

## طراحی یک روش الیزای رقابتی جهت ارزیابی قدرت سرم ضد سم مار

• فریبا گلچین فر (نویسنده مسئول)

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی بخش پروتئومیکس و بیوشیمی

• رسول مدنی

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی بخش پروتئومیکس و بیوشیمی

• تارا امامی

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی بخش پروتئومیکس و بیوشیمی

• حسین ذوالفقاریان

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی بخش تصفیه سرم

• عباس زارع

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی بخش جانوران سمی

• ناصر محمد پور

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی بخش جانوران سمی

تاریخ دریافت: مرداد ۹۴ تاریخ پذیرش: مرداد ۹۴

Email: f\_golchinfar@yahoo.com



### چکیده

جهت تعیین توان پتانسی سرم پلی والان ضد سم مار در خنثی کردن سم، از مجموع سموم مارهای ناجا ناجا اکسیانا، وپیرا لبتینا، وپیرا آلبیکورنوتا، اکیز کاریناتوز، پسیدوسراسستوس پرسپوس و آجیسترودون هالی استفاده شده است. LD<sub>50</sub> یا دوز کشنده در موش ۶/۵ μg در هر موش تعیین شده است. روش خنثی سازی سم جهت تعیین پتانسی سرم ضد سم مار، الیزای رقابتی و LD<sub>50</sub> (یک روش درون تن) است. از این دو روش جهت تعیین پتانسی در ۱۵ نمونه سرم اسب هایپرایمن استفاده شد. نتایج الیزای رقابتی برای تعیین پتانسی نشان داد که رقت ۱/۱۲۰۰۰ سرم اسب هایپرایمن توان مهار ۵۰ درصد سم را دارد. الیزای رقابتی با سنجش بیولوژیکی رایج LD<sub>50</sub> که یک روش درون تن است مورد مقایسه قرار گرفت. همبستگی معناداری بین تیتراهای الیزا و مقادیر LD<sub>50</sub> در سطح معناداری  $P \leq 0/01$  و  $r = 0/95$  مشاهده گردید، که نشان می دهد روش مورد مطالعه در این پژوهش در شرایط *in vitro* (برون تن) می تواند ظرفیت خنثی سازی آنتی بادی های سرم را همانند سنجش بیولوژیکی *in vivo* (درون تن) با دقت بالا تخمین بزند. نتایج پژوهش حاضر نشان می دهد روش الیزای رقابتی با قابلیت اندازه گیری مقدار کمپلکس آنتی ژن - آنتی بادی می تواند جایگزین مناسبی برای روش خنثی سازی کشندگی در محیط درون تن باشد.

کلمات کلیدی: الیزا، سم مار، کارایی سرم، خنثی سازی

- Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 110 pp: 9-16

### Designing a competitive ELISA for evaluation of anti-snake venom serum potency

By: Golchinfar, F. (Corresponding Author) Dept. of Biochem & Proteomics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, IR Iran. Madani, Rasool. Dept. of Biochem & Proteomics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, IR Iran. Emami, Tara. Dept. of Biochem & Proteomics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, IR Iran. Zoulfagharian, H. Dept. of Serum & Proteomics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, IR Iran. Zare, A. Dept. of Venomous Animals and Antivenom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, IR Iran. Mouhammadpour, N. Dept. of Venomous Animals and Antivenom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, IR Iran.

Received: July 2015 Accepted: July 2015

Email: f\_golchinfar@yahoo.com

The venom of *Naja naja oxiana*, *Vipera lebetina*, *Vipera albicornouta*, *Echis carinatus*, *Pseadocerastus persicus* and *Akgistrodon halys* snakes are used to determine the potency of the polyvalent sera in neutralizing the venom. LD50 value per mouse was determined 6.5  $\mu$ g. Neutralizations methods for obtaining potency of anti venom are competitive ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) and in vivo assay (ED50). Both of these tests were performed to estimate the serum potency in 15 samples of hyper-immune equines. Results of competitive ELISA showed that 1/12000 diluted serum can inhibits 50 percent of antigens. Competitive ELISA was compared with current biological assay ED50. Significant correlations between ELISA titers and values of ED50 at level of  $P \leq 0.01$  and  $r=0.95$  was observed, that indicates competitive ELISA can estimate antibody neutralizing capacity of the serum as well as the in vivo assay. The results of present study shows C-ELISA that measures Ag-Ab complex can used as a suitable replacement method for lethal neutralizing in vivo method.

**Key words:** ELISA, Snake venom, Potency, Neutralization

تا بتواند بصورت (in vitro) پتانسی سرم ضد مار را اندازه‌گیری نماید و در نهایت نتایج هر دو روش مقایسه می‌گردد. روش in vitro ویژگی‌هایی دارد که عبارتست از سادگی اجراء، زمان‌بری کمتر، تکرارپذیری بیشتر و نهایتاً هزینه‌های مناسب‌تر.

مسلماً بهره‌برداری کردن از روش‌های بیولوژیک in vivo به علت بکارگیری حیوانات آزمایشگاهی سختی‌های بیشتری دارد که هم از نظر کارکردن با حیوان و هم از نظر اقتصادی مسائل بیشتری ایجاد می‌نماید جایگزینی و یا مقایسه این روشها با روشهای آزمایشگاهی in vitro راحت تر و ارزانتر انجام می‌شود (۷ و ۱۰ و ۲۲).

### مواد و روش کار

#### سنجش پروتئین به روش LOWRY

متداول‌ترین روش تعیین کل پروتئین روش Lowry می‌باشد. اساس این روش واکنش پروتئین‌ها با معرف فولین تحت شرایط قلیائی با مس و احیای فسفومولیدیک تنگستیک اسید به هتروپلی مولیدنوم آبی رنگ است. نتیجه کار رنگ آبی پر رنگ می‌باشد حساسیت این آزمایش ۱-۰/۱ میلی گرم پروتئین در میلی لیتر است.

