

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 حسین زاده * ، دکتر عباس قادری **

چکیده

سیکلوسپورین داروی سرکوب کننده سیستم ایمنی بوده و در سطح وسیعی در پیوند اعضا بیماران خودایمن و جلوگیری از بروز GRHD به دنبال پیوند مغز استخوان مورد استفاده قرار می گیرد. در این تحقیق با تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه سیکلوسپورین، امکان اندازه گیری غلظت دارو در خون توسط سیستم الیزای غیر مستقیم ارزیابی شده است. بدین صورت که سیکلوسپورین خالص (Sandoz) با استفاده از گلو تار آلدئید به آلبومین گاوی (BSA) و هموسیائین (KLH) متصل و ترکیبات حاصل جهت تولید آنتی بادی به خرگوش و بز تزریق گردید. سپس فراکسیون گاما از سرم ایمیون حیوانات جدا شده و با آنزیم پراکسیداز کونزوگه گردید. اختصاصی بودن این آنتی بادی برای سیکلوسپورین - A به روش الیزای غیر مستقیم مورد تأیید قرار گرفت. عیار آنتی بادی خرگوشی علیه ترکیب سیکلوسپورین و کازئین کورت شده ۱:۱۲۰۰۰ و عیار آنتی بادی بز ۱:۸۰۰۰ تعیین گردید. این آنتی بادی خالص شده در الیزای غیر مستقیم توانایی اندازه گیری غلظت های مختلف CSA را داراست و کم ترین غلظت قابل اندازه گیری ۱۰۰ mg/ml می باشد. با استفاده از این آنتی بادی ها می توان سیستم های آزمایشی مختلفی چون تکنیک های ELISA، ایمونوهیستوشیمی، ایمونوسیتوشیمی و ایمونوفلورنس را طراحی کرده و برای تعیین غلظت یا حضور سیکلوسپورین در خون و مایعات بیولوژیک از آن ها استفاده نمود.

واژه های کلیدی: سیکلوسپورین، ELISA، پیوند کلیه

مقدمه

گیری شده و در روش های غیر اختصاصی غلظت CSA به انضمام متابولیت های مختلف آن نیز تعیین می گردد. روش رفرنس در اندازه گیری اختصاصی CSA اصلی،

عموماً دو روش اختصاصی و غیر اختصاصی برای اندازه گیری سیکلوسپورین وجود دارد. در روش اختصاصی غلظت داروی اصلی (Parent CSA) اندازه

* عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام

** عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

می‌گردد. آنتی بادی به دست آمده نیز توسط روش الیزای غیر مستقیم قابل ارزیابی است [۱۴].
در اغلب تحقیقات چهار نوع آنتی بادی CSA مورد استفاده قرار گرفته است:
(۱) آنتی سرم خرگوش یا گوسفندی (بز) حاصل از ایمونیزاسیون با کونزوگه‌های

CSC- ECDI & Chicken-Ig (Hemi. Suc. CSA &

Hexanoic acid) - CSC (CSA & BSA)

(۲) آنتی سرم موشی حاصل از ایمونیزاسیون با

(CSC + ovalbumin)

(۳) آنتی بادی مونوکلونال IgM موشی حاصل از ایمونیزاسیون با CSC آزاد

(۴) آنتی بادی مونوکلونال IgG موشی حاصل از ایمونیزاسیون با CSC آزاد.

از این آنتی بادی‌ها در روش‌های مختلف اندازه‌گیری غلظت سیکلوسپورین استفاده شده است و در یک مطالعه گسترده توسط Quesniaux نتایج بسیار جالبی از مقایسه سه روش ELISA و دو روش RIA برای اندازه‌گیری غلظت سیکلوسپورین به دست آمده است [۱۴].
این بررسی با هدف تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه CSA انجام گردید تا با استفاده از آن در تکنیکهای مختلف برای اندازه‌گیری غلظت CSA مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

