به میزان µg/ml ۵۰ در بافر کربنات به مدت ۱٦- ۱۲ ساعت در 4^0 c به حفرات پلیت الیزا متصل شده و پس از Blocking با SM در PBS، رقت های مختلف سیکلوسپورین که در الکل و PBS تهیه شده بود به حفرات اضافه گردید. پس از انکوباسیون و شستشو از آنتی سیکلوسپورین کونژوگه با پراکسیداز (قسمت ٦) با رقت ۱:٤۰۰ اضافه شده و پس از انکوباسیون مجدد و شستشو با استفاده از سوبسترایOPDو توقف واکنش با اسید سولفوریک ۱۲/۵ درصد، میزان جذب نوری هر حفره در طول موج ٤۹۰n m اندازه گیری شد. این میزان جذب نور با میزان غلظت سیکلوسپورین نسبت مستقیم دارد.

۹- الیزای غیر مستقیم برای تعیین غلظت سیکلوسپورین در خون تام : در این جا هم کلیه مراحل شبیه روش قبلی (قسمت ۸) می‌باشد ولی ابتدا بایستی خون بیماران گیرندهٔ سیکلوسپورین را به کمک اتانول لیز کرده و سیکلوسپورین موجود در اجزاء و سلول های خونی را استخراج کرد و سپس توسط PBS رقیق کرده و هم چنین از مادهٔ PVP به عنوان یک حامل هیدروفوب در محیط آبی استفاده کرد زیرا PVP[1] یک پلی آمید بدون بار است و به مقدار زیادی در آب حل می‌گردد و به عنوان یک کاریر خنثی برای انتقال مولکول های هیدروفوب در محلولهای آلی مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد. به همین جهت در ابتدا غلظت ۳۵m g/ml از pvp در PBS تهیه شده و ۰/۵ درصد گلوکز به آن اضافه گردید. سپس مایع استخراج شده حاوی سیکلوسپورین به چندین رقت مختلف از محلول PVP در PBS اضافه و با این رقت ها الیزای غیر مستقیم انجام شد [۱۷].

یافته‌های پژوهش

۱- کونژوگه‌های CSA+BSA CSA+KLHبعد از تهیه و انجام دیالیز تعیین غلظت گردیدند . نتایج جذب نوری

1. Poly vinyl pyrolidine

www.SID.ir

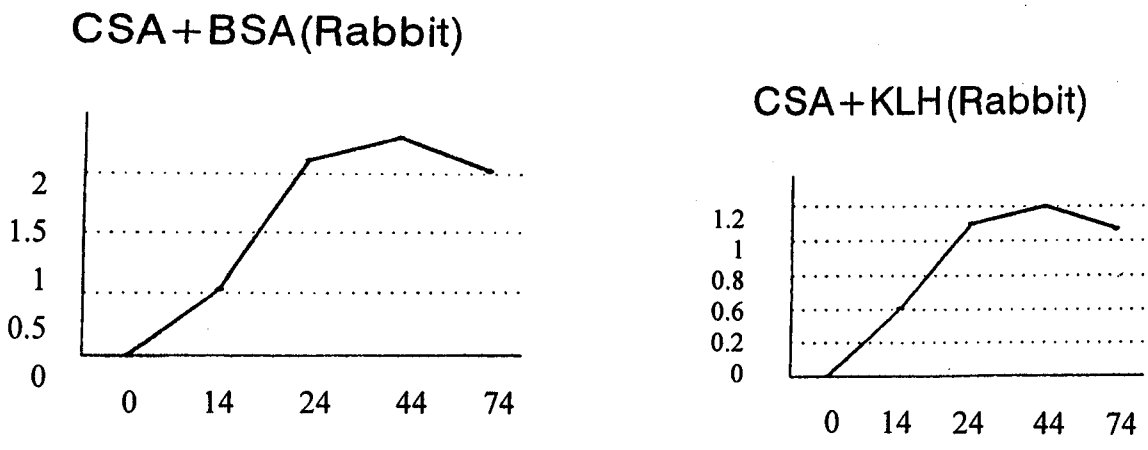
Archive of SID

در طول موجهای ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر و غلظت هر یک بر حسب mg/ml در جدول (۱) مشهود است.