در این سنجش از پروتئین استاندارد BSA استفاده می‌شود که غلظت اولیه آن ۱ mg/ml می‌باشد و از آن، رقت‌های مختلف از صفر تا صد میکرولیتر

### مقدمه

در مسیر طولانی تاریخ تکامل، مارها و دیگر جانوران زهردار موتیف‌های ساختاری پیچیده و جدیدی از پروتئین‌ها را ارائه کردند که از لحاظ دارویی طیف وسیعی از گیرنده‌ها و کانال‌های یونی را با تمایل اتصال ویژه و بالا هدف قرار می‌دهند. برخی از این پپتیدهای سمی بقدری اختصاصی هستند که قادر به تعیین تمایزهایی در زیر مجموعه‌های موجود در یک گیرنده می‌باشند (۱۶ و ۱۷ و ۲۵). اگر چه تحقیقات اولیه سم‌ها در جهت درمان مارگزیدگی‌ها صورت می‌گرفت ولیکن امروزه دیدگاه‌های موجود بر جانوران زهردار به طور چشم‌گیری تغییر کرده است. اطلاعات بدست آمده از این دیدگاه‌های تازه شامل اهداف وسیعی از این ملکول‌های زیستی است که به عنوان ملکول‌های نشانه و ابزارهای دارویی جهت بررسی عملکرد زیستی گیرنده‌ها و کانال‌های یونی به کار می‌روند (۲ و ۹ و ۱۱ و ۲۴) اطلاعات مربوط به این ملکول‌ها منجر به تولید ترکیبات رهبر برای طراحی داروهای مناسب در مسایل بالینی شده است (۱۸).

بررسی پتانسی سرم‌های ضد مار یکی از عوامل آزمایشگاهی مهم جهت تایید سرم تهیه شده برای خنثی سازی سم مار یا سموم مارهای مورد نظر می‌باشد. توانائی خنثی سازی سموم مار معمولاً با روش بیولوژیک in vivo lethality assay با نام ED50 (minimum effective dose) انجام می‌شود (۲۰). در این تحقیق تلاش می‌گردد یک روش الیزای رقابتی طراحی گردد

۱/۲۰۰۰، ۱/۳۰۰۰ و ۱/۴۰۰۰) را با آن چک نموده تا با استفاده از نتایج بدست آمده بهترین غلظت آنتی ژن (پروتئین سم مار) در برابر بهترین رقت کونژوگه آنزیمی (سرم اسب حاوی آنتی ونوم ترکیب شده با آنزیم پروکسیداز) بدست می‌آید این روش در الایزا به آزمون checkerboard معروف است.

### الایزای رقابتی کوتینگ

برای این کار از محلول سم مار به عنوان آنتی ژن با غلظت ۱ µg/ml توسط بافر کربنات ۰/۰۵ M pH=۹/۶ تهیه شد و با حجم ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک بارنشینی شد، پلیت به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در مرحله بعد شستشو چاهک‌ها با استفاده از بافر شستشو: ۰/۰۵ M Toweent۲۰ + ۰/۰۱ M PBS pH=۶/۸ انجام گرفت.

### بلاکینگ

بلاکینگ توسط بافر بلاک که عبارتست از: (بافر شستشو + ۵٪ شیر خشک) به حجم ۲۵۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شده و در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. سپس مجدداً با استفاده از بافر شستشو چاهک‌ها شسته شدند.

### انجام واکنش رقابتی

ابتدا برای تهیه کونژوگه آنتی‌بادی از نمونه‌های سرم اسب حاوی آنتی ونوم مخلوطی تهیه گردید و با سولفات آمونیوم ۳۵٪ رسوب داده و رسوب حاصل را که حاوی ایمونوگلوبولین است به روش پریدات با آنزیم HRP نشاندار شد، سپس با استفاده از بافر رقیق کننده: ۰/۰۵ M Toweent۲۰ + ۰/۰۱ M PBS pH=۶/۸ رقت ۱/۱۵۰۰ از کونژوگه آنتی‌بادی تهیه گردید، سپس

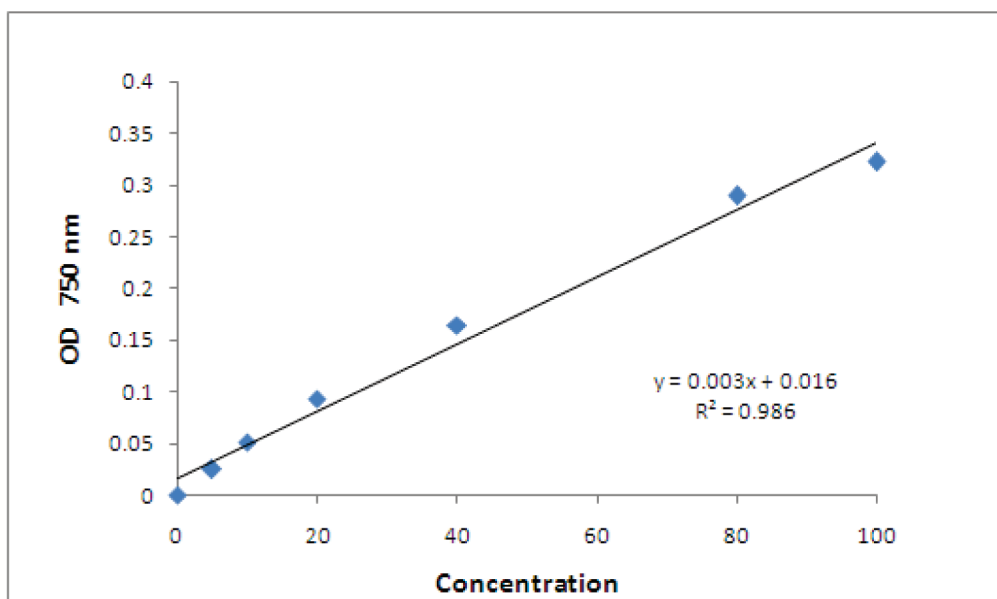
تهیه گردید و منحنی استاندارد، در این محدوده از غلظت‌ها رسم شد (شکل ۱). برای بدست آوردن میزان پروتئین نمونه مجهول با توجه به این نمودار و در دست داشتن میزان جذب نمونه مجهول، غلظت پروتئین در نمونه مجهول به دست می‌آید.

