

تولید و استفاده از آنتی بادی پلی کلونال علیه سیکلوسپورین A در روش ایمونوپراکسیداز مستقیم برای تشخیص دارو در گلبولهای قرمز

مرتضی حسین زاده^۱، دکتر عباس قادری^۲، دکتر محمد واسعی^۳
تاریخ دریافت: ۸۴/۹/۱۵ تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۰/۲۵

چکیده

مقدمه: سیکلوسپورین به وسیله جلوگیری از بیان ژنهای ۲-IL، γ -IFN و GM-CSF، از عوامل سرکوب کننده سیستم ایمنی بوده و در بیماران پیوندی، اتوایمون و همچنین جلوگیری از بروز GVHD در پیوند مغز استخوان از آن استفاده میشود. در این تحقیق تشخیص این دارو در خون و گلبولهای قرمز با استفاده از روش ایمونوپراکسیداز مستقیم مورد مطالعه قرار گرفت. **مواد و روش‌ها:** در این تحقیق آزمایشگاهی آنتی بادی پلی کلونال علیه سیکلوسپورین در خرگوش به وسیله اتصال گلو تار آلبدیدی با آلبومین گاوی تولید و به وسیله آنزیم پراکسیداز کونژوگه گردید. اسلایدهای خونی از بیماران دریافت کننده سیکلوسپورین و گروه شاهد تهیه و به وسیله محلول الکل _ استون عمل فیکساسیون انجام شد. مراحل آماده سازی لام ها با استفاده از آنتی سیکلوسپورین آنتی بادی کونژوگه، همراه با افزودن سوبسترای DAB و ایجاد رسوب قهوه ای رنگی در زیر غشاء RBC، برای تشخیص حضور سیکلوسپورین در گلبولهای قرمز انجام گردید. **یافته‌های پژوهش:** اختصاصی بودن آنتی بادی تهیه شده توسط روش الیزای غیر مستقیم تأیید و غلظت و شدت رنگ رسوب در حاشیه گلبولهای قرمز با دوز مصرفی دارو در این بیماران متناسب بود.

نتیجه‌گیری نهایی: استفاده از این گونه آنتی بادیها در جهت طراحی تکنیک‌های مختلف برای تشخیص حضور و تعیین مقدار و غلظت داروهای متفاوت در خون، بافت و مایعات بیولوژیک توصیه می‌گردد.

واژه های کلیدی: سیکلوسپورین، پیوند کلیه، ایمونوهیستوشیمی

۱. عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام- نویسنده مسؤول Email: morhos110@yahoo.com

۲. استاد گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۳. دانشیار گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

مقدمه

سیکلوسپورین یکی از عوامل مهم سرکوب کننده سیستم ایمنی بوده و در سطح وسیعی در بیماران دریافت کننده پیوند اعضا، بیماران خود ایمن و جهت جلوگیری از بروز GVHD^۱ بدنال پیوند مغز استخوان مورد استفاده قرار می گیرد. به همراه این دارو از عوامل دیگری چون کورتیکواستروئیدها، FK₅₀₆، میکوفنولات موقتیل، پارامایسین، تالیدومید و ... استفاده می شود (۱).

حضور سیکلوسپورین در بدن بیماران دریافت کننده این دارو و تعیین غلظت و مقدار آن بسیار مهم است زیرا افزایش غلظت آن عوارض مختلف و حادی چون نفروتوکسی سیتی و هپاتوتوکسی سیتی را بوجود آورده و کاهش غلظت آن نیز سبب سرکوب نامناسب سیستم ایمنی و رد پیوند می گردد (۲،۱). به علت اختلافات فارماکودینامیکی و فارماکوکینتیکی سیکلوسپورین در بدن افراد مختلف، تعیین مقدار و دوز مصرفی همراه با تعیین غلظت آن از مسائل مهم درمان رد پیوند در بیماران خود ایمن می باشد (۴،۳). داروی جذب شده در خون به اجزا و عناصر سلولی و پلاسمایی مانند گلبولهای قرمز، سفید و لیپوپروتئینهای پلاسما متصل و از طریق عروق به تمام بافتهای بدن می رسد. توزیع دارو در اندامهایی چون کبد، پانکراس و بافتهای لیپیدی به مقدار زیاد و در اندامهایی چون قلب، شش، مغز، کلیه، ماهیچه و نخاع به مقدار ناچیزی صورت می گیرد (۶،۵،۳). از داروی وارد شده به خون حدود ۵۰ تا ۶۰ درصد به گلبولهای قرمز، ۱۰ تا ۲۰ درصد به لکوسیتها و ۳۰ تا ۴۰ درصد به لیپوپروتئینهای پلاسما متصل می گردد. اتصال سیکلوسپورین به