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

HPLC^۱ می‌باشد و روش‌های ساده‌تری چون S.mc/FPIA و S.mc/RIA 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 تکنیک‌های مختلفی چون (الیزای مستقیم، غیر مستقیم یا رقابتی) هم برای تعیین عیار آنتی بادی‌های پلی کلونال و مونوکلونال تولید شده علیه CSA و هم برای تعیین غلظت CSA در مایعات بیولوژیک مورد بهره‌برداری قرار گرفت. اولین مرحله در اندازه‌گیری سیکلوسپورین تولید آنتی بادی‌های پلی کلونال یا مونوکلونال علیه آن است و برای این مسئله بایستی داروی سیکلوسپورین را که یک داروی سرکوب کننده سیستم ایمنی است بوسیله پروتئین حامل (Carrier) کونزوگه کرده تا از ورود آن به سلول‌های 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 پروتئین‌های حامل متفاوتی استفاده شده و کونزوگه‌های متنوعی از CSA تهیه گردیده است. در برخی مطالعات از کونزوگه سیکلوسپورین CSC که فاقد گروه‌های فعال است به همراه ایمنوگلوبولین جوجه استفاده کرده‌اند [۱۴]، 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 و Chicken-Ig به کمک کاربودی‌آمید صورت گرفته، زیرا در مرحله اول CSC تبدیل به CSC- ECDI شده و سپس به ایمنوگلوبولین جوجه متصل

1. High performance liquide chromatography

2. CSC-ethylidimethylaminopropyl Carbodiimide dihydrochloride

در دو قطره متوسط اتانول خالص حل کرده و هم زمان ۲/۵mg پودر BSA یا پودر KLH در ۵/۰ mg آب مقطر حل می‌شود. پس هر دو را ترکیب کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال (۴° C) بر روی همزن مغناطیسی قرار داده می‌شود. بعد از این مدت ۱ml از گلو تار آلدنید 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 کیسه دیالیز ریخته شده و به مدت ۱۸ ساعت شدیداً علیه P BS دیالیز می‌گردد.

بعد از آن محلول کونزوگه از کیسه دیالیز خارج شده و درلوله‌های eppendorf به مقدار مورد نیاز تقسیم شده و برای نگهداری طولانی مدت منجمد می‌گردد [۱۰].

۲- اندازه گیری غلظت کونزوگه به روش اسپکتروفتومتری : می‌دانیم که به هنگام ترکیب یک هاپتن و یک پروتئین حامل، غلظت نهایی کونزوگه برابر با غلظت پروتئین حامل به تنهایی می‌باشد و از غلظت هاپتن صرف نظر می‌گردد. در اینجا نیز ۲/۵mg از BSA یا KLH در ۵/۰ mg آب مقطر حل شده و غلظت نهایی ظاهراً همان ۱mg/ml خواهد بود ولی به علت دیالیز و خروج سیکلوسپورین کونزوگه نشده، گلو تار آلدنید 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 کونزوگه می باشد. به وسیله شاهد دستگاه تنظیم و در طول موج‌های ۲۸۰nm و ۲۶۰nm، میزان جذب (OD) محلول کونزوگه اندازه گیری شد و با استفاده از فرمول (عکس ضریب رفت $\times [260]$)

گردد [۱].

۳- ایمونیزاسیون حیوانات علیه CSA: بعد از تهیه کونزوگه و استریل کردن آن با فیلتر ۰/۴۵μm [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 [۹، ۷]. سپس تزریق کونزوگه سیکلوسپورین به خرگوش‌ها و بزها طی سه مرحله صورت گرفت که برای هر دسته از حیوانات متفاوت بود. در خرگوش‌ها و بزها جهت تزریق اول بترتیب ۰/۵ و ۱ میلی گرم کونزوگه سیکلوسپورین با مقدار مساوی ادجوانت فروند کامل مخلوط و به صورت زیر جلدی در دو موضع تزریق گردید. تزریق‌های یادآور در خرگوش‌ها 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 فاصله ۷-۱۴ روز خون گیری انجام شده و مراحل پیشرفت ایمونیزاسیون تعقیب می‌گردید. در تزریق‌های یادآور از ادجوانت فروند ناقص استفاده شد [۱۰، ۹، ۷، ۱].

۴- ارزیابی آنتی سرم تولید شده طی مراحل ایمونیزاسیون: در هر مرحله از خونگیری حیوانات، سرم آن‌ها جدا شده (۲۷ و ۶۶) و عیار آنتی بادی علیه سیکلوسپورین به روش الیزای غیر مستقیم تعیین گردید و در ابتدا غلظت‌های ۱-۱۰ mg/ml از کونزوگه سیکلوسپورین - کازئین در بافر کربنات (۰/۰۵M و ۹/۶ PH=) به مدت ۱۶-۱۲ ساعت در برودت ۴° C در حفرات پلیت الیزا کویت گردید. سپس جهت Blocking از محلول ۱-۲ درصد کازئین یا ۳-۵ درصد SM در