### تهیه آنتی‌بادی کونژوگه شده با آنزیم پراکسیداز

روش پریدات یکی از روش‌های استاندارد برای اتصال گلیکوپروتئین‌ها می‌باشد. پریدات طی یک روند دو مرحله‌ای دو ماکرومولکول را به هم متصل می‌نماید و در سال ۱۹۷۴ این روش پیشنهاد شد، روشی است که بازده بالا و قابل توجه دارد. این روش هم برای اتصال هاپتن‌های حاوی قند (مانند دیگوسین) و هم برای گلیکوپروتئین‌ها (مانند HRP) قابل اجرا است. در این روش ابتدا گروه قندی در حضور پریدات فعال می‌گردد. نحوه فعال شدن بدین ترتیب است در روش اولیه ابتدا گروه‌های آمین آزاد توسط ۱ فلورو ۲ و ۴ دی نیتروبنزن بلوک شده و سپس عمل فعال شدن انجام می‌شود. پریدات با اکسیداسیون عوامل الکلی موجود در ساختمان قند، باعث ایجاد دو عامل آلدئیدی فعال می‌شود. با دیالیز، پریدات اضافی خارج گردیده و آنگاه در مرحله بعد پروتئین دوم (ایمونوگلوبولین) افزوده و واکنش بین گلیکوپروتئین‌ها کامل شده و در پایان با افزودن سدیم بورهیدرات پیوند پایدار می‌گردد (۲۰).

### تعیین غلظت آنتی‌ژن و کونژوگه آنزیمی

جهت بدست آوردن بهترین غلظت برای آنتی‌ژن و مناسب‌ترین رقت برای کونژوگه آنزیمی برای روش الایزا ابتدا، سم مار را بر اساس میزان پروتئین بدست آمده با غلظت‌های مختلف (۱ µg/ml / ۵ µg/ml / ۲ µg/ml) در چاهک‌ها خوابانده و با روش الایزای مستقیم در مرحله بعد رقت‌های مختلف کونژوگه آنزیمی (۱/۱۵، ۱/۲۵، ۱/۵۰، ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/۴۰۰، ۱/۸۰۰، ۱/۱۵۰۰،



شکل ۱- نمودار استاندارد پروتئین (غلظت در برابر جذب نوری)

موش انتخاب شدند. روش کار به اینصورت است که با استفاده از PBS (M ۰/۰۱) غلظت ۱۰۰ µg/ml از سم تهیه شد. سنجش‌ها با استفاده از ۵ سطح (تعداد گروه موش‌ها) با فاکتور رقت (Dilution factor) ۱/۱.۲ انجام شد. تزریق طوری صورت می‌گیرد که به طور متناوب شاهد مرگ و میر بیشتر در گروه‌های اول و مرگ و میر کمتر در گروه‌های آخر باشیم (از غلظت بالا به غلظت پایین). از محلول مورد نظر ۰/۵ میلی لیتر از طریق مسیر درون وریدی به موش تزریق شد (۶ و ۲۱ و ۲۶). ۴۸ ساعت پس از تزریق آمار مرگ و میر، بررسی شد و با برنامه نرم‌افزاری اسپرمن کربر (Spearman Karber) آنالیز انجام شد و میزان LD50 تعیین گردید (۲).

### نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه‌ها

**تست خنثی‌سازی کشندگی سم مار:** خنثی‌سازی کشندگی به وسیله مخلوط مقدار ثابت سم حل شده در PBS با مقادیر متغیری از آنتی ونوم انجام می‌گیرد که نسبت ونوم به آنتی ونوم به عنوان یک سطح در نظر گرفته شد و تزریق به موش‌ها در ۶ سطح با استفاده از فاکتور رقت (Dilution factor) ۱/۱.۵ انجام گرفت به طوری که تزریق در گروه آخر که به عنوان گروه کنترل است فقط با سم و PBS انجام شد. در گروه‌های اول تا پنجم به ترتیب از دوز آنتی ونوم کاسته می‌شود. لوله‌های حاوی مخلوط تهیه شده از ونوم و آنتی ونوم به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند، سپس تزریق درون وریدی ۰/۵ میلی لیتر به هر موش انجام شد (۶ و ۲۱ و ۲۶). ۴۸ ساعت پس از انجام تزریق تعداد موش‌های کشته شده و زنده بررسی شد و با برنامه آنالیز اسپرمن کربر (Spearman karber) میزان ED50 محاسبه شد. Dose Challenge مورد استفاده LD50 ۵ انتخاب شد (۲).