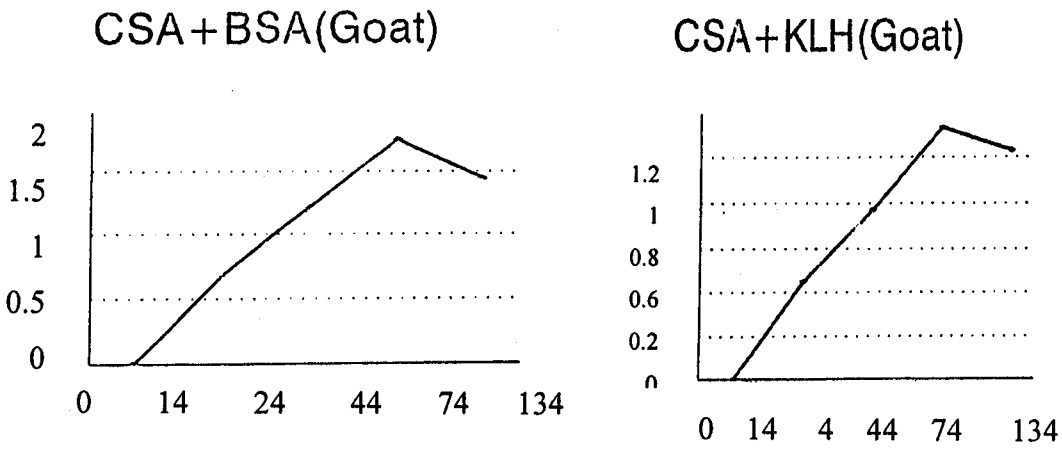
۲- در اثر ایمونیزاسیون حیوانات بوسیله کونژوگه‌های سیکلوسپورین در روزهای متوالی عیار Anti CSA- Ab - بالا رفته و آزمایش الیزای غیر مستقیم برای تعیین عیار این آنتی بادی برای خرگوش در روزهای ۰، ۱۴، ۲۴، ۴۴، ۷۴ و برای بز در روزهای ۰، ۱۴، ۲۴، ۴۴، ۷۴، ۱۳۴ بر روی سرم حیوانات به عمل آمد (جدول۲).

