مجله علمي دانشگاه علوم پزشكي ايلام، دوره سيزدهم، شماره دوم، تابستان ۸۴

توليد و استفاده از آنتي بادي پلي‌كلونال عليه سيكلوسپورين A در روش ايمونوپراكسيداز مستقيم براي تشخيص دارو در گلبولهاي قرمز

مرتضي حسين زاده [۱] ، دكتر عباس قادري [۲] ، دكتر محمد واسعي [۳]

تاريخ دريافت: ۸۴/۹/۱۵ تاريخ پذيرش: ۸۴/۱۰/۲۵

چكيده

مقدمه: سيكلوسپورين به وسيله جلوگيري از بيان ژنهاي IL- 2 ، IFN- γ و GM-CSF، از عوامل سركوب كننده سيستم ايمني بوده و در بيماران پيوندي ، اتوايمون و همچنين جلوگيري از بروز GVHD در پيوند مغز استخوان از آن استفاده ميشود . در اين تحقيق تشخيص اين دارو در خون و گلبولهاي قرمز با استفاده از روش ايمونوپراكسيداز مستقيم مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در اين تحقيق آزمايشگاهي آنتي بادي پلي‌كلونال عليه سيكلوسپورين در خرگوش به وسيله اتصال گلوتارآلدئيدي با آلبومين گاوي توليد و به وسيله آنزيم پراكسيداز كونژوگه گرديد . اسلايدهاي خوني از بيماران دريافت كننده سيكلوسپورين و گروه شاهد تهيه و به وسيله محلول الكل _ استون عمل فيكساسيون انجام شد. مراحل آماده سازي لام ها با استفاده از آنتي سيكلوسپورين آنتي بادي كونژوگه ،همراه با افزودن سوبستراي DAB و ايجاد رسوب قهوه اي رنگي در زير غشاءRBC ،براي تشخيص حضور سيكلوسپورين در گلبولهاي قرمز انجام گرديد.

يافته‌هاي پژوهش: اختصاصي بودن آنتي بادي تهيه شده توسط روش الايزاى غير مستقيم تأييد و غلظت و شدت رنگ رسوب در حاشيه گلبولهاي قرمز با دوز مصرفي دارو در اين بيماران متناسب بود .

نتيجه‌گيري نهايي: استفاده از اين گونه آنتي باديها در جهت طراحي تكنيك‌هاي مختلف براي تشخيص حضور و تعيين مقدار و غلظت داروهاي متفاوت در خون ، بافت و مايعات بيولوژيک توصيه مي‌گردد.

واژه هاي كليدي : سيكلوسپورين ، پيوند كليه ، ايمونوهيستوشيمي

۱. عضو هيات علمي دانشگاه علوم پزشكي ايلام- نويسنده مسوول Email:morhos110 @yahoo.com
۲. استاد گروه ايمونولوژي دانشگاه علوم پزشكي شيراز
۳. دانشيار گروه پاتولوژي دانشگاه علوم پزشكي شيراز

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

مقدمه

سيكلوسپورين يكي از عوامل مهم سركوب كننده سيستم ايمني بوده و در سطح وسيعي در بيماران دريافت كننده پيوند اعضا ، بيماران خود ايمن و جهت جلوگيري از بروز GVHD[1] بدنبال پيوند مغز استخوان مورد استفاده قرار مي‌گيرد. به همراه اين دارو از عوامل ديگري چون كورتيكواستروئيدها، FK_{506}، ميكوفنولات موفتيل، پارامايسين، تاليدوميد و ... استفاده مي‌شود(۱).

حضور سيكلوسپورين در بدن بيماران دريافت كننده اين دارو و تعيين غلظت و مقدار آن بسيار مهم است زيرا افزايش غلظت آن عوارض مختلف و حادي چون نفروتوكسي سيتي و هپاتوتوكسي سيتي را بوجود آورده و كاهش غلظت آن نيز سبب سركوب نامناسب سيستم ايمني و رد پيوند مي گردد (۲،۱). به علت اختلافات فارماكوديناميكي و فارماكوكينيتيكي سيكلوسپورين در بدن افراد مختلف ، تعيين مقدار و دوز مصرفي همراه با تعيين غلظت آن از مسائل مهم درمان رد پيوند در بيماران خود ايمن مي باشد (۴،۳) . داروي جذب شده در خون به اجزا و عناصر سلولي و پلاسمايي مانند گلبولهاي قرمز ، سفيد و ليپوپروتئينهاي پلاسما متصل و از طريق عروق به تمام بافتهاي بدن مي رسد . توزيع دارو در اندامهايي چون كبد ، پانكراس و بافتهاي ليپيدي به مقدار زياد و در اندامهايي چون قلب ، شش ، مغز ، كليه ، ماهيچه و نخاع به مقدار ناچيزي صورت مي گيرد (۶،۵،۳) . از داروي وارد شده به خون حدود۵۰ تا ۶۰ درصد به گلبولهاي قرمز، ۱۰ تا ۲۰ درصد به لكوسيتها و ۳۰ تا ۴۰ درصد به ليپوپروتئينهاي پلاسما متصل مي گردد . اتصال سيكلوسپورين به گلبولهاي قرمز اشباع پذير بوده و به حرارت و هماتوكريت بستگي دارد و با كاهش دما يا افزايش هماتوكريت ، افزايش مي يابد (۵،۴).