با استفاده از این محلول سرم‌ها با رقت‌های مختلف ۱/۵۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۱۵۰۰، ۱/۲۰۰۰، ۱/۳۰۰۰، ۱/۴۰۰۰، ۱/۵۰۰۰، ۱/۶۰۰۰، ۱/۸۰۰۰، ۱/۱۰۰۰۰، ۱/۱۲۰۰۰، ۱/۱۶۰۰۰، ۱/۲۰۰۰۰، ۱/۲۴۰۰۰ و ۱/۳۲۰۰۰ تهیه شدند. از این رقت‌ها به حجم ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. در این روش، نمونه‌های سرم اسب حاوی آنتی ونوم و کونژوگه آنزیمی برای چسبیدن به سم مار با هم رقابت می‌کنند تا کمپلکس آنتی ژن - آنتی بادی را تشکیل دهند لذا برای هر سرم یک چاهک کنترل نیز در نظر گرفته شد که به آن چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه رقیق شده با همان رقت ۱/۱۵۰۰ بدون سرم اضافه می‌شود. پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند، پس از طی زمان انکوباسیون ۵ بار شستشو با بافر شستشو انجام شد.

**سوئستر:** سپس به چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از سوئستر آماده کروموژن Substrate Solution BM Blue اضافه شد و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و شرایط تاریکی انکوبه شدند. سپس واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر ۱M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) متوقف شد و در طول موج ۴۵۰ نانومتر نتایج قرائت گردید (۳ و ۴ و ۵ و ۸ و ۱۳). در انتها برای بررسی درصد مهار هر یک از سرم‌ها از فرمول زیر استفاده شد. طبق مطالعات Stiles و همکارانش در سال ۱۹۹۴ (۲۷).

$$I = 100 - \left[ \left( \frac{\text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری رفرانس}} \right) \right] \times 100$$

### روش خنثی‌سازی سم مار در vivo (تعیین ED<sub>50</sub>)

برای انجام این آزمایش ابتدا باید دوز کشنده را بدست آورد. **تعیین کشندگی سم مار (ED<sub>50</sub>):** در این آزمایش ۵ گروه ۶ تایی

جدول ۱- نتایج آزمون checkerboard ایبزا برای غلظت‌های مختلف سم پلی والان به عنوان آنتی ژن در برابر رقت‌های مختلف کونژوگه آنزیمی

| Ag (غلظت‌های مختلف سم) | ۰.۵ µg/ml | ۱ µg/ml | ۲ µg/ml |
|------------------------|-----------|---------|---------|
| conjugate              |           |         |         |
| ۱/۱۵                   | ۱/۳۷۰     | ۱/۴۵۹   | ۱/۵۷۸   |
| ۱/۲۵                   | ۱/۵۸۳     | ۱/۲۸۵   | ۱/۴۸۲   |
| ۱/۵۰                   | ۱/۳۲۸     | ۱/۵۸۹   | ۱/۴۳۶   |
| ۱/۱۰۰                  | ۱/۹۰۵     | ۳/۰۰۶   | ۱/۳۶۵   |
| ۱/۲۰۰                  | ۱/۹۶۹     | ۲/۹۰۶   | ۳/۲۵۹   |
| ۱/۴۰۰                  | ۱/۷۲۸     | ۲/۷۲۲   | ۳/۲۲۷   |
| ۱/۸۰۰                  | ۱/۳۴۳     | ۱/۸۰۹   | ۲/۵۵۶   |
| ۱/۱۵۰۰                 | ۱/۵۱۲     | ۱/۳۲۳   | ۱/۰۰۲   |
| ۱/۲۰۰۰                 | ۰/۴۱۱     | ۱/۱۲۱   | ۰/۹۸۷   |
| ۱/۳۰۰۰                 | ۰/۳۳۱     | ۰/۹۵۲   | ۰/۸۰۲   |
| ۱/۴۰۰۰                 | ۰/۲۹۸     | ۰/۸۹۸   | ۰/۵۳۵   |

### تعیین کشندگی LD50 و تعیین نتایج حاصل از تست بیولوژیک خنثی‌سازی LD50 در موش‌ها با ۱۵ سرم پلی‌والانت

نتایج حاصل از تعداد ۵ گروه ۶ تایی موش‌های مورد مطالعه پس از آزمون خنثی‌سازی بطوری که در قسمت روش‌ها توضیح داده شد، ابتدا محاسبات برای بدست آوردن میزان LD50 با برنامه نرم‌افزاری اسپیرمن کربر (Spearman Karber) آنالیز انجام شد و میزان آن تعیین شد (جدول ۳). از آنجا که در تحقیقات دارویی بدست آوردن دوزی از ترکیب مورد نظر که پاسخ را در نصف جمعیت آشکار کند بسیار مورد توجه است که عموماً آنرا دوز موثر میانگین یا ED50 می‌گویند و برای محاسبه آن نیز از روش‌های آماری Probit و Spearman-Karber استفاده می‌شود که در این تحقیق از روش اسپیرمن کربر استفاده شده است. فرمول باز این برنامه در رفرانس شماره ۲ ذکر شده است و نتایج بدست آمده به ترتیب زیر گزارش شد.

- |                       |                       |
|-----------------------|-----------------------|
| 1) ED50=38/734µg/mL   | 2) ED50=728/30 µg/mL  |
| 3) ED50=760/00 µg/mL  | 4) ED50=775/52 µg/mL  |
| 5) ED50=753/53µg/mL   | 6) ED50=871/66 µg/mL  |
| 7) ED50=856/01 µg/mL  | 8) ED50=800/56 µg/mL  |
| 9) ED50=937/24 µg/mL  | 10) ED50=763/33 µg/mL |
| 11) ED50=880/58 µg/mL | 12) ED50=804/34µg/mL  |
| 13) ED50=840/72 µg/mL | 14) ED50=831/75 µg/mL |

### نتایج

#### تعیین مقدار غلظت پروتئین سم مار

با استفاده از نتایج حاصل از روش لوری در سنجش پروتئین کل، مقدار غلظت پروتئین آنتی‌ژن سم مار محاسبه گردید که میزان آن (mg/ml) ۱۵/۵ گزارش شد.