جدول ۱. میزان جذب نوری وغلظت کونژوگه‌های سیکلوسپورین

	OD۲۸۰nm	OD۲۶۰nm	mg/ml
CSA+BSA	۰/۱۹	۰/۰۷۹	۲/۳۳
CSA+ KLH	۰/۱۷	۰/۰۴۳	۲/۲۹



نمودار شمارهٔ ۱. تعین عیار آنتی سرم در خرگوش ایمونیزه شده با CSA+BSA و CSA+ KLH



نمودار شمارهٔ ۲. تعین عیار آنتی سرم در بز ایمونیزه شده با CSA+BSA و CSA+ KLH

www.SID.ir

Archive of SID

با استفاده از جدول ۲ و نمودارها مشخص می‌گردد که قبل از تزریق، میزان آنتی بادی اختصاصی در روز صفر برابر صفر بوده و این میزان آنتی بادی ده روز بعد از تزریق سوم (روز ٤٤ در خرگوش و روز ٧٤ در بز) نیز افزایش مختصری نشان می‌دهد ولی این میزان آنتی بادی ده روز بعد از تزریق چهارم (روز ٧٤ در خرگوش و روز ١٣٤ در بز) کاهش پیدا می‌کند. بیشترین میزان آنتی بادی ده روز بعد از تزریق سوم وجود داشته که پس از اطمینان از عیار بالای آن در آزمایش الیزای غیر مستقیم، خون گیری نهایی انجام شد. علت کاهش عیار آنتی بادی در آخرین تزریق یا به خاطر حجم زیاد خون گیری و رقیق شدن سرم حیوان بود و یا جدا شدن CSA از پروتئین حامل سبب سرکوب سیستم ایمنی و کاهش تولید آنتی بادی شده است. هم چنین با توجه به جدول ۲ و نمودارها مشخص شده که کونژوگهٔ CSA+BSA نسبت به کونژوگهٔ CSA+KLH ایمیونوژن قوی‌تری بوده و در هر دو گروه حیوانات باعث تولید آنتی بادی اختصاصی با عیار بالاتری شده است. هم چنین مشاهده می‌گردد که ایمونیزاسیون خرگوش با CSA+ BSA نیز نسبت به بز موفق‌تر بوده و در الیزای غیر مستقیم، آنتی سرم خرگوش تا رقت ۱۲۸۰۰ :۱ میزان جذب نوری بیش از ۱را نشان می‌دهد در حالی که در مورد بز رقت ۸۰۰۰ :۱ آنتی سرم میزان جذب نور بالاتر از ۱.۰ دیده می‌شود. به همین خاطر برای جدا سازی IGg از حیوانات ایمونیزه شده با CSA+ BSA استفاده گردید.

۳- در آزمایش الیزای غیر مستقیم برای تعیین غلظتهای مختلف سیکلوسپورین که توسط Anti- CSA-Ab خالص متصل به پلیت و Anti – CSA –IgG کونژوگه با پراکسیداز در قسمت ۸ (مواد وروش ها) انجام گردید ، رقت های مختلفی از سیکلوسپورین از ۷۵ تا ۵۰۰۰ نانو گرم در میلی لیتر بررسی شد و در آزمایشات مکرر (۸ بار) میزان جذب نوری محاسبه گردید (جدول ۳) .

جدول ۳. نتایج آزمایش های الیزای غیر مستقیم برای تعیین غلظت های استاندارد سیکلوسپورین

غلظت	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	میانگین
۷۸ ng/ml	۰/۱۸۵	۰/۱۱٤	–	۰/۱۰۷	۰/۱۰۰	۰/۱۰۷	۰/۱۵۵	۰/۱۳۱	۰/۱۲۸
۱۵٦ng/ml	۰/۲٤۸	۰/۱۷۰	۰/۱۸۹	۰/۲٤۲	۰/۲۲۲	۰/۱٦۰	۰/۱۸۹	۰/۲۱۹	۰/۲۰٤
۳۱۲ng/ml	۰/۳۹۳	۰/۳۱۱	۰/۳۰۳	۰/۳۷۲	۰/۳٦۷	۰/۳۵۱	۰/۳٦۱	۰/۳۵۳	۰/۳۵۱
٦۲۵ng/ml	۰/٦۰۹	۰/٤٦۸	۰/٤۲۳	۰/۵۳۸	۰/۵۳۳	۰/۵۰٤	۰/٦٦٦	۰/٦۸۱	۰/۵۵۲
۱۲۵۰ng/ml	۰/۹۱۵	۰/۷۵٤	۰/۷۱۷	۰/۸٦۳	۰/۸۵۲	۰/۷٤۱	۰/۸٤۳	۰/۷۹۰	۰/۸۰۹
۲۵۰۰ng/ml	۱/۲۷۹	۱/۰۹۳	۰/۰۲٤	۱/۲۰۷	۱/۱۲۵	۱/۰۱۲	۱/۰٦٤	۱/۱۵۰	۱/۱۱۹
۵۰۰۰ng/ml	۱/٤۱۷	۱/۳۸۵	۰/۳٤٤	۱/٤٤۲	۱/۳۸٦	–	–	۱/٤۵۷	۱/٤۰۵