گلبولهای قرمز اشباع پذیر بوده و به حرارت و هماتوکریت بستگی دارد و با کاهش دما یا افزایش هماتوکریت، افزایش می یابد (۵،۴).

برای تشخیص و تعیین سیکلوسپورین از روشهای اختصاصی (سیکلوسپورین خالص) و غیر اختصاصی (سیکلوسپورین همراه با متابولیتهای مختلف) استفاده می شود. بطور مثال HPLC^۲ روش مرجع در اندازه گیری اختصاصی بوده و روشهای دیگر چون RIA^۳، ELISA^۵، FPIA^۶، ACMA^۷، CLIA^۸، EMIT و ... به صورت اختصاصی و غیر اختصاصی مورد استفاده قرار می گیرند (۷،۸،۹،۱۰،۱۱). در تمامی این روشها با استفاده از تولید آنتی بادهای پلی کلونال یا مونوکلونال بر علیه سیکلوسپورین خالص یا سیکلوسپورین به انضمام متابولیتهای آن میتوان مقدار دارو را در خون یا مایعات بیولوژیک تعیین نمود (۴،۷،۸،۱۱). در اکثر تحقیقات انجام شده از آنتی سرم های خرگوشی یا گوسفندی ناشی از ایمونیزاسیون به وسیله کونژوگه هایی مانند آلومین گاوی یا هموسیائین (KLH) استفاده می شود. در مواردی نیز از آنتی سرم موشی ناشی از ایمونیزاسیون با سیکلوسپورین C به اضافه اوا آلومین یا از آنتی بادی مونوکلونال نیز استفاده شده است. این آنتی بادهای IgM موشی از ایمونیزاسیون، 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 Immunoenzymometric Assay.
7. Chemi Luminescent Immuno Assay
8. Enzyme Multiplied Immunoassay Technique

سپس کونژوگه توسط فیلتر $0.25 \mu\text{m}$ (۱۲) استریل و برای ایجاد پاسخ ایمنی بهتر همراه با ادجوانت فروند کامل (CFA) برای تزریق آماده شد. بدین ترتیب که برای تزریق اول 0.5 میلی گرم کونژوگه سیکلوسپورین با مقدار مساوی CFA^2 مخلوط و به صورت زیر جلدی در دو موضع تزریق گردید. تزریق های یادآور در خرگوش ها نیز، به ترتیب در روزهای ۱۴، ۳۴ و ۶۴ بعد از تزریق اول همراه با ادجوانت فروند ناقص انجام و بعد از هر تزریق در فاصله ۱۴-۷ روز خون گیری از حیوانات انجام و مراحل پیشرفت ایمنیزاسیون تعقیب گردید (۱۲، ۱۳، ۱۴). سپس سرم حیوانات جدا شد و عیار آنتی بادی علیه سیکلوسپورین به روش الایزای غیر مستقیم تعیین گردید (۱۵). بعد از حصول اطمینان از کافی بودن عیار آنتی سیکلوسپورین، آنتی بادی تولید شده در سرم خرگوشی، جدا سازی و IgG اختصاصی با روش کاپریک اسید انجام گرفت (۱۶). سپس IgG بدست آمده توسط پراکسیداز با روش پراپدات سدیم نشاندار شد (۱۴، ۱۷)، با این عمل آنتی سیکلوسپورین کونژوگه با پراکسیداز تهیه و برای انجام تست ایمنوپراکسیداز آماده گردید.