#### نتایج تست الیزا

جهت تعیین بهترین غلظت آنتی ژن در برابر رقت مناسب کونژوگه آنزیمی، اعداد بدست آمده از جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر بدست آمده که نتایج آزمون checker board در جدول ۱ آمده بطوری که ۱ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان بهترین غلظت سم پلی‌والان و رقت ۱/۱۵۰۰ برای کونژوگه آنزیمی انتخاب گردید.

متحنی تغییرات جذب رقت‌های آنتی بادی کونژوگه به منظور تعیین رقت مناسب برای ادامه کار ترسیم شد و آن بخش از نمودار که جذب نوری به عدد ۱ نزدیک‌تر است به عنوان بهترین نقطه انتخاب شد.

در ادامه با توجه به نتایج بدست آمده از جدول ۱، الیزای رقابتی برای ۱۵ سرم اسب در رقت‌های مختلف تیتر شد از آنجا که ما دامنه‌ای از جذب‌های به دست آمده (۱/۷۳۶ - ۰/۹۵۶) برای مهار ۵۰ درصد تعریف شد، در تمامی نمونه‌ها رقت ۱/۱۲۰۰۰ بهترین نقطه برای مهار ۵۰٪ می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲- درصد مهار آنتی بادی کونژوگه با آنتی بادی سرم با استفاده از نتایج الیزای رقابتی

| Sera No | ۱    | ۲    | ۳    | ۴    | ۵    | ۶     | ۷    | ۸    | ۹    | ۱۰   | ۱۱   | ۱۲   | ۱۳   | ۱۴   | ۱۵   |
|---------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| ۱/۵۰۰   | ۸۴   | ۸۴   | ۸۳   | ۸۴,۲ | ۸۹,۷ | ۹۰    | ۹۰,۴ | ۹۰,۸ | ۹۱   | ۹۰   | ۸۵,۵ | ۸۸,۴ | ۸۳,۹ | ۸۵,۱ | ۸۲,۹ |
| ۱/۱۰۰۰  | ۸۲   | ۸۳   | ۸۲,۳ | ۸۲,۲ | ۸۷,۹ | ۸۷,۸  | ۸۹,۶ | ۸۸   | ۸۸,۳ | ۸۷,۱ | ۸۳,۲ | ۸۶,۵ | ۸۰   | ۸۳,۱ | ۷۹,۷ |
| ۱/۱۵۰۰  | ۸۱   | ۸۲   | ۷۸,۸ | ۸۱,۲ | ۸۵,۴ | ۸۶,۲۵ | ۸۷,۸ | ۸۲,۱ | ۸۳,۸ | ۸۱,۸ | ۷۹,۶ | ۸۱,۱ | ۷۸   | ۷۸,۵ | ۷۸,۵ |
| ۱/۲۰۰۰  | ۸۰   | ۸۱,۳ | ۷۵,۶ | ۸۰,۶ | ۸۱,۵ | ۸۱,۹  | ۸۴,۵ | ۸۱,۷ | ۷۹,۸ | ۸۱   | ۷۷,۴ | ۸۱   | ۷۴,۴ | ۷۷,۳ | ۷۳,۴ |
| ۱/۳۰۰۰  | ۷۶   | ۷۹,۷ | ۷۴,۹ | ۷۸,۹ | ۷۸,۲ | ۷۸    | ۸۱,۷ | ۷۶,۴ | ۷۶   | ۷۱,۴ | ۷۱   | ۷۶,۷ | ۶۸,۲ | ۷۰   | ۶۸,۳ |
| ۱/۴۰۰۰  | ۷۲,۳ | ۷۷,۳ | ۷۳   | ۷۸,۲ | ۷۳,۷ | ۷۱,۹  | ۷۸,۹ | ۷۲,۳ | ۷۵   | ۶۹,۸ | ۶۹,۳ | ۷۰,۷ | ۶۰,۵ | ۶۳,۸ | ۶۷   |
| ۱/۵۰۰۰  | ۶۵,۹ | ۷۰,۸ | ۶۲,۱ | ۷۷,۱ | ۷۲,۸ | ۶۹,۳  | ۷۷,۵ | ۷۲   | ۷۱,۵ | ۶۷   | ۶۸,۲ | ۶۹   | ۶۲,۶ | ۵۹   | ۶۶,۷ |
| ۱/۶۰۰۰  | ۶۲,۱ | ۶۸,۲ | ۶۱,۱ | ۶۴,۹ | ۷۲,۵ | ۶۸,۶۵ | ۷۳   | ۶۷,۶ | ۶۱,۲ | ۶۵,۸ | ۶۴,۵ | ۶۳,۳ | ۵۷,۴ | ۵۷,۴ | ۵۶,۷ |
| ۱/۸۰۰۰  | ۵۶,۳ | ۶۶,۸ | ۵۹,۶ | ۵۹,۷ | ۶۹,۹ | ۶۸,۲  | ۶۹   | ۶۷   | ۵۸   | ۵۷,۳ | ۶۱   | ۵۴   | ۵۸,۷ | ۵۷   | ۴۸,۸ |
| ۱/۱۰۰۰۰ | ۵۴   | ۶۱   | ۵۸,۵ | ۵۴,۴ | ۶۷,۲ | ۶۳,۷  | ۶۵,۴ | ۶۶   | ۵۲,۲ | ۵۳,۲ | ۵۷,۴ | ۵۳   | ۴۶,۸ | ۵۲,۱ | ۴۸   |
| ۱/۱۲۰۰۰ | ۵۱   | ۵۷,۲ | ۵۳   | ۵۰,۲ | ۶۶,۴ | ۵۱,۲  | ۶۰   | ۵۰,۹ | ۴۸   | ۴۶,۴ | ۵۰,۳ | ۴۸,۹ | ۴۰,۵ | ۳۶,۸ | ۴۷,۹ |
| ۱/۱۶۰۰۰ | ۴۹   | ۵۱,۶ | ۵۰,۹ | ۴۸,۹ | ۵۴   | ۴۶,۶  | ۵۸,۹ | ۴۹   | ۴۳,۳ | ۴۵   | ۴۹,۲ | ۳۹,۶ | ۳۸   | ۳۳,۹ | ۳۹,۶ |
| ۱/۲۰۰۰۰ | ۴۷,۲ | ۴۸,۲ | ۴۹,۳ | ۴۷,۶ | ۴۹,۷ | ۳۴,۱  | ۵۶,۴ | ۴۳,۵ | ۳۸,۸ | ۳۹,۲ | ۴۴,۵ | ۳۸,۸ | ۳۵,۲ | ۳۲,۲ | ۳۵,۸ |
| ۱/۲۴۰۰۰ | ۴۱,۳ | ۴۶,۳ | ۴۷,۲ | ۴۵,۹ | ۴۸,۷ | ۳۳    | ۴۶,۸ | ۴۲,۱ | ۳۳   | ۳۳,۵ | ۴۱,۶ | ۳۶,۴ | ۳۳   | ۱۸,۶ | ۳۴,۷ |
| ۱/۳۲۰۰۰ | ۳۸   | ۴۰   | ۴۱,۸ | ۴۱   | ۳۲,۵ | ۳۰,۴  | ۴۲,۵ | ۳۲   | ۳۱,۷ | ۲۸   | ۳۸   | ۱۳   | ۲۵   | ۹,۲  | ۲۲   |