۱- پوشاندن جایگاه‌های اتصالی خالی بر روی پلیت الیزا

رقت های مختلف سیکلوسپورین که در الکل و PBS تهیه شده بود به حفرات اضافه گردید. پس از انکوباسیون و شستشو از آنتی سیکلوسپورین کونزوگه با پراکسیداز (قسمت ۶) با رقت ۱:۴۰۰ اضافه شده و پس از انکوباسیون مجدد و شستشو با استفاده از سوپسترای OPD و توقف واکنش با اسید سولفوریک ۱۲/۵ درصد، میزان جذب نوری هر حفره در طول موج ۴۹۰nm 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) می باشد ولی ابتدا بایستی خون بیماران گیرنده 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 ماده PVP به عنوان یک حامل هیدروفوب در محیط آبی استفاده کرد زیرا PVP^۱ یک پلی آمید بدون بار است و به مقدار زیادی در آب حل می گردد و به عنوان یک کاریر خنثی برای انتقال مولکول های هیدروفوب در محلولهای آلی مورد بهره برداری قرار می گیرد. به همین جهت در ابتدا غلظت ۳۵mg/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].

یافته های پژوهش

۱- کونزوگه های CSA+BSA و CSA+KLH بعد از تهیه و انجام دیالیز تعیین غلظت گردیدند. نتایج جذب نوری

PBS استفاده شد. سرم حیوانات در رقت های متوالی تهیه و به حفرات اضافه گردیده و جهت شاهد از PBS خالی استفاده گردید. در مرحله بعد آنتی بادی کونزوگه علیه ایمنوگلوبولین خرگوش با رقت ۱:۵۰۰ و در مورد بز با رقت ۱:۲۰۰۰ اضافه شده و در نهایت از سوپسترای آنزیم پراکسیداز [H2O2 + OPD] بافر ستیرات با PH = ۵ استفاده کرده و جهت توقف واکنش از اسیدسولفوریک ۱۲/۵ درصد استفاده شد. پلیت ها در طول موج ۴۹۰nm توسط قرائت کننده الیزا خوانده شده میزان جذب نور با میزان آنتی بادی اختصاصی علیه سیکلوسپورین در آنتی سرم نسبت مستقیم داشت [۱۱،۱۰،۶] در تمام مراحل فوق زمان انکوباسیون یک ساعت در حرارت ۳۷^۰ 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 کاپریک اسید استفاده شد [۱۳،۳]. [۱۶]

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

۷- تعیین عیار آنتی بادی نشاندار شده با پراکسیداز به روش الیزای مستقیم: نحوه انجام این عمل همانند الیزای غیر مستقیم (قسمت ۴) است. با این تفاوت که در این روش آنتی بادی اول وجود نداشته و آنتی بادی کونزوگه با پراکسیداز، مستقیماً با کونزوگه (CSA+Cas) متصل شده به حفرات پلیت الیزا واکنش می دهند [۶].

۸- الیزای غیر مستقیم برای تعیین غلظت های مختلف سیکلوسپورین: برای این منظور فراکسیون گامای خالص (Anti- CSA- IgG) به میزان ۵۰ µg/ml در بافر کربنات به مدت ۱۶-۱۲ ساعت در ۴^۰ C به حفرات پلیت الیزا متصل شده و پس از Blocking با SM در PBS،

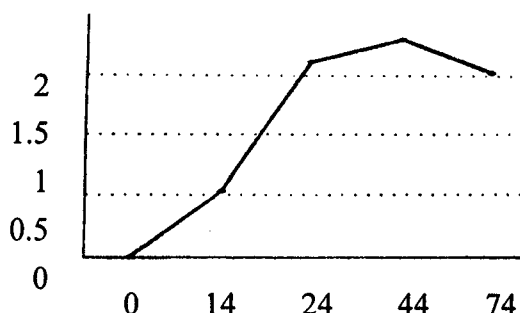
CSA- Ab - بالا رفته و آزمایش الیزای غیر مستقیم برای تعیین عیار این آنتی بادی برای خرگوش در روزهای ۰، ۷۴، ۴۴، ۲۴، ۱۴، ۰ بر روی سرم حیوانات به عمل آمد (جدول ۲).