ب) ایمنوپراکسیداز مستقیم برای تشخیص سیکلوسپورین در گلبولهای قرمز:

برای این منظور در ابتدا از بیمارانی که داروی سیکلوسپورین مصرف می کردند خون گیری انجام شد و بلافاصله گسترش خونی بر روی لام تهیه گردید. بهترین زمان خونگیری برای این منظور ۲ ساعت پس از خوردن دارو میباشد که سطح دارو در خون بیماران به بالاترین زمان رسیده و حدود ۶۰-۵۰ درصد سیکلوسپورین موجود در خون به

سیکلوسپورین آزاد تولید شده اند (۱۱). در این بررسی آنتی بادی پلی کلونال علیه سیکلوسپورین در خرگوش تولید و از آن برای تشخیص حضور سیکلوسپورین در گلبولهای قرمز استفاده گردید.

مواد و روش ها

الف) تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه سیکلوسپورین A در خرگوش: در ابتدا سیکلوسپورین A همراه با آلبومین گاوی^۱ کونژوگه شد و با عمل دیالیز تغلیظ و جهت ایمنیزاسیون خرگوش بکار رفت. به همین خاطر $1/5 \text{mg}$ بودر $\text{CSA}(\text{Sandoz})$ را در دو قطره اتانول خالص حل کرده و هم زمان $2/5 \text{mg}$ بودر BSA در $2/5 \text{ ml}$ آب مقطر حل گردید. سپس هر دو ترکیب به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 4°C بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شده و 1 ml گلو تار آلدئید ۲۱ میلی مولار در بافر فسفات 0.1 مولار به آن اضافه گردید. سپس به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه بر روی همزن قرار داده و در کیسه دیالیز ریخته و به مدت ۲۴ ساعت شدیداً علیه PBS دیالیز شد. سپس این محلول کونژوگه در لوله های اپن دورف تقسیم شد و برای نگهداری طولانی مدت منجمد گردید (۱۲). جهت تعیین غلظت نهایی کونژوگه به روش اسپکتروفتومتری و بوسیله شاهد PBS میزان جذب (OD) محلول کونژوگه در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد و بوسیله فرمول زیر غلظت نهایی تعیین گردید (۱۲):

$$-(1/55 \times \text{OD}280) = (\text{mg/ml}) \\ -(0/77 \times \text{OD}260) = \text{غلظت}$$

۱۰) رنگ آمیزی زمینه^۱: اسلایدها پس از شستشو با آب مقطر، خشک شده و سپس به مدت ۴۰ ثانیه در محلول رنگ تازه همتوکسیلین قرار داده و توسط آب مقطر شستشو داده شدند. ۱۱) آبیگری اسلایدها: اسلایدها به مدت ۲-۳ دقیقه در الکل هفتاد درصد و سپس به مدت ۲-۳ دقیقه در الکل مطلق قرار داده شدند.

۱۲) شفاف کردن و پایدار نمودن^۲: اسلایدها سه بار در زیلن (Xylene) شستشو و سپس توسط انتلان پوشانیده گردیدند.

نتیجه نهایی در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد و آخرین رقتی از آنتی سیکلوسپورین کوئوگه با پراکسیداز که رنگ مطلوبی را ایجاد کرده بود، به عنوان عیار آنتی سیکلوسپورین نشاندار در آزمایش ایمونوپراکسیداز تلقی گردید. این عیار در آنتی سیکلوسپورین خرگوشی نشاندار برابر $\frac{1}{20}$ تعیین گردید (۱۸، ۱۹، ۲۰).

یافته های پژوهش

در اولین مرحله که کوئوگه + CSA BSA تهیه گردید برای تعیین غلظت به روش اسپکتروفتومتری جذب نوری محلول کوئوگه در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول مذکور غلظت نهایی برابر ۲/۳۳ mg/ml تعیین گردید (جدول ۱).

سپس با تزریق این کوئوگه به خرگوش و تزریق یادآور در روزهای مذکور به تدریج عیار آنتی بادی علیه سیکلوسپورین A افزایش پیدا کرد که میزان عیار آنتی بادی در روزهای مذکور و میزان جذب نوری در آزمایش الیزای غیر مستقیم در جدول ۲ آمده است.