www.SID.ir

Archive of SID

با استفاده از جدول ۲ و نمودارها مشخص می‌گردد که قبل از تزریق، میزان آنتی بادی اختصاصی در روز صفر برابر صفر بوده و این میزان آنتی بادی ده روز بعد از تزریق سوم (روز ٤٤ در خرگوش و روز ٧٤ در بز) نیز افزایش مختصری نشان می‌دهد ولی این میزان آنتی بادی ده روز بعد از تزریق چهارم (روز ٧٤ در خرگوش و روز ١٣٤ در بز) کاهش پیدا می‌کند. بیشترین میزان آنتی بادی ده روز بعد از تزریق سوم وجود داشته که پس از اطمینان از عیار بالای آن در آزمایش الیزای غیر مستقیم، خون گیری نهایی انجام شد. علت کاهش عیار آنتی بادی در آخرین تزریق یا به خاطر حجم زیاد خون گیری و رقیق شدن سرم حیوان بود و یا جدا شدن CSA از پروتئین حامل سبب سرکوب سیستم ایمنی و کاهش تولید آنتی بادی شده است. هم چنین با توجه به جدول ۲ و نمودارها مشخص شده که کونژوگهٔ CSA+BSA نسبت به کونژوگهٔ CSA+KLH ایمیونوژن قوی‌تری بوده و در هر دو گروه حیوانات باعث تولید آنتی بادی اختصاصی با عیار بالاتری شده است. هم چنین مشاهده می‌گردد که ایمونیزاسیون خرگوش با CSA+ BSA نیز نسبت به بز موفق‌تر بوده و در الیزای غیر مستقیم، آنتی سرم خرگوش تا رقت ۱۲۸۰۰ :۱ میزان جذب نوری بیش از ۱را نشان می‌دهد در حالی که در مورد بز رقت ۸۰۰۰ :۱ آنتی سرم میزان جذب نور بالاتر از ۱.۰ دیده می‌شود. به همین خاطر برای جدا سازی IGg از حیوانات ایمونیزه شده با +CSA BSA استفاده گردید.

۳- در آزمایش الیزای غیر مستقیم برای تعیین غلظتهای مختلف سیکلوسپورین که توسط Anti- CSA-Ab خالص متصل به پلیت و Anti – CSA –IgG کونژوگه با پراکسیداز در قسمت ۸ (مواد وروش ها) انجام گردید ، رقت های مختلفی از سیکلوسپورین از ۷۵ تا ۵۰۰۰ نانو گرم در میلی لیتر بررسی شد و در آزمایشات مکرر (۸ بار) میزان جذب نوری محاسبه گردید (جدول ۳) .

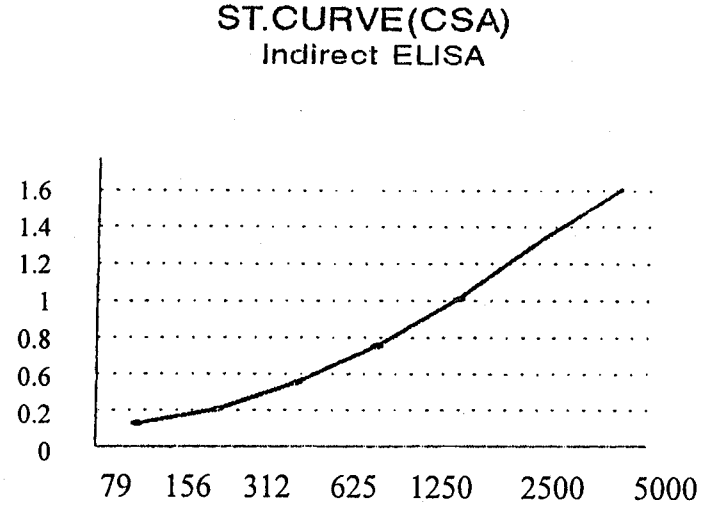
جدول ۳. نتایج آزمایش های الیزای غیر مستقیم برای تعیین غلظت های استاندارد سیکلوسپورین

