

## مقایسه تعیین مقدار $TNF-\alpha$ به دو روش Immunoassay و bioassay در پلاکتهای متراکم

دکتر مژگان شایگان\* (استادیار)، دکتر علی اکبر پورفتح اله\*\* (دانشیار)، مهرناز نمیری (کارشناس ارشد)\*\*\*، دکتر غلامرضا بابائی (دانشیار)\*\*\*\*

\* مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، بخش ایمنولوژی

\*\* دانشگاه تربیت مدرس، بخش هماتولوژی و سازمان انتقال خون ایران

\*\*\* کارشناس ارشد ایمنولوژی - دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده پزشکی

\*\*\*\* آمار حیاتی و اپیدمیولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی

### چکیده

**مقدمه:** عامل نکروز دهنده تومور ( $TNF-\alpha$ ) یک واسطه التهابی مهم در پاسخ‌های التهابی است و در بروز واکنش‌های غیر همولیتیک تب‌زا (Febrile Non-Heamolytic Transfusion Reactions = FNHTRs) پس از تزریق پلاکتهای متراکم نقش ایفا میکند. تصور میشود لکوسیت‌های باقیمانده منبع این سایتوکائین هستند لذا غیرفعال کردن یا کاهش تعداد آنها در کاهش این سایتوکائین مؤثر میباشد. با توجه به اختلاف روشهای متعدد اندازه‌گیری  $TNF-\alpha$ ، هدف این مطالعه مقایسه تعیین  $TNF-\alpha$  در مایع روئی پلاکتهای متراکم (Platelet Concentrates = PCs) به دو روش Immunoassay (سنجش ایمنی) و Bioassay (سنجش زیستی) میباشد.

**مواد و روشها:** غلظت  $TNF-\alpha$  با دو روش ELISA (سنجش ایمنی) و تجزیه سلولی (Cell Lysis) رده L929 (سنجش زیستی) در مایع روئی پلاکتهای متراکم تهیه شده بر روش پلاسما غنی از پلاکت (Pletelet Rich Plasma = PRP) از اهداکننده منفرد اندازه‌گیری شد. پلاکتهای متراکم در ۴ گروه تقسیم شدند:

۱- پلاکتهای متراکم صاف نشده (un flitered) و اشعه ندیده (n= ۱۳)

۲- پلاکتهای متراکم صاف نشده و اشعه دیده یا  $\gamma$ -irradiated (n= ۱۶)

۳- پلاکتهای متراکم صاف شده و اشعه ندیده (n= ۱۴)

۴- پلاکتهای متراکم صاف شده و اشعه دیده (n= ۱۱)

**یافته‌ها:** مقدار  $TNF-\alpha$  اندازه‌گیری شده (بروش ELISA) در نمونه‌های صاف نشده و اشعه ندیده طی دوره نگهداری افزایش می‌یابد، اما در مورد نمونه‌های تحت تابش اشعه گاما و صاف شده صادق نمیشد. در مقایسه با نمونه‌های صاف نشده، تابش اشعه و عبور از صافی (filtration) قبل از دوره نگهداری، از افزایش  $TNF-\alpha$  در روز سوم جلوگیری میکنند. ارتباطی بین اندازه‌گیری غلظت  $TNF-\alpha$  به دو روش ELISA و سنجش زیستی وجود ندارد.

**نتیجه‌گیری و توصیه‌ها:** قبلا نیز گزارش شده است که در صورت اندازه‌گیری  $TNF-\alpha$  در مایعات بیولوژیک بوسیله سنجش ایمنی و سنجش زیستی نتایج کمی مختلفی حاصل میشود. تصور میشود این اختلاف به حضور اشکال آنتی ژنیک مختلف (نظیر شکل مونومر یا مجموعه  $TNF-\alpha$  با پذیرنده‌های محلول) مربوط میباشد که بوسیله سنجش زیستی غیرقابل تشخیص هستند.

شرایط تابش اشعه و یا کاهش لکوسیت قرار گرفته‌اند، با یکدیگر مقایسه شدند.