گلبولهای قرمز متصل شده است. بنابراین با خونگیری از بیماران و تهیه اسلاید خونی مراحل آزمایش ایمونوپراکسیداز به ترتیب زیر انجام گرفت (جهت کنترل منفی از افراد سالم که دارو مصرف نکرده بودند استفاده شد):

۱) فیکساسیون اسلاید های خونی: این عمل با قرار دادن اسلاید خونی در محلول الکل- استون (۱: ۱) و به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

۲) شستشو: قرار دادن اسلایدها در PBS به مدت ۳ دقیقه (سه بار)

۳) خنثی کردن پراکسیداز درونی گلبولهای قرمز: قرار دادن اسلایدها در محلول ۳ درصد H_2O_2 و در متانول به مدت یک ساعت

۴) شستشو: مانند مرحله دوم

۵) جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی: با افزودن سرم نرمال افراد کنترل منفی با رقت $\frac{1}{5}$ بر روی اسلایدها و قرار دادن

اسلاید ها به مدت ۱۰ دقیقه در اتاقک مرطوب

۶) شستشو: مانند مرحله دوم

۷) افزودن آنتی سیکلوسپورین آنتی بادی نشاندار: رقتهای متوالی از آنتی سیکلوسپورین خرگوشی نشاندار تهیه و بر روی اسلایدها ریخته و به مدت یک ساعت در دمای اتاق و در محفظه مرطوب قرار گرفت.

۸) شستشو: مانند مرحله دوم

۹) افزودن سوبسترا: سوبسترا (۵ میلی گرم DAB به اضافه ده میلی لیتر PBS و ده میکرو لیتر H_2O_2) را بر روی اسلاید ها اضافه کرده و به مدت ده دقیقه در حرارت اتاق قرار داده شد و توسط آب مقطر، واکنش متوقف شد و اسلاید ها شستشو داده شدند.