است و مشکلات بسیاری را در سازمان بهداشت جهانی مطرح ساخته است (۱۲). در همین راستا این سازمان با رویکردهای مختلفی همچون سروترایی و توسعه بعضی از داروهای درمانی تا حدودی توانسته است با خنثی سازی سموم مار درصدی از مشکلات موجود را کاهش دهد و تلاش کرده است، با ارائه راهکارهای مناسبی در زمینه بهداشتی با خنثی سازی سم به صورت پیش بالینی در موشها (in vivo) و با تکنیکی مثل ایزای (in vitro) بتواند بر این مشکلات فائق بیاید (۱۵ و ۱۸ و ۲۸). در مطالعات Rungsiwongse و همکاران در سال ۱۹۹۱ ایزایی را برای تعیین کمیت آنتی بادیها در برابر سم نوروکسین *Naja naja siamensis* به عنوان آنتیژن بررسی نمودند در این مطالعه که از سم خام و تخلیص

۱۵) ED<sub>50</sub>=777/81 µg/mL

از جذبهای نوری تعریف شده حاصل از تیتراهای آنتی بادی به دست آمده در ایزای رقابتی و مقدار ED<sub>50</sub> های محاسبه شده، جهت ارتباط بین این دو پارامتر استفاده می شود. مقایسه نتایج داده های حاصل از آزمون ELISA و تست ED<sub>50</sub>، میزان همبستگی مناسب ۰/۹۰۴ را نشان می دهد (شکل ۲).

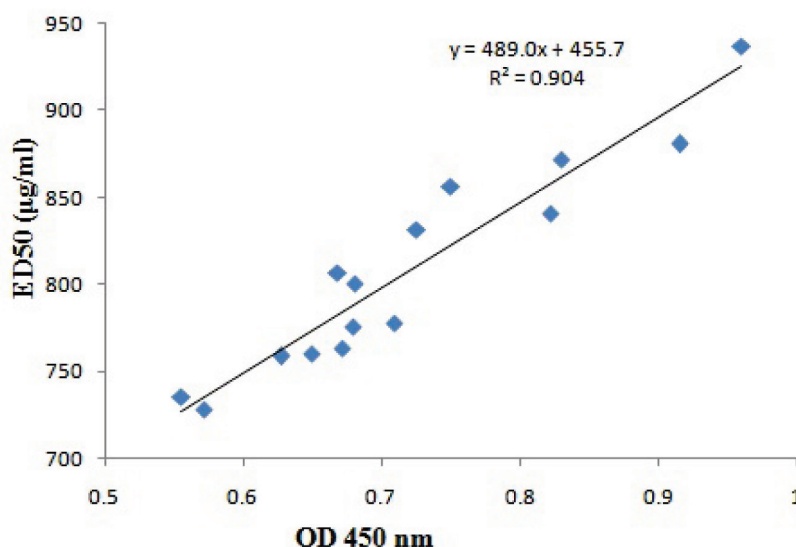
### بحث

مار گزیدگی از مسائلی است که گستره وسیعی از جهان را در بر گرفته

جدول ۳- تعیین میزان DL<sub>50</sub> با نرم افزار اسپرمن کربر

| Level                     | Venom<br>(at ۱۰۰۰ µg/mL) | PBS<br>(mL)           | Total<br>(mL) | Death |
|---------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------|-------|
| ۹,۱۸ µg                   | ۰,۰۶۴ mL                 | ۳,۴۳۶                 | ۳,۵۰۰         | ۶/۶   |
| ۷,۶۵ µg                   | ۰,۰۵۳ mL                 | ۳,۴۴۷                 | ۳,۵۰۰         | ۶/۶   |
| ۶,۳۸ µg                   | ۰,۰۴۴ mL                 | ۳,۴۵۶                 | ۳,۵۰۰         | ۶/۴   |
| ۵,۳۱ µg                   | ۰,۰۳۷ mL                 | ۳,۴۶۳                 | ۳,۵۰۰         | ۶/۲   |
| ۳,۵۴ µg                   | ۰,۰۲۴ mL                 | ۳,۴۷۶                 | ۳,۵۰۰         | ۶/۰   |
| LD <sub>50</sub> =۶,۵۰ µg |                          | Upper confidence=۶,۹۹ |               |       |
|                           |                          | Lower confidence=۶,۰۴ |               |       |