## مقدمه

TNF- $\alpha$  یا کاشکسین واسطه التهابی است که در فاز ایمنی اکتسابی و اختصاصی نقش مهمی را ایفا میکند (۱). منابع عمده مولد این سایتوکائین التهابی لنفوسیت‌های T و B، سلول‌های رده مونوسیت - ماکروفاژ، دندریتیک سلها، ماست سلها و سلول‌های کشنده طبیعی (NKC) هستند. عملکرد عمده آن خاصیت سمیت سلولی (Cytotoxicity) تومور، کاهش وزن (Cachxia)، القا ترشح سایتوکائینها، القا E-Selectin سطح سلول‌های اندوتلیال، فعالسازی ماکروفاژها و خاصیت ضد ویروسی میباشد (۲). فعالیت بیولوژیک کلاسیک TNF- $\alpha$  القا تجزیه یا تخریب سلول‌های هدف است. روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری TNF- $\alpha$  وجود دارد که از نظر حساسیت و اختصاصیت با هم تفاوت دارند، این روش‌ها شامل Immunoassay (سنجش ایمنی) و Bioassay (سنجش زیستی) هستند. اندازه‌گیری TNF- $\alpha$  با روش‌های ELISA و RIA از نوع سنجش‌های ایمنی میباشد. برای سنجش زیستی، از رده سلولی فیروسارکوما موش (L929) که نسبت به TNF- $\alpha$  حساس است استفاده میشود. برای اندازه‌گیری مقادیر اندک TNF- $\alpha$  در مایعات بیولوژیک از رده‌های سلولی بسیار حساستر WEHI164 استفاده میشود. نتایج حاصله از اندازه‌گیری TNF- $\alpha$  در مایعات بیولوژیک به دوروش سنجش ایمنی و سنجش زیستی متفاوت میباشد (۳). لذا در این مطالعه دو روش فوق جهت بررسی غلظت TNF- $\alpha$  در پلاسماهای فوقانی بدست آمده از پلاکت‌های متراکم (در روزهای صفر و سوم نگهداری) تهیه شده به روش PRP<sup>۱</sup> یا پلاسما غنی از پلاکت که برخی از واحدهای مذکور تحت

## مواد و روش‌ها

تعداد ۵۴ واحد پلاکت متراکم بروش PRP (۴) از خون کامل تهیه شده و بصورت تصادفی به ۴ گروه تقسیم گردیدند: ۱ - پلاکت‌های متراکم صاف نشده (unfiltered) و اشعه ندیده (non-irradiated) (تعداد ۱۳ واحد) ۲ - پلاکت‌های متراکم صاف نشده و اشعه دیده (- $\gamma$  irradiated) (تعداد ۱۶ واحد) ۳ - پلاکت‌های متراکم صاف شده و اشعه ندیده (تعداد ۱۴ واحد) ۴ - پلاکت‌های متراکم صاف شده و اشعه دیده (تعداد ۱۱ واحد) پلاکت‌های متراکم اشعه دیده تحت تابش (GY(rad) ۲۵۰۰ - ۳۰۰۰ اشعه گاما قرار گرفتند. جهت تهیه پلاکت‌های متراکم کم لکوسیت از کیسه صافی دار حاوی صافی (filter) کاهش دهنده لکوسیتی (Purecell-PL) محصول شرکت Pall (ایتالیا) استفاده شده است که این صافیها از جنس پلی استر و دارای بار منفی میباشند. جهت صاف کردن (filtration) ابتدا پلاکت‌های متراکم بروش PRP تهیه و سپس در زیر هود منافذ ورودی و خروجی کیسه حاوی پلاکت‌های متراکم و کیسه صافی دار یکدیگر متصل و سپس با آویزان کردن بر اثر جاذبه عمل صاف کردن تسهیل میشود. تحت شرایط استریل از پلاسما روئی پلاکت‌های متراکم ۱۰ ml نمونه گرفته که مقداری از آن جهت شمارش گلبول‌های قرمز و سفید مورد استفاده واقع شده و مابقی پس از سانتریفوژ بمدت ۱۵ - ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰ g جدا شده و در لوله‌های استریل تقسیم و به فریزر ۷۰ - درجه سانتیگراد منتقل شدند.