1. Counter staining

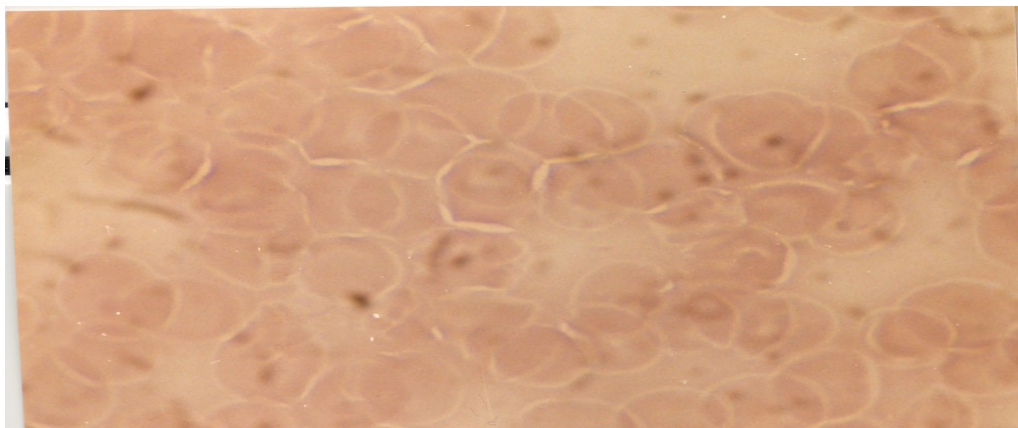
2. Mounting

جدول ۱: میزان جذب نوری و غلظت کونژوگه سیکلوسپورین و آلبومین سرم گاوی

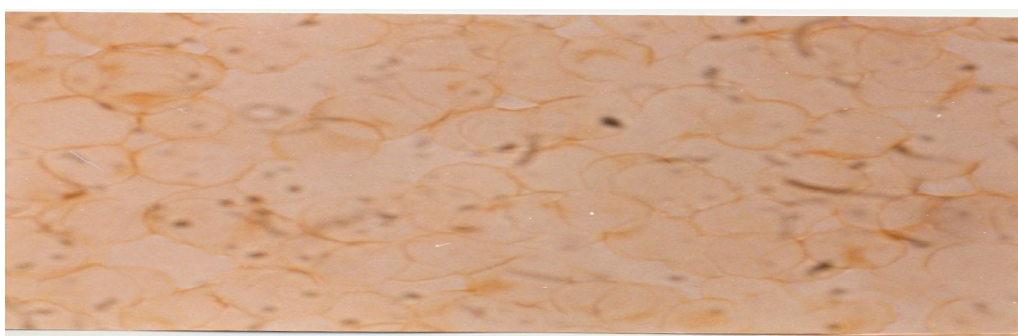
OD ۲۸۰ nm ۰/۱۲	OD ۲۶۰ nm ۰/۰۷۹	mg/ml ۲/۳۳	CSA + BSA		
جدول ۲: نتایج حاصل از آزمایش الایزای غیر مستقیم برای تعیین عیار آنتی سیکلوسپورین در خرگوش					
(CSA + BSA)					
۷۴	۴۴	۲۴	۱۴	۰	روز
۱/۵۳	۱/۸۱	۱/۶۲	۰/۵۳	۰	جذب نوری (OD)

برابر $\frac{1}{800}$ با $OD = 1/27$ و غلظت آن برابر $1/55 \text{ mg/ml}$ تعیین شد. این غلظت برای تمام کونژوگه های آنزیمی یکسان بود. حال در دومین مرحله که آزمایش ایمونوپراکسیداز مستقیم برای تشخیص سیکلوسپورین در گلبولهای قرمز انجام گرفت مشاهده گردید که آنتی بادی کونژوگه تولید شده علیه سیکلوسپورین توانایی تشخیص سیکلوسپورین موجود در گلبولهای قرمز را داشته و پس از اتصال به سیکلوسپورین و افزودن سوبسترای DAB رسوب قهوه ای رنگی در محل اتصال $Ag-Ab$ در زیر غشاء RBC تشکیل گردید. از بیمارانی که دوزهای مختلف از سیکلوسپورین را مصرف کرده بودند در زمان Peak یعنی ۲ ساعت پس از مصرف، نمونه گیری انجام و پس از تهیه اسلاید و آزمایش ایمونوپراکسیداز مستقیم واکنش آنتی ژن - آنتی بادی انجام شد و رسوب قهوه ای رنگی مشاهده گردید. جالب توجه اینکه غلظت و شدت رنگ رسوب در حاشیه غشا RBC متناسب با دوز مصرفی دارو بود و در دوزهای بالاتر رسوبهای تیره تر و ضخیم تري تشکیل گردید.