غلظت	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	میانگین
۷۸ ng/ml	۰/۱۸۵	۰/۱۱٤	–	۰/۱۰۷	۰/۱۰۰	۰/۱۰۷	۰/۱۵۵	۰/۱۳۱	۰/۱۲۸
۱۵٦ng/ml	۰/۲٤۸	۰/۱۷۰	۰/۱۸۹	۰/۲٤۲	۰/۲۲۲	۰/۱٦۰	۰/۱۸۹	۰/۲۱۹	۰/۲۰٤
۳۱۲ng/ml	۰/۳۹۳	۰/۳۱۱	۰/۳۰۳	۰/۳۷۲	۰/۳٦۷	۰/۳۵۱	۰/۳٦۱	۰/۳۵۳	۰/۳۵۱
٦۲۵ng/ml	۰/٦۰۹	۰/٤٦۸	۰/٤۲۳	۰/۵۳۸	۰/۵۳۳	۰/۵۰٤	۰/٦٦٦	۰/٦۸۱	۰/۵۵۲
۱۲۵۰ng/ml	۰/۹۱۵	۰/۷۵٤	۰/۷۱۷	۰/۸٦۳	۰/۸۵۲	۰/۷٤۱	۰/۸٤۳	۰/۷۹۰	۰/۸۰۹
۲۵۰۰ng/ml	۱/۲۷۹	۱/۰۹۳	۰/۰۲٤	۱/۲۰۷	۱/۱۲۵	۱/۰۱۲	۱/۰٦٤	۱/۱۵۰	۱/۱۱۹
۵۰۰۰ng/ml	۱/٤۱۷	۱/۳۸۵	۰/۳٤٤	۱/٤٤۲	۱/۳۸٦	–	–	۱/٤۵۷	۱/٤۰۵

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به مقادیر میانگین جذب نوری در رقت های مختلف سیکلوسپورین، نمودار (۳) به عنوان منحنی استاندارد غلظت های مختلف سیکلوسپورین و جذب نوری آن ها در الیزای غیر مستقیم رسم گردید



نمودار شمارهٔ ۳. منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف سیکلوسپورین و جذب نوری آنها در الیزای غیر مستقیم

همان طور که مشاهده می‌شود این سیستم الیزای طراحی شده توانایی تشخیص غلظت های مختلف سیکلوسپورین را تا حد ۱۰۰ng/ml داراست .

٤- در آزمایش الیزای غیر مستقیم برای تعیین غلظت سیکلوسپورین در خون تام بیماران پیوندی دریافت کنندهٔ سیکلوسپورین، اتانول سبب ایجاد تغییراتی در حفرات پلیت الیزا می‌گردید و جهت ممانعت از این اثر اقدام به تهیه رقتهای مختلفی با PVP/PBS شد. در این حال احتمالاً به علت کاهش غلظت سیکلوسپورین پائین‌تر از ۱۰۰ ng/ml جواب مناسبی به دست نیامده و استفاده از PVP نیز برای تحویل گرفتن C SA از متانول، به دلیل وجود واکنش متقاطع با آنتی سیکلوسپورین کونژوگه ممکن نشد. در بررسی امکان واکنش متقاطع بین Anti- CSA- Ab- PVP در خرگوش مشاهده شد که استفاده از محلول PVP در PBS حتی تا رقت ۱۶۰۰۰ :۱ نیز میزان جذب نوری بیش از ۱.۰ را تولید می‌کند. بنابراین از این آزمایش الیزای غیر مستقیم که برای غلظت های استاندارد سیکلوسپورین استفاده می‌شود نمی‌توان برای خون تام استفاده کرد. استفاده از سرم نیز برای تعیین CSA در آن به علت پائین بودن غلظت سیکلوسپورین حساسیت بالایی نداشت.

بحث و نتیجه گیری

درتحقیقات انجام شده برای اندازه‌گیری غلظت سیکلوسپورین توسط FPLA.ELISA.RIA.HPLC وحتی روش‌های جدیدی چون EMLA.CLIA.ACMIA آنتی بادی‌های پلی کلونال و مونوکلونال مختلفی تولید شده و هریک دارای حساسیت‌های متفاوتی می‌باشند [۱۹،۱۶،۱۵،۱٤،۵،٤].حیوانات مختلفی نیز چون موش، خوکچه هندی، خرگوش، بز و اسب توسط کونژوگه‌های مختلفی از سیکلوسپورین با پروتئین

www.SID.ir

Archive of SID

های حامل، ایمونیزه شده و عیارهای مختلفی از آنتی سیکلوسپورین ایجاد شده است [۲،۵،۸،۱۴،۱۵،۱۹].