شمارش گلبول‌های قرمز و سفید و پلاکتها با لام نئوبار و با دستگاه Sysmex و کنترل PH انجام گردید. جهت شمارش گلبول‌های سفید در پلاکت‌های متراکم صاف شده از

<sup>۱</sup> در روش PRP (Platelet Rich Plasma)، برای جداسازی پلاکتها ابتدا خون کامل را در دور پائین با نیروی جاذبه (g) کم، معمولاً ۲۲۰۰ g بمدت ۳-۴ دقیقه، سانتریفوژ کرده که پلاسما غنی از پلاکت به راحتی از گلبولها قرمز جدا می‌شوند. سپس PRP با نیروی جاذبه زیادتر و سرعت بالاتر، معمولاً ۴۰۰۰ g بمدت ۵ دقیقه، مجدداً سانتریفوژ شده که حاصل آن پلاکت‌های متراکم و پلاسما کم پلاکت می‌باشد.

## یافته‌ها

میانگین غلظت TNF- $\alpha$  بین روز صفر، روز تهیه، (۱۵/۴۴ Pg/ml) و روز سوم (۲۴/۰۶ Pg/ml) در گروه اول (با  $P=0.021$ ) طی نگهداری افزایش معناداری را نشان می‌دهد. در سایر گروه‌ها میانگین غلظت TNF- $\alpha$  در روز سوم از روز صفر کمتر است که این کاهش در گروه‌های دوم، سوم و چهارم (بترتیب با  $P = 0.011$ ،  $P = 0.04$  و  $P = 0.037$ ) معنی دار می‌باشد، عبارتی در پلاکتهای متراکم صاف شده و اشعه دیده غلظت TNF- $\alpha$  طی نگهداری نه تنها افزایش نمی‌یابد بلکه بصورت معنی داری کاهش نیز نشان می‌دهد.

بررسی فعالیت بیولوژیک TNF- $\alpha$  نشان داد میانگین غلظت TNF- $\alpha$  (U/ml) در روزهای صفر و سوم در گروه اول (با  $P=0.51$ )، در گروه دوم (با  $P=0.44$ ) و در گروه چهارم (با  $P=0.41$ ) تفاوت معنی داری ندارد. اما در گروه سوم این تفاوت معنی دار می‌باشد ( $P=0.014$ )، عبارتی فعالیت بیولوژیک TNF- $\alpha$  در روز سوم فقط در گروه سوم بصورت معنی داری کاهش می‌یابد. میانگین و انحراف معیار غلظت TNF- $\alpha$  (در روزهای صفر و ۳) در گروه‌های مختلف به دو روش فوق‌الذکر در جدول شماره ۱ و اشکال ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند. بررسی آماری اطلاعات ما نشان داد که نتایج حاصله از اندازه‌گیری غلظت TNF- $\alpha$  در روزهای صفر و سوم به دو روش سنجش بیولوژیک و سنجش ایمونولوژیک در داخل و بین گروه‌ها فاقد ارتباط معنی دار بوده (با  $P > 0.05$ ) و اختلاف نتایج حاصله معنادار می‌باشند.

لام Negetotte استفاده شد که حساسیت آن  $0.1 \text{ WBC} / 1 \mu\text{l}$  تخمین زده شده است. شمارش گلبولها و کنترل PH روزهای صفر و ۳ (و در مورد نمونه‌های صاف شده پس از فیلتراسیون شمارش سلولی مجدداً) انجام گردید.

جهت اندازه‌گیری غلظت TNF- $\alpha$  از کیت ELISA ۱۹۲ تستی محصول (Bio Source International (USA) (کمترین مقدار قابل ردیابی  $1/7 \text{ pg/ml}$ ) استفاده شد.