شکل ۲- نمودار همبستگی تیترا ELISA با DE 05 در سرم پلی والان



ELISA

- 581.
2. Art Carter, Wyeth-Ayerst Research, Chazy, NY. 1991. Using the Spearman-Kärber method to estimate the ED50, The Best contributed paper. pp. 1120-1125.
  3. Carpent, A. B. 1992. "Enzyme link immunosorbent assay," Clinical Laboratory Immunology, vol. 1, pp. 20-29.
  4. Crowther, J. R. 2001. the Elisa guide book: human press, New Jersey.
  5. Crowther, J. R. 2002. "The ELISA Guide book, method in molecular biology.
  6. Dolimbek, B. Z., Atassi, M. Z and. Salikhov, S. I. 1998. "Presynaptic and postsynaptic neurotoxins. Investigation of the structures of the immune recognition sections." Chemistry of Natural Compounds, vol. 34, pp. 15- 28.
  7. Dowling, T. P. 1978. "Primary care--the Cinderella of health care and of nursing too," J N Y State Nurses Assoc, vol. 9, pp. 21-4,
  8. Engrall, E. and Perlman, P. 1971. "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Quantitative assay of Immunoglobulin G,". Immunochemistry, vol. 8, pp. 871-874.
  9. Hatanaka, H. Oka, M Kohda, D. Tate, S. Suda, A. Tamiya, N. and Inagaki, F. 1994. "Tertiary structure of erabutoxin b in aqueous solution as lucidated by two-dimensional nuclear magnetic resonance.," J Mol Biol., vol. 240, pp. 155-166.
  10. Hock, B., Rahman, M., Rauchalles S., Dankwardt A., Seifert, M., Haindl S., and Kramer K, 1999. "Stabilisation of immunoassays and receptor assays," Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic vol. 7, pp. 115-124.
  11. Karlsson, E. 1979 "Chemistry of protein toxins in snake venoms. Snake venoms," in Handbook of experimental pharmacology. vol. 52, C.-Y. e. Lee, Ed., ed Berlin: Springer Verlag, , pp. 159-212.
  12. Kumar, B. K. Nanda, S. S. Venkateshwarlu, P., kumar, Y. K. and Jadhav, R. T. 2010. "ANTISNAKE VENOM SERUM (ASVS)," Indian journal of pharmaceutical and biological research. vol. 1, pp. 76-89.
  13. Lequn, R. 2005. "Enzyme immunoassay (EIA)/ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)," Clin, Chem, vol. 51, pp. 2415-2418.
  14. Maria, W. S., Pacheco, B G., Barbosa, C F Velarde, D T, and Chávez- Olórtégui, C. 2001. Determination of the neutralizing potency of horse antithrotophic and anticrotalic antivenoms in blood samples collected on filter paper. Toxicon vol 39, No,10, pp1607-9.
  15. Mordvintsev, D. Y. Polyak, Y. L. Levtsova, O. V. Tourleigh, Y. V. Kasheverov, I. E. Shaitan, K. V. Utkin, Y. N and. Tsetlin, V.

شده استفاده شده بود تیتروهای آنتی بادی ایذا به گونه‌ای بود که با تست خنثی سازی درون تن ضریب همبستگی آنها بررسی و به ترتیب  $0/82$  ( $P \leq 0/001$ ) و  $0/94$  ( $P \leq 0/001$ ) گزارش شده است (۲۳). در مطالعه دیگری هم Alape-Girón, A و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که آنتی ونوم‌های *Micrurus nigrocinctus* در برابر سموم *Bothrops multicinctus* و *Nothechis scutatus* تیترو شدند و هیچ ارتباطی بین قدرت آنتی ونوم‌ها برای محافظت در برابر کشندگی و تیتروهای ایذا غیر مستقیم در مقابل هر یک از سموم ذکر شده وجود ندارد. پس نتیجه می‌گیریم آنتی بادی‌های موجود در سرم یک گونه اثر کشندگی زهرهای نورتوکسین همولوگ را نسبت به سموم هترولوگ بهتر خنثی می‌سازد (۱). مطالعات دیگر از Maria, W. S در سال ۲۰۰۱ نشان می‌دهد که سیستم ایذای غیر مستقیم برای قدرت آنتی ونوم‌های *anti bothrophic* و *anticrotalic* در نمونه‌های جمع آوری شده روی کاغذ فیلتر استفاده شد و سموم موجود برای انجام ایذا به کار گرفته شد که ضریب همبستگی را بین ED50 و تیتروهای ایذا در برابر سموم *Bothrops jararaca* و *Crotalus durissus* را بررسی و آنها را به ترتیب  $0/78$  ( $P \leq 0/001$ ) و  $0/8$  ( $P \leq 0/001$ ) گزارش کردند (۱۴).

در مطالعه‌ای Solano, G و همکاران در سال ۲۰۱۰ ضریب همبستگی قدرت تیتروهای آنتی بادی ایذا و مقادیر ED50 را در برابر کشندگی  $4LD50$  سم *Bothrops asper* را قابل قبول و ضریب همبستگی در سطح  $0/001$  ( $P \leq 0/001$ ) و  $0/92$  ( $r = 0/92$ ) را مشاهده کردند (۲۶).