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 کونزوگه‌های سیکلوسپورین در روزهای متوالی عیار Anti

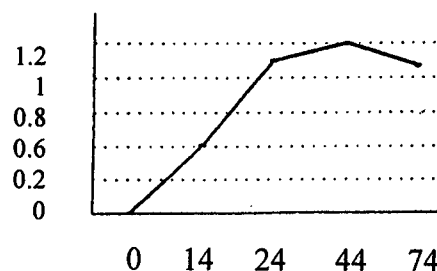
جدول ۱. میزان جذب نوری و غلظت کونزوگه‌های سیکلوسپورین

	OD _{۲۸۰nm}	OD _{۲۶۰nm}	mg/ml
CSA+BSA	۰/۱۹	۰/۰۷۹	۲/۳۳
CSA+ KLH	۰/۱۷	۰/۰۴۳	۲/۲۹

CSA+BSA(Rabbit)



CSA+KLH(Rabbit)

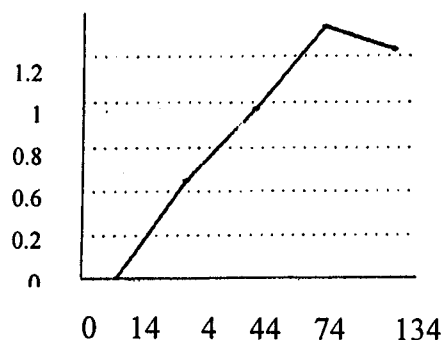


نمودار شماره ۱. تعیین عیار آنتی سرم در خرگوش ایمونیزه شده با CSA+BSA و CSA+KLH

CSA+BSA(Goat)



CSA+KLH(Goat)



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

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 ۱: ۱۲۸۰۰ میزان جذب نوری بیش از ارا نشان می‌دهد در حالی که در مورد بز رقت ۱: ۸۰۰۰ آنتی سرم میزان جذب نور بالاتر از ۱.۵ 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 کونزوگه با پراکسیداز در قسمت ۸ (مواد و روش 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).

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 ۴۴ در خرگوش و روز ۷۴ در بز) نیز افزایش مختصری نشان می‌دهد ولی این میزان آنتی بادی ده روز بعد از تزریق چهارم (روز ۷۴ در خرگوش و روز ۱۳۴ 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 با 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 کونزوگه CSA+BSA نسبت به کونزوگه CSA+KLH ایمونوژن قوی‌تری بوده و در هر دو گروه حیوانات باعث تولید آنتی بادی

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

غلظت	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	میانگین
۷۸ ng/ml	۰/۱۸۵	۰/۱۱۴	-	۰/۱۰۷	۰/۱۰۰	۰/۱۰۷	۰/۱۵۵	۰/۱۳۱	۰/۱۲۸
۱۵۶ ng/ml	۰/۲۴۸	۰/۱۷۰	۰/۱۸۹	۰/۲۴۲	۰/۲۲۲	۰/۱۶۰	۰/۱۸۹	۰/۲۱۹	۰/۲۰۴
۳۱۲ ng/ml	۰/۳۹۳	۰/۳۱۱	۰/۳۰۳	۰/۳۷۲	۰/۳۶۷	۰/۳۵۱	۰/۳۶۱	۰/۳۵۳	۰/۳۵۱
۶۲۵ ng/ml	۰/۶۰۹	۰/۴۶۸	۰/۴۲۳	۰/۵۳۸	۰/۵۳۳	۰/۵۰۴	۰/۶۶۶	۰/۶۸۱	۰/۵۵۲
۱۲۵۰ ng/ml	۰/۹۱۵	۰/۷۵۴	۰/۷۱۷	۰/۸۶۳	۰/۸۵۲	۰/۷۴۱	۰/۸۴۳	۰/۷۹۰	۰/۸۰۹
۲۵۰۰ ng/ml	۱/۲۷۹	۱/۰۹۳	۰/۰۲۴	۱/۲۰۷	۱/۱۲۵	۱/۰۱۲	۱/۰۶۴	۱/۱۵۰	۱/۱۱۹
۵۰۰۰ ng/ml	۱/۴۱۷	۱/۳۸۵	۰/۳۴۴	۱/۴۴۲	۱/۳۸۶	-	-	۱/۴۵۷	۱/۴۰۵

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 ۱: ۱۲۸۰۰ میزان جذب نوری بیش از ارا نشان می‌دهد در حالی که در مورد بز رقت ۱: ۸۰۰۰ آنتی سرم میزان جذب نور بالاتر از ۱.۵ 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 کونزوگه با پراکسیداز در قسمت ۸ (مواد و روش 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).