برای سنجش فعالیت بیولوژیک TNF- $\alpha$  به روش Bioassay از خاصیت تخریب سلولی آن استفاده میشود (۵ و ۶) و روش بطور خلاصه شامل مراحل زیر میباشد: در شرایط استریل تعداد  $10^5 \times 5 - 1$  از فیروبلاستهای رده L929 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FCS و ال-گلوتامین و مخلوط استرپتومایسین و پنی سیلین (که همگی از محصولات GIBCOBRL می‌باشند) را به حفرات پلیت ته صاف ۹۶ خانه Nunc افزود و سپس ۵۰ میکرولیتر از مایع روئی پلاکتی و ۵۰ میکرولیتر از محلول ۴ میکروگرم/ میلی لیتر اکتینومایسین- (D Cosmegen Lyovac) به حفرات اضافه کرده و بمدت ۱۸ ساعت در محیط مرطوب با دمای ۳۷ درجه و فشار ۵٪  $\text{CO}_2$  کشت می‌دهیم. پس از این مدت مایع روئی دور ریخته شده و حفرات با سرم فیزیولوژی سرد شستشو شده و پلیت را در دمای اتاق خشک مینمائیم. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر از کریستال ویوله Sigma، ۰/۵٪ در (متانول ۲۰٪) افزوده و جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و نتایج بصورت U/ml گزارش می‌شوند. 1 U مقداری از TNF- $\alpha$  است که باعث القا ۵۰٪ تخریب سلولی می‌شود (۶،۵).

بمنظور بررسی میانگین غلظت TNF- $\alpha$  در هر گروه در روزهای مختلف از آزمون Paired T-Test و در بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس استفاده گردید.

جدول شماره ۱- غلظت TNF- $\alpha$  (در روزهای صفر و سوم) در گروه‌های مختلف به دو روش سنجش زیستی و سنجش ایمنی

P Value	سنجش ایمنی (p g/ml)		P Value	سنجش زیستی (U/ml)		گروه‌ها
	TNF روز سوم	TNF روز صفر		TNF روز سوم	TNF روز صفر	
۰/۵۱	۴۴۹/۳ ±۷۱۹/۷ ۸۰- ۲۵۶۰	۵۶۹/۹ ±۹۴۸/۷ ۸۰- ۲۵۶۰	۰/۰۲۱	۲۴/۰۶ ±۱۱/۰۴ ۹- ۴۴/۸	۱۵/۴۴ ±۵/۳۲ ۱۲-۳۲	گروه اول میانگین ± SE حداقل- حداکثر N = ۱۳
۰/۴۴	۲۵۶ ± ۷۰۳/۴ ۸۰ - ۱۲۸۰	۲۱۵ ± ۱۸۸/۷ ۸۰ - ۳۲۰	۰/۰۱۱	۲۴/۳۹ ± ۱۰/۱۱ ۱۰/۵- ۳۸	۳۳/۱ ±۱۱/۹۹ ۸/۴ - ۴۶	گروه دوم میانگین ± SE حداقل- حداکثر N = ۱۶
۰/۰۱۴	۱۴۹/۹ ±۱۵۷/۵ ۸۰ - ۶۴۰	۴۳۴/۳ ±۴۲۹/۹ ۸۰ - ۱۲۸۰	۰/۰۳۷	۳۲/۱۸ ± ۷/۵۹ ۱۵/۳-۴۰/۲	۳۵/۲۷ ±۶/۸۲ ۱۵-۴۲/ ۳	گروه سوم میانگین ± SE حداقل- حداکثر N = ۱۴
۰/۴۱	۱۶۲/۳ ± ۱۷۳/۳ ۸۰ - ۶۴۰	۲۶۹/۱ ± ۳۵۱/۱ ۸۰ - ۱۲۸۰	۰/۰۴	۲۸/۷ ± ۹/۳۳ ۱۴/۷-۴۰/۸	۳۲/۹۲ ±۶/۴۸ ۱۸/۵-۳۹/۵	گروه چهارم میانگین ± SE حداقل- حداکثر N = ۱۱