براي تشخيص و تعيين سيكلوسپورين از روشهاي اختصاصي (سيكلوسپورين خالص) و غير اختصاصي (سيكلوسپورين همراه با متابوليتهاي مختلف) استفاده مي‌شود . بطور مثال HPLC[2] روش مرجع در اندازه گيري اختصاصي بوده و روشهاي ديگر چون RIA[3] ، ELISA[4]، FPIA[5]، ACMIA[6] ، CLIA[7]، EMIT[8] و ... به صورت اختصاصي و غير اختصاصي مورد استفاده قرار مي‌گيرند(۱۱،۱۰،۹،۸،۷) . در تمامي اين روشها با استفاده از توليد آنتي باديهاي پلي كلونال يا مونوكلونال بر عليه سيكلوسپورين خالص يا سيكلوسپورين به انضمام متابوليتهاي آن ميتوان مقدار دارو را در خون يا مايعات بيولوژيك تعيين نمود (۱۱،۸،۷،۴). در اكثر تحقيقات انجام شده از آنتي سرم هاي خرگوشي يا گوسفندي ناشي از ايمونيزاسيون به وسيله كونژوگه هايي مانند آلبومين گاوي يا هموسيانين (KLH) استفاده می شود.در مواردی نيز از آنتي سرم موشي ناشي از ايمونيزاسيون با سيكلوسپورين C به اضافه اوا آلبومين و يا از آنتي بادي مونوكلونال نيز استفاده شده است . اين آنتي باديهاي IgM موشي از ايمونيزاسيون، با

1. Graft Versus Host Disease
2. High performance Liquide chromatography
3.Radio Immuno Assay
4.Enzyme Linked Immunosorbent Assay
5. Fluorescence polarization Immuno`Assay
6. Affinity Columne Mediated Immunoenzymometeric Assay.
7. Chemi Luminescent Immuno Assay
8. Enzyme Multiplied Immunoassay Technique

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

سيكلوسپورينC آزاد توليد شده اند (۱۱). در اين بررسي آنتي بادي پلي كلونال عليه سيكلوسپورين در خرگوش توليد و از آن براي تشخيص حضور سيكلوسپورين در گلبولهاي قرمز استفاده گرديد.

مواد و روش‌ها

الف) توليد آنتي بادي پلي كلونال عليه سيكلوسپورين A در خرگوش : در ابتدا سيكلوسپورين A همراه با آلبومين گاوي[1] كونژوگه شد و با عمل ديالیز تغليظ و جهت ايمونيزاسيون خرگوش بكار رفت . به همين خاطر ۱/۵mg پودر CSA(Sandoz) را در دو قطره اتانول خالص حل كرده و هم زمان۲/۵mg پودر BSA در ۲/۵ ml آب مقطر حل گرديد . سپس هر دو تركيب به مدت ۲۰ دقيقه در دماي C ° ۴ بر روي همزن مغناطيسي قرار داده شده و ۱ml گلوتارآلدئيد ۲۱ ميلي مولار در بافر فسفات ۰/۱ مولار به آن اضافه گرديد . سپس به مدت ۳ ساعت در دماي آزمايشگاه بر روي همزن قرار داده و در كيسه ديالیز ريخته و به مدت ۲۴ ساعت شديداً عليه PBS ديالیز شد. سپس اين محلول كونژوگه در لوله هاي اپن دورف تقسيم شد و براي نگهداري طولاني مدت منجمد گرديد (۱۲) . جهت تعيين غلظت نهايي كونژوگه به روش اسپكتروفتومتري و بوسيله شاهد PBS ميزان جذب (OD) محلول كونژوگه در طول موجهاي ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گيري شد و بوسيله فرمول زير غلظت نهائي تعيين گرديد (۱۲):