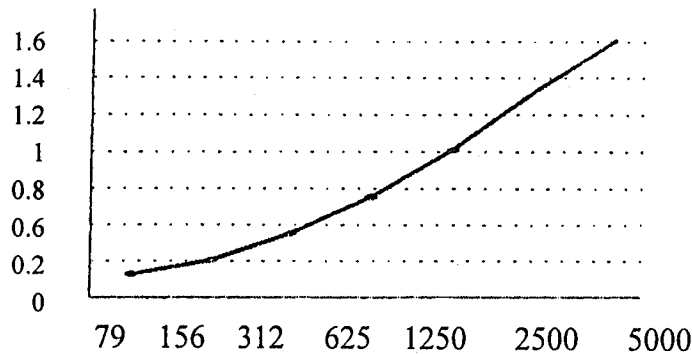
با استفاده از جدول ۲ و نمودارها مشخص می‌گردد که قبل از تزریق، میزان آنتی بادی اختصاصی در روز صفر برابر صفر بوده و این میزان آنتی بادی ده روز بعد از تزریق سوم (روز ۴۴ در خرگوش و روز ۷۴ در بز) نیز افزایش مختصری نشان می‌دهد ولی این میزان آنتی بادی ده روز بعد از تزریق چهارم (روز ۷۴ در خرگوش و روز ۱۳۴ در 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 با 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 کونزوگه CSA+BSA نسبت به کونزوگه CSA+KLH ایمونوژن قوی‌تری بوده و در هر دو گروه حیوانات باعث تولید آنتی بادی

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

غلظت	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	میانگین
۷۸ ng/ml	۰/۱۸۵	۰/۱۱۴	-	۰/۱۰۷	۰/۱۰۰	۰/۱۰۷	۰/۱۵۵	۰/۱۳۱	۰/۱۲۸
۱۵۶ ng/ml	۰/۲۴۸	۰/۱۷۰	۰/۱۸۹	۰/۲۴۲	۰/۲۲۲	۰/۱۶۰	۰/۱۸۹	۰/۲۱۹	۰/۲۰۴
۳۱۲ ng/ml	۰/۳۹۳	۰/۳۱۱	۰/۳۰۳	۰/۳۷۲	۰/۳۶۷	۰/۳۵۱	۰/۳۶۱	۰/۳۵۳	۰/۳۵۱
۶۲۵ ng/ml	۰/۶۰۹	۰/۴۶۸	۰/۴۲۳	۰/۵۳۸	۰/۵۳۳	۰/۵۰۴	۰/۶۶۶	۰/۶۸۱	۰/۵۵۲
۱۲۵۰ ng/ml	۰/۹۱۵	۰/۷۵۴	۰/۷۱۷	۰/۸۶۳	۰/۸۵۲	۰/۷۴۱	۰/۸۴۳	۰/۷۹۰	۰/۸۰۹
۲۵۰۰ ng/ml	۱/۲۷۹	۱/۰۹۳	۰/۰۲۴	۱/۲۰۷	۱/۱۲۵	۱/۰۱۲	۱/۰۶۴	۱/۱۵۰	۱/۱۱۹
۵۰۰۰ ng/ml	۱/۴۱۷	۱/۳۸۵	۰/۳۴۴	۱/۴۴۲	۱/۳۸۶	-	-	۱/۴۵۷	۱/۴۰۵

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

ST.CURVE(CSA) Indirect ELISA



نمودار شماره ۳. منحنی استاندارد غلظت های مختلف سیکلوسپورین و جذب نوری آنها در الیزای غیر مستقیم

بیش از ۱.۰ را تولید می کند. بنابراین از این آزمایش الیزای غیر مستقیم که برای غلظت های استاندارد سیکلوسپورین استفاده می شود نمی توان 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

در تحقیقات انجام شده برای اندازه گیری غلظت سیکلوسپورین توسط FPLA.ELISA.RIA.HPLC و حتی روش های جدیدی چون EMLA.CLIA.ACMIA آنتی بادی های پلی کلونال و مونوکلونال مختلفی تولید شده و هریک دارای حساسیت های متفاوتی می باشند

[۱۹، ۱۶، ۱۵، ۱۴، ۵، ۴]. حیوانات مختلفی نیز چون موش، خوکچه هندی، خرگوش، بز و اسب توسط کونزوگه های مختلفی از سیکلوسپورین با پروتئین

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

۴- در آزمایش الیزای غیر مستقیم برای تعیین غلظت سیکلوسپورین در خون تام بیماران پیوندی دریافت کننده سیکلوسپورین، اتانول سبب ایجاد تغییراتی در حفرات پلیت الیزا می گردید و جهت ممانعت از این اثر اقدام به تهیه رقت های مختلفی با PVP/PBS شد. در این حال احتمالاً به علت کاهش غلظت سیکلوسپورین پائین تر از ۱۰۰ ng/ml جواب مناسبی به دست نیامده و استفاده از PVP نیز برای تحویل گرفتن CSA از متانول، به دلیل وجود واکنش متقاطع با آنتی سیکلوسپورین کونزوگه 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 ۱:۱۶۰۰۰ نیز میزان جذب نوری