## بحث

پلاکت‌های متراکم ناشی از تولید یا آزاد سازی آنها از گلبول‌های سفید باشد. ثابت شده است با کاهش تعداد گلبول‌های سفید قبل از نگهداری پلاکت‌های متراکم توسط صافی‌های کاهش دهنده لکوسیتی می‌توان از تجمع این سایتوکائین‌ها جلوگیری نمود (۸،۷) در حالیکه عوامل بیولوژیک محلول می‌توانند حضور داشته باشند (۹، ۱۰). در پلاکت‌های متراکم با تعداد لکوسیت کمتر از  $10^9 \times 1/1$  نمی‌توان سایتوکائینها را ردیابی نمود (۱۱-۱۳). نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که غلظت TNF- $\alpha$  طی نگهداری پلاکت‌های متراکم تهیه شده بر روش PRP در نمونه‌های اشعه ندیده افزایش و در نمونه‌های تحت تابش اشعه و یا صاف شده کاهش می‌یابد که از این نظر موید مطالعات مشابه قبلی می‌باشد (۷-۱۰). در سال ۱۹۹۷، Fujihara و همکاران (۷) پلاکت‌های متراکم تهیه شده بر روش آفرزین را به سه بخش تقسیم و آنها را تحت تالش اشعه گاما، UV و صاف کردن (با استفاده از صافی PXL-8 محصول Pall) قرار داده و غلظت

یافته‌های ما نشان دادند در حالیکه نتایج اندازه گیری غلظت TNF- $\alpha$  بر روش ELISA در گروه اول بیانگر افزایش غلظت آن و در گروه سوم و چهارم بیانگر کاهش این سایتوکائین طی نگهداری می‌باشد. نتایج آزمایش به روش سنجش زیستی نشان دادند که فعالیت بیولوژیک TNF- $\alpha$  در گروه‌های اول، دوم و چهارم طی نگهداری از روز صفر تا سوم تغییری نمی‌یابد و فقط در گروه سوم کاهش معنی داری نشان می‌دهد که در همین گروه نتیجه آزمایش به روش ELISA نیز بیانگر کاهش معنی داری می‌باشد. اما در بین نتایج دو روش فوق در کلیه گروه‌ها ارتباط معناداری مشاهده نمی‌شود. تحقیقات مختلفی بیانگر افزایش غلظت IL-1 $\beta$ ، IL-6 و TNF- $\alpha$  طی نگهداری (Storage) پلاکت‌های متراکم می‌باشند (۷-۱۰). تصور می‌گردد تجمع سایتوکائینها در

سطح سلولها، پذیرنده‌های محلول نیز وجود دارند که در تنظیم فعالیت سایتوکائینها در بدن از طریق مهار اتصال به پذیرنده‌های غشائی عمل میکنند. بسیاری از این پذیرنده‌ها باعث مهار فعالیت بیولوژیک سایتوکائینها در آزمایشگاه نیز میشوند (۱۶). اشکال محلول پذیرنده‌های  $TNF-\alpha$  (sTNFR) شامل TNFR1(P55) و TNFR2(P75) میباشند (۱۷-۱۹). با استفاده از کیت‌های ELISA علاوه بر سایتوکائینهای آزاد، سایتوکائینهای متصل به پذیرنده‌های محلول نیز ردیابی میشوند. عبارتی سایتوکائینهای که از نظر بیولوژیکی غیرفعالند، یا قطعات آنها نیز ممکن است در سنجش‌های ایمنی ردیابی شوند. (۲۰). تصور میشود اختلاف بدست آمده بین نتایج اندازه‌گیری غلظت  $TNF-\alpha$  در مایعات بیولوژیک به دو روش سنجش ایمنی و سنجش زیستی به حضور اشکال آنتی ژنیک  $TNF-\alpha$ ، که با روش سنجش زیستی قابل اندازه‌گیری نیستند، مربوط است. این اشکال شامل مجموعه‌های تشکیل شده با پذیرنده‌های محلول یا مونومرهای  $TNF-\alpha$  میباشند. بهمین دلایل سنجش زیستی برای غربالگری مناسب نمیباشد. (۸).

بطور خلاصه یافته‌های این تحقیق نشان دادند در مدت نگهداری پلاکتهای متراکم غلظت  $TNF-\alpha$  افزایش می‌یابد اما تابش اشعه گاما و یا کاهش گلبول‌های سفید مانع تجمع این سایتوکائین میگردد اما فعالیت بیولوژیک  $TNF-\alpha$  در مدت نگهداری پلاکتهای متراکم بجز در گروه سوم، که قبل از نگهداری گلبولهای سفید با استفاده از صافیهای کاهنده لکوسیتی کاهش یافته بودند، تغییر محسوسی نشان نداده است.