(mg/ ml)= (1/55× OD280)-(0/77×OD260)غلظت

سپس كونژوگه توسط فيلتر µm ۰/۲۵ (۱۲) استريل و براي ايجاد پاسخ ايمني بهتر همراه با ادجوانت فروند كامل (CFA) براي تزريق آماده شد . بدين ترتيب كه براي تزريق اول ۰/۵ ميلي گرم كونژوگه سيكلوسپورين با مقدار مساوي CFA^2 مخلوط و به صورت زير جلدي در دو موضع تزريق گرديد . تزريق هاي يادآور در خرگوش ها نيز ، به ترتيب در روزهاي ۱۴،۳۴و۶۴ بعد از تزريق اول همراه با ادجوانت فروند ناقص انجام و بعد از هر تزريق در فاصله ۱۴-۷ روز خون‌گيري از حيوانات انجام و مراحل پيشرفت ايمونيزاسيون تعقيب گرديد (۱۴،۱۳،۱۲) . سپس سرم حيوانات جدا شد و عيار آنتي بادي عليه سيكلوسپورين به روش الايزاي غير مستقيم تعيين گرديد (۱۵). بعد از حصول اطمينان از كافي بودن عيار آنتي سيكلوسپورين، آنتي بادي توليد شده در سرم خرگوشي ، جدا سازي و IgG اختصاصي با روش كاپرليک اسيد انجام گرفت (۱۶). سپس IgG بدست آمده توسط پراكسيداز با روش پرآيدات سديم نشاندار شد (۱۷،۱۴) ، با اين عمل آنتي سيكلوسپورين كونژوگه با پراكسيداز تهيه و براي انجام تست ايمونوپراكسيداز آماده گرديد.

ب) ايمونوپراكسيداز مستقيم براي تشخيص سيكلوسپورين در گلبولهاي قرمز :

براي اين منظور در ابتدا از بيمارانيكه داروي سيكلوسپورين مصرف مي‌كردند خون گيري انجام شد و بلافاصله گسترش خوني بر روي لام تهيه گرديد . بهترين زمان خونگيري براي اين منظور ۲ ساعت پس از خوردن دارو ميباشد كه سطح دارو در خون بيماران به بالاترين زمان رسيده و حدود ۶۰-۵۰ درصد سيكلوسپورين موجود در خون به

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

گلبولهاي قرمز متصل شده است . بنابراين با خونگيري از بيماران و تهيه اسلايد خوني مراحل آزمايش ايمونوپراكسيداز به ترتيب زير انجام گرفت (جهت كنترل منفي از افراد سالم كه دارو مصرف نكرده بودند استفاده شد):

۱)فيكساسيون اسلايد هاي خوني : اين عمل با قرار دادن اسلايد خوني در محلول الكل– استون (۱ :۱) و به مدت ۱۰ دقيقه انجام گرفت .

۲) شستشو : قرار دادن اسلايدها در PBS به مدت ۳ دقيقه (سه بار)

۳)خنثي كردن پراكسيداز دروني گلبولهاي قرمز : قرار دادن اسلايدها در محلول ۳ درصد H_2O_2 و در متانول به مدت يک ساعت

۴)شستشو: مانند مرحله دوم

۵)جلوگيري از اتصالات غير اختصاصي : با افزودن سرم نرمال افراد كنترل منفي با رقت $\frac{1}{5}$ بر روي اسلايدها و قرار دادن اسلايد ها به مدت ۱۰ دقيقه در اتاقک مرطوب

۶) شستشو : مانند مرحله دوم

۷)افزودن آنتي سيكلوسپورين آنتي بادي نشاندار : رقتهاي متوالي از آنتي سيكلوسپورين خرگوشي نشاندار تهيه و بر روي اسلايدها ريخته و به مدت يک ساعت در دماي اتاق و در محفظه مرطوب قرار گرفت .

۸) شستشو : مانند مرحله دوم

۹) افزودن سوبسترا : سوبسترا (۵ ميلي گرم DAB به اضافه ده ميلي ليتر PBS و ده ميكرو ليتر H_2O_2) را بر روي اسلايد ها اضافه كرده و به مدت ده دقيقه در حرارت اتاق قرار داده شد و توسط آب مقطر، واكنش متوقف شد و اسلايد ها شستشو داده شدند .