تشخیص غلظت های مختلف سیکلوسپورین را تا حد ۱۰۰ ng/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 می تواند راه را برای طراحی سیستم های آزمایشی مختلفی چون ایمونوهیستوشیمی، ایمونوسیتوشیمی و ایمونوفلورسنس 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 دانشکده پزشکی شیراز و همکاری صمیمانه سرکار خانم دکتر فرجادیان و خانم دکتر درودچی و هم چنین از بخش پیوند اعضای بیمارستان نمازی شیراز و جناب آقای دکتر نصر... قهرمانی کمال تشکر و سپاسگزاری ابراز می گردد.

های حامل، ایمونیزه شده و عیارهای مختلفی از آنتی سیکلوسپورین ایجاد شده است [۱۹،۱۵،۱۴،۸،۵،۲]. در تحقیقاتی نیز که توسط Quesniaux انجام شده از CSA و CSC بانصمام BSA استفاده شده و عیارهای بالایی نیز (Anti-CSA- Ab) تولید گردیده است [۱۹،۱۶،۱۴].

در این تحقیق نیز با استفاده از دو نوع کونزوگه و دو نوع حیوان اقدام به تولید آنتی بادی علیه سیکلوسپورین شده و همان طور که از نتایج پیداست، حیوانات به خوبی توسط کونزوگه های 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 ۱:۱۲۰۰۰ و عیار آنتی سیکلوسپورین بز تا رقت ۸۰۰۰ به نحو مطلوبی ارزیابی گردیده و اختصاصیت آن بر علیه CSA تأیید شد. هم چنین پس از تخلیص فراکسیون گاما از آنتی سیکلوسپورین به دست آمده به وسیله آنزیم پراکسیداز به خوبی کونزوگه 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 کونزوگه شده با پراکسیداز در یک سیستم الیزای غیر مستقیم توانایی

- 11- Kemeny d.m ; Titration of antibodies ; *Journal of Immunological Methods* , 1992 , 150: 157-76.
- 12- Kivisto k.t ; A review of assay methods for cyclosporine clinical pharmacokinetic; 1992 , 23: 173-190.
- 13- Mckinney m. m. . A simple. non chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid ; *Journal of Immunological Methods* 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 ; *Potential of Monoclonal antibodies to improve therapeutic monitoring of cyclosporine*, *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. & rubinstein m ; A method for preparing biologically active 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 isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid ; Archives in Biochemistry Biophysics* , 1969 , 134: 279-284.
- 19- Zenke g. , zeder g. , strittmatter w. v. et al ; *Anti-cyclosporine monoclonal antibodies and their anti-idiotypic counterpart, structure and biological activity ; Molecular Immunology* , 1992 , 29: 343- 351.
- 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; *Sacrific³H Radio immunoassay with a monoclonal antibody for monitoring 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 , clevelandowl , & erlanger bf; *Antibodies to cyclosporine 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 pathology pharmacology* , 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 Harbor press.*
- 8- Holt d.w , johnston A , marsden J.T , et al ; *Monoclonal antibodies for radioimmunoassay of cyclosporine: a multicenter comparison of their performance with the sandoz polyclonal radioimmunoassay kit ; Clinical chemistry*, 1988, 34: 1091 – 1096.
- 9- Hudson l. & hay f. c ; *Practical Immunology. Blackwell scientific publications ; 1989.*
- 10- Johnstone A. & Thorpe R. ; *Immuno chemistry in practice ; Blackwell scientific publications , 1987.*

Antibody production against Cyclosporine

Hussein Zade M. (MSc)

Abstract: Cyclosporine A (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) gene expression and IL -2R IFN - γ and GM - CSF . The monitoring of CSA is a useful approach to reduce the risk of graft 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 injected to rabbits and goats subcutaneously in order to obtain CSA specific anti - sera . increase in antibody titer was achieved after two times 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 peroxidase . These antibodies were able to detect standard levels of CSA (minimum amount =100 ng/ml) in an indirect Elisa assay . The findings suggest these antisera to be used in the detection of CSA in RBC , whole blood and patients sera by multitechnical methods .e.g: Immunohistochemistry , immunocytochemistry and Immunofluorescence in future.

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