### تقدیر و تشکر

هزینه‌های این تحقیق توسط مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران تامین گردیده است. بدینوسیله نویسندگان این مقاله از سرکار خانم دکتر زهره عطارچی، جناب آقای حمید کاویانی، آقای سید تقی امینی، خانم فروغ اعظم طرابادی، سرکار خانم دکتر شهین شریفی و خانم طاهره هاشمی بخاطر همکاری در این طرح تشکرات خود را ابراز میدارند.

$IL-1\beta, IL-6, IL-8, TNF-\alpha$  و MCP-1 را بررسی نمودند. غلظت  $IL-1\beta, IL-6, IL-8, TNF-\alpha$  از روز صفر تا ۵ در نمونه‌های فیلتر نشده افزایش یافت. در نمونه‌های فیلتر شده فقط غلظت  $IL-8$  افزایش نشان داد که بیانگر عدم توانائی اشعه گاما در مهار تولید  $IL-8$  می‌باشد. در سال ۱۹۹۸، Hetland و همکاران (۱۰) غلظت،  $IL-8, TNF-\alpha$  و اجزا کمپلمان را در پلاکت‌های متراکم تهیه شده بروش بافی کوت بررسی نمودند. نتایج آنها نیز نشان داد که غلظت این سایتوکائینها و اجزا کمپلمان طی نگهداری افزایش می‌یابند. اما در نمونه‌های فیلترشده غلظت سایتوکائینها افزایش نمی‌یابد ولی فیلتراسیون اثری بر غلظت اجزا کمپلمان ندارد. در سال ۱۹۹۵، Aye و همکاران (۱۴) غلظت  $IL-1\beta, IL-8, IL-6, TNF-\alpha$  را در RD-PCs (تهیه شده بروش PRP) صاف شده و صاف نشده بررسی نمودند. نتایج آنها نشان داد که در نمونه‌های صاف نشده از روز صفر تا سوم غلظت  $IL-1\beta, IL-6, IL-8$  افزایش می‌یابد اما غلظت  $TNF-\alpha$  تغییر آشکاری را نشان نداد. پس از کاهش لکوسیت‌ها طی صاف کردن غلظت این سایتوکائینها تا روز ۵ افزایش نمی‌یابد. که از نظر عدم افزایش غلظت  $TNF-\alpha$  در نمونه‌های فیلتر نشده طی نگهداری برخلاف یافته مطالعه حاضر می‌باشد، نتایج ما نیز نشان دادند طی نگهداری پلاکتهای متراکم کم لکوسیت غلظت  $TNF-\alpha$  کاهش می‌یابد، عبارتی کاهش لکوسیت‌ها قبل از نگهداری مانع تولید و تجمع بیشتر این سایتوکائین شده است. و این امر احتمالاً بیانگر اثر فیلتراسیون در مهار افزایش این سایتوکائین طی نگهداری پلاکتهای متراکم می‌باشد.

در مطالعه حاضر نیز همانند گزارشات قبلی مبنی بر اختلاف بین دو روش سنجش ایمنی و سنجش زیستی برای اندازه‌گیری غلظت  $TNF-\alpha$  (۳)، بین این دو روش در تعیین غلظت این سایتوکائین اختلاف مشاهده گردید که دلایل مختلفی برای این امر مطرح شده است: سایتوکائینها برای ایجاد اثرات بیولوژیک خود باید به پذیرنده‌های اختصاصی سطح سلولهای هدف متصل شوند از آنجا که این پذیرنده‌ها بر روی انواع مختلفی از سلولها ظاهر میشوند لذا سایتوکائینها اثرات متنوعی بر سلولها دارند (۱۵). علاوه بر پذیرنده‌های