۱۰) رنگ آميزي زمينه[1]: اسلايدها پس از شستشو با آب مقطر ، خشک شده و سپس به مدت ۴۰ ثانيه در محلول رنگ تازه هماتوكسيلين قرار داده و توسط آب مقطر شستشو داده شدند.

۱۱) آبگيري اسلايدها : اسلايد ها به مدت ۳-۲ دقيقه در الكل هفتاد درصد و سپس به مدت ۳-۲ دقيقه در الكل مطلق قرار داده شدند .

۱۲)شفاف كردن و پايدار نمودن[2] : اسلايدها سه بار در زيلن (Xylene) شستشو و سپس توسط انتلان پوشانيده گرديدند .

نتيجه نهايي در زير ميكروسكوپ نوري مشاهده شد و آخرين رقتی از آنتي سيكلوسپورين كونژوگه با پراكسيداز كه رنگ مطلوبي را ايجاد كرده بود ، به عنوان عيار آنتي سيكلوسپورين نشاندار در آزمايش ايمونوپراكسيداز تلقي گرديد . اين عيار در آنتي سيكلوسپورين خرگوشي نشاندار برابر $\frac{1}{20}$ تعيين گرديد (۱۸،۱۹،۲۰).

يافته هاي پژوهش

در اولين مرحله كه كونژوگه CSA + BSA تهيه گرديد براي تعيين غلظت به روش اسپكتروفتومتري جذب نوري محلول كونژوگه در طول موجهاي ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول مذكور غلظت نهايي برابر ۲/۳۳ mg/ml تعيين گرديد (جدول ۱).

سپس با تزريق اين كونژوگه به خرگوش و تزريق يادآور در روزهاي مذكور به تدريج عيار آنتي بادي عليه سيكلوسپورين A افزايش پيدا كرد كه ميزان عيار آنتي بادي در روزهاي مذكور و ميزان جذب نوري در آزمايش اليزاي غير مستقيم در جدول ۲ آمده است .

1. Counter staining
2.Mounting

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

جدول ۱ : ميزان جذب نوري و غلظت كونژوگه سيكلوسپورين و آلبومين سرم گاوي

	mg/ml	OD ۲۶۰ nm	OD ۲۸۰ nm
CSA + BSA	۲/۳۳	۰/۰۷۹	۰/۱۲

جدول۲ : نتايج حاصل از آزمايش الايزاي غير مستقيم براي تعيين عيار آنتي سيكلوسپورين در خرگوش

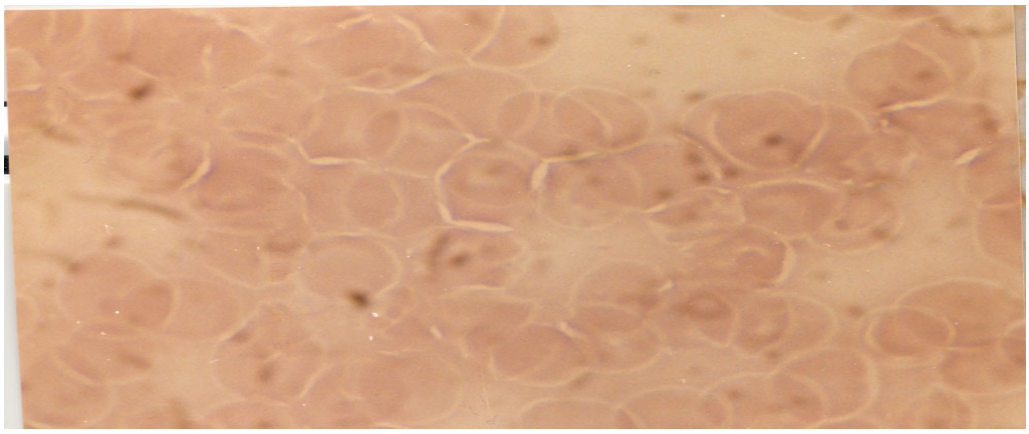
	(CSA + BSA)				
روز	۰	۱۴	۲۴	۴۴	۷۴
جذب نوری (OD)	۰	۰/۵۳	۱/۶۲	۱/۸۱	۱/۵۳

با توجه به جدول ۲ ،قبل از تزريق، ميزان آنتي بادي اختصاصي در روز صفر برابر صفر بود كه در روز ۱۴ (قبل از تزريق دوم) افزايش مختصري را نشان داد. ميزان آنتي بادي ده روز بعد از تزريق دوم در روز ۲۴ نسبت به نوبت قبل افزايش قابل ملاحظه اي داشته و همچنين ميزان آنتي بادي، ده روز بعد از تزريق سوم يعني در روز ۴۴ نيز افزايش يافته بود. ولي اين ميزان آنتي بادي ده روز بعد از تزريق چهارم يعني روز ۷۴ كاهش پيدا كرد. بيشترين ميزان آنتي بادي ده روز بعد از تزريق سوم(يادآور دوم) وجود داشته كه پس از اطمينان از عيار بالاي آن در آزمايش الايزاي غير مستقيم ، خونگيري نهايي انجام گرديد و سرم حيوانات جدا شد .