در تحقیقاتی نیز که توسط Quesniaux انجام شده از CSA و CSC بانضمام BSA استفاده شده و عیارهای بالایی نیز (Anti- CSA- Ab) تولید گردیده است [۱۴،۱۶،۱۹].

در این تحقیق نیز با استفاده از دو نوع کونژوگه و دو نوع حیوان اقدام به تولید آنتی بادی علیه سیکلوسپورین شده و همان طور که از نتایج پیداست ، حیوانات به خوبی توسط کونژوگه‌های تهیه شده ایمونیزه گردیده و آنتی بادی با ویژگی و عیار بالایی نسبت به CSA+ BSA در خرگوش بدست آمده است. در آزمایش الیزای غیر مستقیم، عیار آنتی سیکلوسپورین خرگوش تا رقت ۱۲۰۰۰ :۱ و عیار آنتی سیکلوسپورین بز تا رقت ۸۰۰۰ : ۱ به نحو مطلوبی ارزیابی گردیده و اختصاصیت آن بر علیه CSA تأئید شد . هم چنین پس از تخلیص فراکسیون گاما از آنتی سیکلوسپورین به دست آمده به وسیلهٔ آنزیم پراکسیداز به خوبی کونژوگه شده و عیار آنتی نشاندار شده با پراکسیداز به روش الیزای غیر مستقیم ارزیابی گردید. در نهایت Anti- CSA-Ab و Anti-CSA-J3 G کونژوگه شده با پراکسیداز در یک سیستم الیزای غیر مستقیم توانایی تشخیص غلظت های مختلف سیکلوسپورین را تا حد ۱۰۰ng/ml دارا هستند ولی برای استفاده از این سیستم در تعیین غلظت CSA در خون تام باید تحقیقات کامل تری انجام شود و موانع موجود مرتفع گردد. تولید و مطالعه چنین آنتی بادی هایی همراه با افزایش اختصاصیت آن ها و هم چنین در اولویت قرار دادن تولید آنتی بادی های مونوکلونال علیه CSA می‌تواند راه را برای طراحی سیستم‌های آزمایشی مختلفی چون ایمیونوهیستوشیمی،ایمیونوسیتوشیمی و ایمیونوفلورسنس باز کرده و از آن ها در تشخیص و تعیین غلظت سیکلوسپورین در خون، سرم و مایعات بیولوژیک استفاده کرد و از این طریق، گامی هر چند ناچیز در جهت پیشرفت و خودکفائی ملی برداشت.

تقدیر و تشکر

از گروه ایمونولوژی دانشکدهٔ پزشکی شیراز و همکاری صمیمانه سرکار خانم دکترفرجادیان و خانم دکتر درودچی و هم چنین از بخش پیوند اعضای بیمارستان نمازی شیراز و جناب آقای دکتر نصر ا... قهرمانی‌کمال تشکر و سپاسگزاری ابراز می گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

Refrence:

1- Allen p.c; Laboratory animals and care use; In Anti body Techniques ; Edited by v.s. Malik & E.P. Lillehoz. Academic press, INC.,1994 , pp:115-170.

2- Ball p.e , Munzer h , Kelle H.P, et al; Sacific ^{3}H Radio immunoassay with a monoclonal antibody for monitoriug cyclosporine in blood. Clinical chemistry , 1988, 34: 257- 260.

3- Behanushali J.K , Gilbertjm & mcdougald LR ; Simple methods to purify chicken immunoglobulin ; Poultry science ,1994 , 73: 1158- 1161.

4- Cacalano N. A , clevelanowl , & erlanger bf; Anti bodies to cyclosporiue A (CSA) by a novel route and Their use to monitor cyclosporine levels by radioimmunoassay (RIA) ; Journal of Immunology Methods ,1989, 8:257-263.

5- Chen , P. tal , h.h ; A sensitive enzyme immunoassay for cyclosporine A using antibodies generated against a novel hapten; Research Communication Molecular pathologyarmacology , 1995, 88: 317-326.