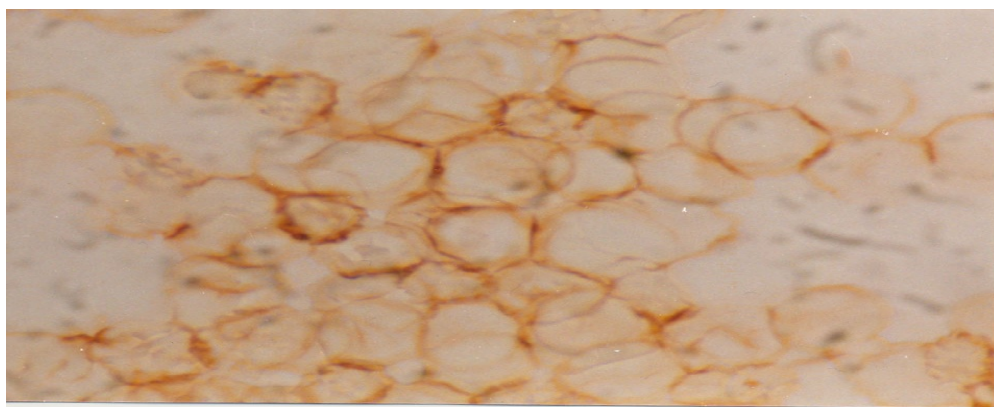
با توجه به جدول ۲، قبل از تزریق، میزان آنتی بادی اختصاصی در روز صفر برابر صفر بود که در روز ۱۴ (قبل از تزریق دوم) افزایش مختصری را نشان داد. میزان آنتی بادی ده روز بعد از تزریق دوم در روز ۲۴ نسبت به نوبت قبل افزایش قابل ملاحظه ای داشته و همچنین میزان آنتی بادی، ده روز بعد از تزریق سوم یعنی در روز ۴۴ نیز افزایش یافته بود. ولی این میزان آنتی بادی ده روز بعد از تزریق چهارم یعنی روز ۷۴ کاهش پیدا کرد. بیشترین میزان آنتی بادی ده روز بعد از تزریق سوم (یادآور دوم) وجود داشته که پس از اطمینان از عیار بالای آن در آزمایش الایزای غیر مستقیم، خونگیری نهایی انجام گردید و سرم حیوانات جدا شد. در مرحله بعد، فراکسیون IgG از آنتی سرم خرگوشی تهیه و به روش کاپریک اسید جدا شد و در بافر PBS دیالیز گردید. غلظت آن به روش اسپکتروفتومتری برابر 12 mg/ml در حجمی معادل 10 ml تعیین شد. حال از این فراکسیون IgG جهت تولید آنتی سیکلوسپورین نشاندار با پراکسیداز استفاده شد. این عمل به کمک پرآیدات سدیم و بورو هیدرات سدیم انجام گرفت و جهت تعیین عیار و غلظت آنتی بادی نشاندار به کمک روش الایزای مستقیم عیار آنتی بادی



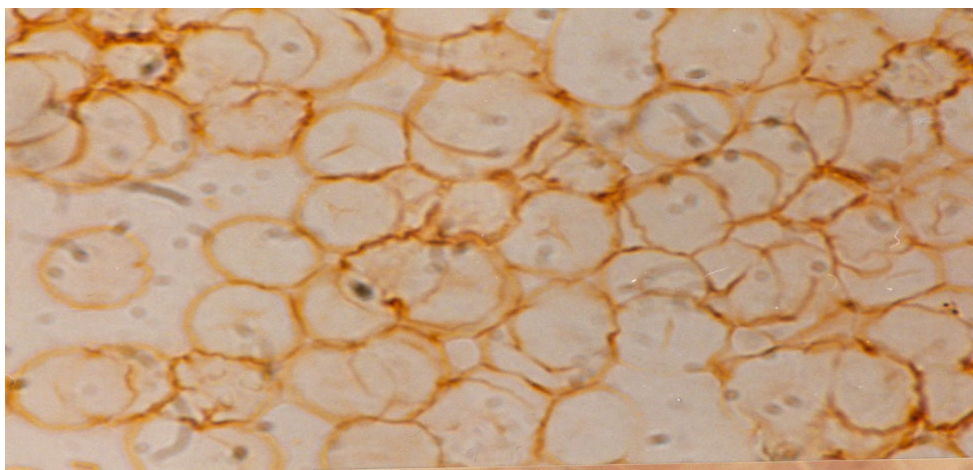
تصوير شماره ۱ : کنترل منفي



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



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



تصویر شماره ۴ : خون حاوی سیکلوسپورین با دوز مصرفی ۱۰ mg/kg

بحث و نتیجه گیری

برای ایمونیزاسیون خرگوش بر علیه سیکلوسپورین استفاده شد و در تأیید تحقیقات گذشته عیار آنتی بادی تا رقت ۱:۱۲۰۰۰ با جذب قابل قبول ($OD: 1/27$) تهیه گردید. سپس با جداسازی فراکسیون IgG و کونژوگه کردن آن با آنزیم پراکسیداز، آنتی سیکلوسپورین کونژوگه تولید شد که اختصاصی بودن آن بر علیه سیکلوسپورین توسط تست الایزای غیر مستقیم به اثبات رسید. در ادامه از این آنتی بادی کونژوگه برای تشخیص سیکلوسپورین در گلبولهای قرمز به کمک تست ایمونوپراکسیداز مستقیم استفاده شد و تصاویر موجود در قسمت یافته های پژوهش مؤید این توانایی می باشند. تاکنون اطلاعات جامع و منتشر شده ای در مورد تشخیص سیکلوسپورین در گلبولهای قرمز و سفید توسط روشهای ایمونوهیستوشیمی گزارش نشده است و فقط چند مطالعه در مورد تشخیص این دارو در بیوپسی اندامهای مختلف گیرندگان پیوندهای کلیه و کبد به چشم می خورد (۲۰، ۱۹، ۱۸). در این مطالعه از آنتی بادهای پلی کلونال متصل شده به پراکسیداز در یک آزمایش ایمونوپراکسیداز مستقیم بر روی