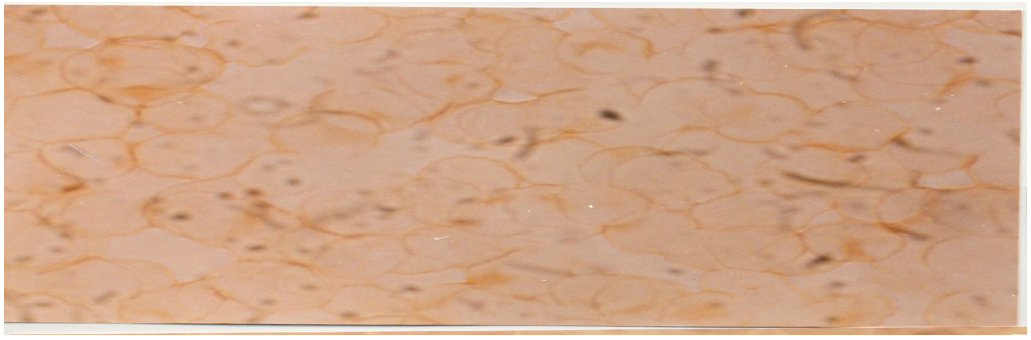
در مرحله بعد، فراكسيون IgG از آنتي سرم خرگوشي تهيه و به روش كاپرليک اسيد جدا شد و در بافر PBS ديالیز گرديد . غلظت آن به روش اسپكتروفتومتري برابر ۱۲ mg/ml در حجمي معادل ۱۰ ml تعيين شد . حال از اين فراكسيون IgG جهت توليد آنتي سيكلوسپورين نشاندار با پراكسيداز استفاده شد . اين عمل به كمک پرآيدات سديم و بورو هيدرات سديم انجام گرفت و جهت تعيين عيار و غلظت آنتي بادي نشاندار به كمک روش الايزاي مستقيم عيار آنتي بادي برابر $\frac{1}{800}$ با OD =۱/۲۷ و غلظت آن برابر ۱/۵۵ mg/ml تعيين شد. اين غلظت براي تمام كونژوگه هاي آنزيمي يكسان بود .

حال در دومين مرحله كه آزمايش ايمونوپراكسيداز مستقيم براي تشخيص سيكلوسپورين در گلبولهاي قرمز انجام گرفت مشاهده گرديد كه آنتي بادي كونژوگه توليد شده عليه سيكلوسپورين توانايي تشخيص سيكلوسپورين موجود در گلبولهاي قرمز را داشته و پس از اتصال به سيكلوسپورين و افزودن سوبستراي DAB رسوب قهوه اي رنگي در محل اتصال Ag–Ab در زير غشاء RBC تشكيل گرديد . از بيماراني كه دوزهاي مختلف از سيكلوسپورين را مصرف كرده بودند در زمان Peak يعني ۲ ساعت پس از مصرف ، نمونه گيري انجام و پس از تهيه اسلايد و آزمايش ايمونوپراكسيداز مستقيم واكنش آنتي ژن – آنتي بادي انجام شد و رسوب قهوه اي رنگي مشاهده گرديد . جالب توجه اينكه غلظت و شدت رنگ رسوب در حاشيه غشا RBC متناسب با دوز مصرفي دارو بود و در دوزهاي بالاتر رسوبهاي تيره تر و ضخيم تري تشكيل گرديد.