6- Croowther JR ; Methods in molecular biology ; ELISA , Theory and practice Humana press ; 1995.

7- Harlow E. & LANE D ; Antibodies, a laboratory manual ; Cold spring Horbor press.

8- Holt d.w , johnston A , marsden J.T , etal ; Monoclonal antibodies for radioimmonoassay of cyclosporine: a mutitcenter comparison of their per formance with the sandoz polyclonal radioimmunoassay kit ; Clinical chemistry,1988, 34: 1091 – 1096.

9- Hudson l. & hay f. c ; Practical Immunology. Blackwell scientific pubticalions ; 1989 .

10- Johnstone A. & Thorpe R. ; Immuno chemistry in practice ; Blackwell scienti fic publications , 1987.

11- Kemeny d.m ; Titration of antibodies ; Journal of Immunological Methods , 1992 , 150: 157-76.

12- Kivisto k .t ; A review of assay mathods for cyclosporine clinical pharmacokinetic; 1992 , 23: 173- 190.

13- Mckinney m. m. . A simple. non chromato graphic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid ; Journal of Immunological Mcthods 1987 , 96: 271-278 .

14- Quesniaux v. f. ,tees , r., Schreier, m. h., et al ; Monoclonal antibodies to cyclosporine ; Progress Allergy,1986 , 38: 108- 122 .

15- Quesniaux v.f , tees ,r., schreier, m . h., et al ; Potenlial of Monoclonal anlibodies to improve thera peulic monitoring of cjclosporine,Clinical chemistry ;1987 , 33: 32-37.

16- Quesniaux v. f ; Monoclonal antibody technology for cyclosporine monitoring. Clinical Biochemistry ,1991 , 24: 37-42.

17- Rouach e . y., Shinitzky m. & rubinsein m ; A method for preparing biologicallg aclive aqueous cyclosporine A solutions avoiding the use of detergents or organic solvents ; Journal of Immunological Methods ,1990 , 135: 147-153.

18- Steinbuch m.& andran k ; The isolotion of JgG form mammalian sera with the aid of caprylic acid ; Archievs in Biochemistry Biophysis ,1969 , 134: 279-284.

19- Zenke g., zeder g . strjttmatterwovu .et al ; Anti-cyclosporine monoclonal antibodies and their anti-idiotopic counterpart, struchire and biolo gical acclivity ; Mo lecular Immunology ,1992 , 29: 343- 351.

www.SID.ir

Archive of SID

Antibody production against Cyclosporine

Hussein Zade M. (MSc)

Abstract: CyclosporiueA (CSA) is currently regarded as one of the common Immunosuppressive agents in organ transplantation among autoimmune patients and GVHD prevention after bone marrow transplantation. it exerts its effects through inhibition of (IL –2,3,4) qeue expression and IL –2R IFN –r and GM – CSF . The monitoring of CSA is a useful approach to reduce the risk of groft rejection and to prevent its toxicity .

This monitoring is performed to obtain optimal doses of CSA peak and exact levels in each patient. To assess the level of CSA in the blood,there are multi-technical methods such as HPLC ,RIA ,FPIA ,... .

In this study , Cyclosporine – A (CSA) was conjugated bovine serum albumin (BSA) by glutaraldehyde chemical cross – linker . CSA – BSA conjugate was injectd to rabbits and goats subcutanously in order to obtain CSA specific anti - sera . increase in antibody titer was achieved after twotimes injections .

Goat and rabbit sera are detected casein – CSA in a titration of 1: 12000 and 1:8000 respectively . Hyper immune goat and rabbit sera were subjected to caprylic acid precipitation and IgG fraction was conjugated to horse radish peroxidas .These antibodies were able to detect standard levels of CSA (minimum amount =100 mg/ml) in an indirect Elisa assay .The findings suggest these antiserums to be used in the detection of CSA in RBC ,whole blood and patients sera by multitechnical methods .e.g: Immunohistochemistry , immunocytochemistry and Immunofleurescens in future.

Key words : *Cyclosporine ,ELISA ,body organ transplantation*

www.SID.ir