در پژوهشهایی که تاکنون برای تشخیص و اندازه گیری غلظت سیکلوسپورین در خون و مایعات بیولوژیک بدن انجام شده است از روشهای متفاوتی چون EMIT, CLIA, ACMIA, FPIA, ELISA, RIA, HPLC و ... استفاده شده است و آنتی بادهای مختلف پلی کلونال و مونوکلونال با حساسیت های متفاوت تولید گردیده اند (۲۲، ۲۱، ۱۱، ۱۰، ۹، ۸، ۷). همچنین در تکنیک تولید آنتی بادهای پلی کلونال از حیوانات مختلفی چون خرگوش، بز، موش، خوکچه هندی، اسب و ... به وسیله کونژوگه های مختلفی از سیکلوسپورین با پروتئین های حامل از قبیل KLH, BSA، اوا آلبومین و ... استفاده شده و منجر به تولید عیارهای مختلفی از سیکلوسپورین آنتی بادی گردیده است (۲۲، ۲۱، ۱۳، ۷).

در تحقیقات متعددی نیز که توسط کسنیو^۱ انجام شد از سیکلوسپورین A یا C به انضمام سرم آلبومین گاوی استفاده شد و عیارهای بالایی نیز از آنتی سیکلوسپورین آنتی بادی تولید شد (۲۲). در این تحقیق از کونژوگه

1-Quesniaux

گلبولهای قرمز گزارشی دیده نشده و این روش برای اولین بار گزارش می‌گردد. تصاویر موجود در یافته‌های پژوهش مؤید ارتباط مستقیم بین قدرت تشخیص آنتی بادی پلی کلونال تولید شده و دوز مصرفی دارو در بیماران می‌باشد. امید است با ادامه تحقیقات در این زمینه و تولید اینگونه آنتی بادیها در جهت طراحی تکنیک‌های مختلف برای تشخیص و تعیین مقدار و غلظت داروهای مختلف در خون و مایعات بیولوژیک گام‌های بلندتری برداشته شود.

اسلایدهای خونی بیماران دریافت کننده سیکلوسپورین موجود در گلبولهای قرمز استفاده شد و همانطور که در تصاویر مشهود است علاوه بر جنبه تشخیصی، می‌تواند روشی نیمه کمی تلقی شده و بر اساس غلظت، ضخامت و شدت رنگ رسوب ایجاد شده در حاشیه غشای گلبولهای قرمز، مقدار دوز مصرفی دارو نیز تخمین زده شود. در مورد استفاده از آنتی بادیهای کونژوگه علیه سیکلوسپورین، برای تعیین یا تشخیص حضور سیکلوسپورین در

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 whole blood .Transplantation proceedings 22:1184-1192.
- 9-Stabler,T.V. , & Siegel , A.L.(1990) . Chemiluminescence Immunoassay of cyclosporine in whole blood . Clinical chemistry .36:906-908.
- 10- Dasgupta , A. , Saldana , S.& Desai ,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 .

- 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.

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 transplants.

Methods: In this experimental research, polyclonal antibody was produced against cyclosporine in rabbit by glu taraldehyde attachment to bovin serum albumin. Then, it was conjugated using peroxidase enzyme. Preparing blood slides of cyclosporine 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 substrate 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, immunohistochemistry.

¹. Faculty member, Ilam medical university

². Faculty member, Immunology Dep., Shiraz medical university

³. Faculty member, Pathology Dep., Shiraz medical university

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.