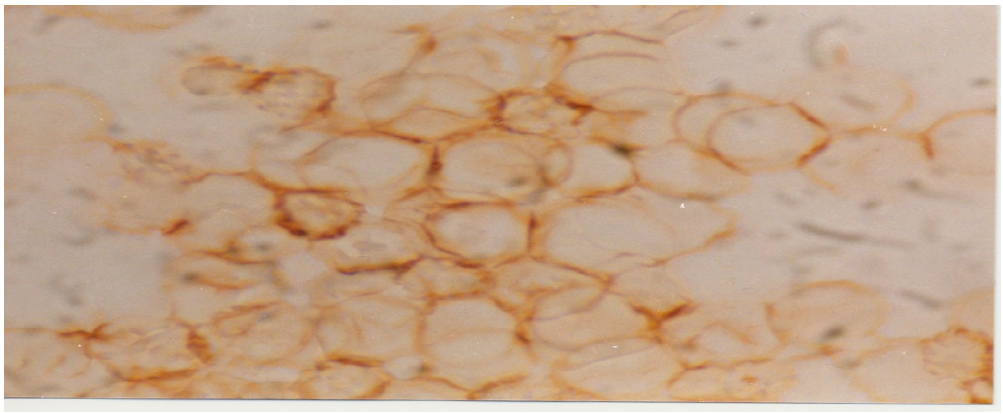
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]



تصوير شماره ۱ : كنترل منفي

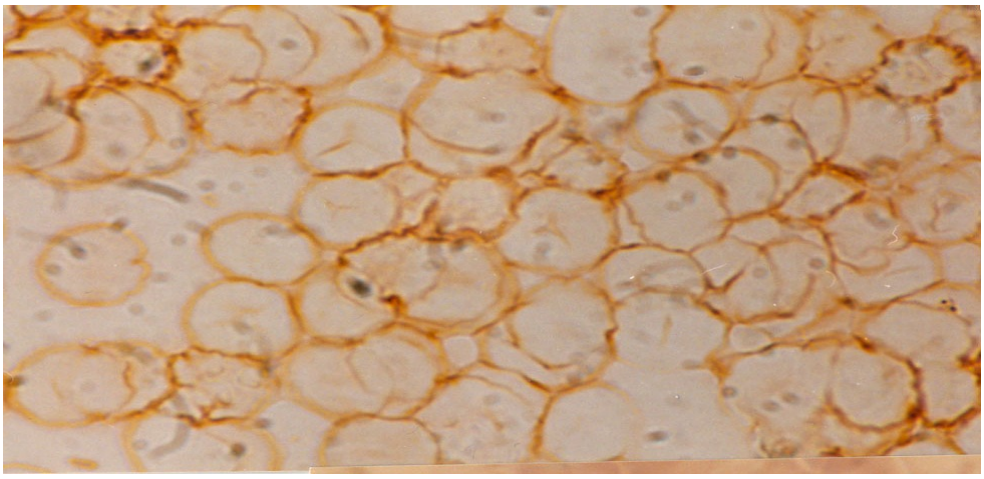


تصوير شماره ۲ : خون حاوي سيكلوسپورين با دوز مصرفي ۵ mg/kg



تصوير شماره ۳ : خون حاوي سيكلوسپورين با دوز مصرفي ۷ mg/kg

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]



تصوير شماره ۴ : خون حاوي سيكلوسپورين با دوز مصرفي ۱۰ mg/kg

بحث و نتيجه گيري

در پژوهشهايي كه تاكنون براي تشخيص و اندازه گيري غلظت سيكلوسپورين درخون ومايعات بيولوژيک بدن انجام شده است از روشهاي متفاوتي چون EMIT , CLIA , ACMIA , FPIA , ELISA , RIA , HPLC و ... استفاده شده است و آنتي باديهاي مختلف پلي كلونال و مونوكلونال با حساسيت‌هاي متفاوت توليد گرديده اند (۷،۸،۹،۱۰،۱۱،۲۱،۲۲) . همچنين در تكنيک توليد آنتي باديهاي پلي كلونال از حيوانات مختلفي چون خرگوش ، بز ، موش ، خوكچه هندي ، اسب و ... به وسيله كونژوگه هاي مختلفي از سيكلوسپورين با پروتئين هاي حامل از قبيل KLH , BSA، اوا آلبومين و ... استفاده شده و منجر به توليد عيارهاي مختلفي از سيكلوسپورين آنتي بادي گرديده است (۷،۱۳،۲۱،۲۲،۲۳) .