## منابع

1. Ojeda. Ojeda.M ,Silva CV , Arane.Rosainz.J et al: TNF alpha production in whole blood cultures from healthy individuals. *Biochem Biophys. Res.* 2002 , 249 (2): 538 – 49.
2. Roitt.M , Delves. P. J: Roitt's essential Immunology. 10 th edition , 2001 , Blackwell science Ltd- USA.
3. Remick .D.G. :Chapter 3: Protein analysis and bioassay of cytokines and cytokine receptors in book of: Rose. N.R ,Hamilton.RG , Detrick.B: Manual of clinical laboratory Immunology 2002 – ASM press.
4. Chritensen.L.L , Grunnet.N , Rudiger.N: Comparison of level cytokine mRNA in buffy coat –derived platelet concentrates prepared with or without white cell reduction by filtration. *Transfusion* ,1999 , 38: 236-41.
5. Jérôme Dellacasagrande, Christian Capo, Didier Raoult and Jean-Louis Mege: IFN- gamma - Mediated Control of Coxiella burnetii Survival in Monocytes: The Role of Cell Apoptosis and TNF *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 2259-2265.
۶. پایان نامه کارشناسی ارشد ایمونولوژی: بررسی غلظت TNF در ناسازگاریهای ABO و Rh در Vitro ، کامران کدخدا-۱۳۷۸- دانشگاه تربیت مدرس – دانشکده پزشکی.
7. Fujihara.M , Takahashi.T.A , Ogiso.C et al: Generation of Interleukin 8 in stored apheresis platelet concentrates and the preventive effect of prestorage ultraviolet B radiation. *Transfusion*. 1997, 37: 468- 75.
8. Muuelle.L , Peetermans.ME: Effects of pre-storage leukocyte removal on the cytokine levels in stored platelet concentrates .*Vox. Sang.* 1994 , 66: 14- 7.
9. Buuel.S , Whlhelm.D , Entelmann.M et al: Chemokines in stored platelet concentrates. *Transfusion*. 1996 , 36: 445- 9.
10. Hertland. G , Mollnes .TE , Bergh. K et al: Effect of filtration and storage of platelet concentrates on the production of the chemotaxis C5a , IL-8 , TNF- $\alpha$  and LTB4. *Transfusion*. 1998, 38: 16- 23.
11. Chritensen.L.L , Grunnet.N , Rudiger.N: Comparison of level cytokine mRNA in buffy coat –derived platelet concentrates prepared with or without white cell reduction by filtration. *Transfusion*, 1999 , 38: 236-41.
12. Flegel .C , Wiesneth.M , Stampe. D et al: Low Cytokine concentration in buffy coat- derived platelet concentrates. without filtration. *Transfusion*. 1995 , 35: 917 – 20.
13. Kluter.H, Muller-Steinhardt.M, Danzer. S et al: Cytokines in derived platelet concentrates prepared from pooled Buffy coats. *Vox.Sang.*1995 , 69: 38- 43.
14. Aye.M.T , Plamer.A, Giulivi.A et al. Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokine and platelet release factors during storage. *Transfusion*, 1995 , 33: 117-24.
15. Goldsby.RA, Kindt.T.J, Osborne.B.A: Kuby Immunology. 4 th edition 2000 ,W.H Freeman & CO , USA.
16. Fernandez-Botran R: Soluble receptors: Novel immunotherapeutic agents. *Exp.Opin. Iresting. Drugs.* 2000 , 9 (3): 497-514.
17. Mizia-Stec K ,Mandecia.T , Zahorska-Markiewicz B et al: Selected cytokine and soluble form of cytokine receptors in coronary disease. *Eur.J. Inter.Med* 2002 , 13 (2): 115- 22.
18. Viavainamt.F , Rigo. A, Tecchio.C: Serum levels of P55 and P75 soluble TNFR in adult acute leukemia at TNF diagnosis: correlation with clinical and biological features and outcome. *Br J Haematol.* 1998 Sep; 102 (4): 1025-34.
19. Kato.M , Hohori.T ,Kato.Y et al: Elevated soluble TNF receptor levels in seasonal allergic rhinitis patients. *Allergy* 1999 , 54 (3): 278–82.
20. Corti.A, Poiesi.C , Cassani.G: Tumor Necrosis Factor (TNF) alpha soluble TNF receptor(P 55) complex dissociation during assay incubation. *J.Immunol. Methods* 1994, 177 (1- 2): 191-8.