در پژوهش حاضر ایذای رقابتی برای تخمین قدرت آنتی بادی‌های موجود در سرم اسب‌های هایپر ایمن علیه مارهای سمی ایران بنام‌های *Naja naja oxiana*, *Vipera lebetina*, *Vipera albicornouta*, *Echis carinatus*, *Pseudocerastes persicus*, *Agkistrodon halys* طراحی شده است. با توجه به اینکه رقابت آنتی بادی سرم و کونژوگه را داشتیم، نگاهی به جذب‌های نوری به دست آمده و رنگ واکنش نشان می‌دهد حضور آنتی بادی بیشتر سرم در چاهک‌ها باعث ایجاد سیگنال کمتری شده است و در نتیجه منحنی به دست آمده نیز معکوس می‌باشد. و در رقت  $1/12000$  کمپلکس مولکول‌های آنتی‌ژن-آنتی‌بادی در هر دو نوع کونژوگه و سرم تقریباً به صورت برابر است، بنابراین رقابت بین کونژوگه و سرم برای اتصال به آنتی‌ژن ۵۰ به ۵۰ می‌باشد یا به عبارت دیگر ۵۰ درصد از آنتی‌ژن‌ها با آنتی بادی کونژوگه و ۵۰ درصد بقیه با آنتی بادی‌های سرم مهار شده‌اند. در این پژوهش از ۱۵ نمونه سرمی استفاده شده، به دلیل مقدار سرم و آنتی بادی‌های بکار رفته در هر سطح و آمار مرگ و میر متفاوت موش‌ها، مقدار ED50 تک تک سرم‌ها فرق کرده است.

قدرت خنثی سازی سرم پلی والان در هر دو درون تن و برون تن تخمین زده شد و ارتباط شدیدا معناداری ( $0/001$  ( $P \leq 0/001$ ) و  $0/95$  ( $r = 0/95$ ) بین تیتروهای ایذا و خنثی سازی در محیط بیولوژیک مشاهده شد.

#### منابع مورد استفاده

1. Alape-Girón, A Miranda-Arrieta, K, Cortes-Bratti, X Stiles, B and Gutiérrez, J. 1997. "A comparison of in vitro methods for assessing the potency of therapeutic antisera against the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*," Toxicon, vol. 35, pp. 573-

- I. 2005 "A model for short alpha-neurotoxin bound to nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*: comparison with long-chain alpha- neurotoxins and alpha-conotoxins," *Comput Biol Chem*, vol. 29, pp. 398- 411.
16. Mukherjee, A. K. and Maity, C. R. 2002."Biochemical composition, lethality and pathophysiology of venom from two cobras--*Naja naja* and *N. kaouthia*," *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, vol. 131, pp. 125-32.
17. Nasiripourdori, A. Ranjbar, B., Naderi-Manesh, H Mehrnejad, F. Soofian, S. Sadeghi, G. and Kolahian, S. 2008."Structural-functional studies of peptides derived from a long-chain snake neurotoxin *Naja naja oxiana*," *Physiology and Pharmacology*, vol. 12, pp. 209-220.
28. Nielsen, K. Smith, P. Yu, W. Celmgren, L. Nicoletti, P. Perez, B. Bermudez, R. and Renteria, T. 2007." Second generation Competitive enzyme immunoassay for detection of bovine antibodies to brucella abortus in bulk milk samples. *Veterinary of Microbiology*. vol. 82, pp. 55-60.
19. Nirthanan, S. and Gwee, M. C. E. 2004."Three-Finger -Neurotoxins and the Nicotinic Acetylcholine Receptor, Forty Years On" *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 94, pp. 1-17.
20. Rial, A. Morais V., Rossi, S. and Massaldi, H. 2006 "A new ELISA for determination of potency in snake antivenoms," *Toxicon*, vol. 48, pp. 462-6.
21. Raweeritha, R. and Ratanabanangkoon, K. 2005. "Immunochemical and biochemical comparisons of equine monovalent and polyvalent snake antivenoms," *Toxicon*, vol. 45, pp. 369-375,.
22. Rowel, V. 1992. "Nunc Guid tosalid phase," *Nunc Brand product*, pp. 5-35.
23. Rungsiwongse, J. and Ratanabanangkoon, K. 1991."Development of an ELISA to assess the potency of horse therapeutic antivenom against Thai cobra venom," *J Immunol Methods*, vol. 136, pp. 37-43.
24. Sells, P. G. 2003."Animal experimentation in snake venom research and in vitro alternatives," *Toxicon*, vol. 42, pp. 115-33.
25. Shashidharamurthy, R. Kemparaju, K. A. 2006. Neurotoxic phospholipase A2 variant: Isolation and characterization from eastern regional Indian cobra (*Naja naja*) venom, *Toxicon* 47, pp. 727-733.
26. Solano, G. Segura, A. Herrera, M. Gómez, A. Villalta, M. Gutiérrez, J. and León, G. 2010. "Study of the design and analytical properties of the lethality neutralization assay used to estimate antivenom potency against *Bothrops asper* snake venom," *Biologicals*, vol. 38, pp. 577-585.
27. Stiles, B. G. Sexton, F. W. Guest, S. B. Olson, M. A. and Hack, D. C. 1994."Characterization of monoclonal antibodies against *Naja naja oxiana* neurotoxin I," *Biochem J*, vol. 303 ( Pt 1), pp. 163-70.
28. Tsetlin, V. I. and Hucho, F. 2004 "Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications," *FEBS Lett*, vol. 557, pp. 9-13.