در تحقيقات متعددي نيز كه توسط كسنيو[1] انجام شد از سيكلوسپورين A يا C به انضمام سرم آلبومين گاوي استفاده شد و عيارهاي بالايي نيز از آنتي سيكلوسپورين آنتي بادي توليد شد(۲۲).در اين تحقيق از كونژوگه CSA+BSA براي ايمونيزاسيون خرگوش بر عليه سيكلوسپورين استفاده شد و در تأييد تحقيقات گذشته عيار آنتي بادي تا رقت ۱۲۰۰۰ : ۱ با جذب قابل قبول (OD : ۱/۲۷) تهيه گرديد . سپس با جداسازي فراكسيون IgG و كونژوگه كردن آن با آنزيم پراكسيداز ، آنتي سيكلوسپورين كونژوگه توليد شد كه اختصاصي بودن آن بر عليه سيكلوسپورين توسط تست الايزاي غير مستقيم به اثبات رسيد . در ادامه از اين آنتي بادي كونژوگه براي تشخيص سيكلوسپورين در گلبولهاي قرمز به كمک تست ايمونوپراكسيداز مستقيم استفاده شد و تصاوير موجود در قسمت يافته هاي پژوهش مؤيد اين توانايي مي باشند . تاكنون اطلاعات جامع و منتشر شده اي در مورد تشخيص سيكلوسپورين در گلبولهاي قرمز و سفيد توسط روشهاي ايمونوهيستوشيمي گزارش نشده است و فقط چند مطالعه در مورد تشخيص اين دارو در بيوپسي اندامهاي مختلف گيرندگان پيوندهاي كليه و كبد به چشم مي خورد (۱۸،۱۹،۲۰) . در اين مطالعه از آنتي باديهاي پلي كلونال متصل شده به پراكسيداز در يک آزمايش ايمونوپراكسيداز مستقيم بر روي

1 -Quesniaux

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

اسلايدهاي خوني بيماران دريافت كننده سيكلوسپورين موجود در گلبولهاي قرمز استفاده شد و همانطور كه در تصاوير مشهود است علاوه بر جنبه تشخيصي ، مي تواند روشي نيمه كمي تلقي شده و بر اساس غلظت ، ضخامت و شدت رنگ رسوب ايجاد شده در حاشيه غشاي گلبولهاي قرمز ، مقدار دوز مصرفي دارو نيز تخمين زده شود . در مورد استفاده از آنتي باديهاي كونژوگه عليه سيكلوسپورين ، براي تعيين يا تشخيص حضور سيكلوسپورين در گلبولهاي قرمز گزارشي ديده نشده و اين روش براي اولين بار گزارش مي‌گردد. تصاوير موجود در يافته‌هاي پژوهش مؤيد ارتباط مستقيم بين قدرت تشخيص آنتي بادي پلي كلونال توليد شده و دوز مصرفي دارو در بيماران مي‌باشد. اميد است با ادامه تحقيقات در اين زمينه و توليد اينگونه آنتي باديها در جهت طراحي تكنيك‌هاي مختلف براي تشخيص و تعيين مقدار و غلظت داروهاي مختلف در خون و مايعات بيولوژيك گامهاي بلندتري برداشته شود.

References

1-Barbuto , J.A.M , Akporiaye , E.T. & Hersh , E.V. (1998) . Immunopharmacology . In Basic and clinical pharmacology . PP.916-941. Edited by B.G . katzung . Stamford : Appleton & lange .

2-Kawabata ,T.T. & Munson ,A.E.(1994) .Immunopharmacology . In Humana pharmacology .PP.597-614. Edited by T.M.Brody , J.Larner , K.P.Minneman , H.C.Neu . Missouri : ST . Louis.

3-Kahan , B.D .(1985) . Individualization of cyclosporine Therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters Transplantation 40: 457-476.

4-Yee,G.C & Salomon , D.R .(1994) . Cyclosporine , In Applied pharmacokinetic principles of Therapeutic Drug Monitoring , PP.28-1 -28-40 , Edited by W.E .Evans , S.J.Schentag , W.J.Jusko , Applied Therapeutic INC .USA.

5-Kahan , B.D.(1998) . Cyclosporine . the new England journal of medicine .321:1725-1738.

6-KAHAN , B.D & Grevel , J.(1998) .Optimization of Cyclosporine therapy in renal transplantation by a pharmacokinetic strategy .Transplantation 46:631-644.

7- Kivisto ,K.T.(1992) .A review of assay methods for cyclosporine .Clinical pharmacokinetic 23:173-190.

8- Hansen , J.B., Lau ,H.P., Jans , C.J et al (1990) . A rapid and specific assay for discrete clinical analyzer , performed directly on whle blood .Transplantation proceedings 22:1184-1192.

9-Stabler,T.V. , & Siegel , A.L.(1990) . Chemiluminessence Immunoassay of cyclosporine in whole blood . Clinical chemistry .36:906-908.

10-Dasgupta , A. , Saldana , S.& Desal ,M.(1997). Analatical performance of Emit cyclosporine assay evaluated . Clinical chemistry 37: 2130-2133.

11-Quesniaux ,V.F, Tees ,R.,Schreier ,M.H.(1996) . Monoclonal antibodies To cyclosporine . progress Allergy 38:108-122.

12- Johnstone, A.& Thorpe , R.(1987) . Immunochemistry in practice , Blackwell scientific publications .

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

13- Allen ,P.C .(1994) .Laboratory animals and care use .In Antibody Techniques , PP.115-140. Edited by v.s . Malik & E.P. Lillehoz .Academic press ,INC.
14-Harlow ,E .& Lane ,D.(1991) . Antibodies , a laboratory manual cold spring Horbor press .
15-Hosseinzade ,M., Ghaderi .A. ,(2002) .Production and characterization of polyclonal anti cyclosporine –A antibody . Scientific journal . medical university of ILAM Vol.10, No .33,34 : PP 24-32.
16-Steinbuch ,M.& Andran ,K .(1996) .The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid . Archiers in Biochemistry Biophysis 134:279-284.
17-Hudson ,L.& HAY ,F.C.(1989) .practical Immunology . Blackwell Scientific publications.
18-Jakson ,P.& Blythe ,D.(1993) .Immunolabelling Techniques for light microscopy . In Immuno cytochemistry . A practical approach . PP.15-42. Edited by J.E .Beesley .IRL press .
19-Beesley , J.E .(1993) . Multiple Immunolabelling Techniques .In Immuno cyto chemistry , A practical approach , PP.103-126. Edited by J.E .Beesley .IRL press.
20-Landsorp .P.M., Astaloi , G.C, Osterhof , F . et al (1990). Immunoperoxidase procedures to detect monoclonal Antibodies against cell surface antigens .quantitation of binding and staining of Individual cells .Journal of Immunological Methods . 89:393-405.
21-Chen ,P.& Tal ,H.H .(1995).A Sensitive enzyme Immuno assay for cyclosporine A using antibodies generated against a Novel hapten. Research Communication Molecular pathology pharmacology .88:317-326.
22- Zenke ,G .Zeder , G.Strittmatter,U.et al (1992).
Anti- Cyclosporine monoclonal antibodies and their anti –Idiotopic counterpart : Structure and biological activity .Molecular Immunology 29:343-351.
23-Qesniaux ,V.F., Tees ,R., Schreier ,M.H. et al (1987).
Potential of monoclonal antibody to Improve therapeutic monitoring of cyclosporine . Clinical chemistry 33:32-37.
24- Cacalano, N.A., Cleveland,W.L.& Eplanger ,B.F.(1998). Antibodies to cyclosporine A (CSA) by a novel rote and Their use to monitor Cyclosporine levels by (RIA) . Journal of Immunology Methods 118: 257-263.
25-Quesniaux ,V.F.(1991) .Monoclonal antibody Technology for cyclosporine monitoring . Clinical Biochemistry 24:37-42.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

Journal Of Ilam University Of Medical Sciences Vol 13 , No , 2 , Summer 2005

in Indirect Peroxidase Method for Diagnosis of Drug in RBC

Hosseinzadeh M.(MSC)[1], Ghaderi A.(PhD)[2]. Vasee IM.(PhD)[3]

Abstract

Introduction: Cyclosporine is an Immunosuppressive agent by Inhibition of 11-12, INF-yand GM-CSF Gens. It is used in transplant and autoimmune patients and inhibition of GVHD in bone marrow transplations.

Methods: In this experimental research, polyclonal antibody was produced against cyclosporine in rabbit by glu taraldehide attachment to bovin serum albumin. Then, it was conjugated using peroxidase enzyme. Preparing blood slides of cyclosproing recipient patients and the control group, and fixing them by alcohol- acetone and preparation of slides from conjugated anti-cyclosporine antibody along with addition of DAB substrat and creating a brown sedimentation under the RBC membrane to detect the cyclosporine present in RBC were used.

Finds: Specificness of induced antibody was confirmed by indirect ELISA , while concentration and color of the sediment in the margin of RBC with drug doses were suitable in the patients.

Discussion: Applying such antibodies to design different techniques in detecting of the presence and amount of different agents in the blood, tissues and biological fluids is recommended.

* * *

Key words: Cyclosporine, kidney transplantation, immunohistochmistry.

[1]. Faculty member, Ilam medical university
2. Faculty member, Immunology Dep., Shiraz medical university
3. Faculty member, Pathology Dep., Shiraz medical university

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]