خالص سازي آنتي لنفوسيت گلوبولين (ALG) انسانی

جعفر مجيدي*[۱]، رسول استخری[۲]، حنيف جوانمرد خامنه[۱]، جلال عبدالعلي زاده[۱]، بهنام اكبرزاده[۲] و مريم بنازاده اميرخيز[۱]
[۱]مركز تحقيقات كاربردی دارويي، دانشگاه علوم پزشكی تبريز، [۲]دانشكده پزشكی، دانشگاه علوم پزشكی تبريز

تاريخ دريافت:۸۴/۴/۲۲، تاريخ پذيرش:۸۴/۶/۲۱

Purification of human antilymphocyte globulins

Majidi J.[1*], Estakhri R.[2], Javanmard Khamneh H.[1], Abdolalizadeh J.[1], Akbarzadeh B.[2], Bannazadeh Amirkhiz M.[1]
[1]Drug Applied Research Center, Tabriz university of Medical Sciences, [2]School of Medicine, Tabriz university of Medical Sciences

Received: 2005/7/13 , Accepted: 2005/9/12

OBJECTIVES: Anti-lymphocyte globulin (ALG) is a polyclonal anti human lymphocyte surface markers which is produced in rabbits. ALG is one of the potent immunosuppressive agents which is currently used for preventing organ allograft rejection, treatment of aplastic anemia and some autoimmune disorders. ALG causes elimination of human lymphocytes from the peripheral blood circulation, regulation of cytotoxic activities and apoptosis.The goal of this project was purification of ALG by a simple, rapid and inexpensive method, ion exchange chromatography. **METHODS:** ALG riched serum of immunized rabbit with human lymphocytes was diluted with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) in a ratio of 1:1 and precipitated with ammonium sulfate in the final concentration of 50%.The precipitant was rewashed with 50% ammonium sulfate, dialyzed against tris-phosphate pH=8.1 and applied to ion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose 6B.ALG riched fraction was eluted with starting buffer; Tris-Phosphate (pH=8.1) and final buffer; Tris-Phosphate containing 50 mM NaCl (pH=8.1). **RESULTS:** The purity of ALG with high percent purity was confirmed by SDS-PAGE, and efficiency of it by histocompatibility assay. **CONCLUSION:** This preparation is comparable in purity to those of commercially available standard ALG in the benefit of self sufficiency. The 1/80 dilution of purified ALG can lyse human lymphocytes properly in histocompatibility testing which verifies its high efficiency.

Key words: *ALG, Purification.*

زمينه و هدف: آنتي لنفوسيت گلوبولين (ALG) آنتي بادي پلي كلونال توليدشده در خرگوش است كه عليه ماركرهاي سطحي لنفوسيت هاي انسان بوجـود مـي آيـد. ALG يكي از عوامل سركوبگر ايمني است كه امروزه براي جلوگيري از وازنش اعضاء پيوندي، درمان آنمي آپلاستيک و برخی از اختلالات خود ايمنی بكار می رود. آنتي لنفوسيت گلوبولين منجر به حذف لنفوسيت هاي انسان از گردش خون محيطي، تنظيم فعاليت هاي سيتوتوكسيک و بروزمرگ برنامه ريزی شده سلولی در آنها مـي گـردد. هـدف ايـن مطالعه خالص سازی ALG با روش ساده، سريع و كم هزينه كروماتوگرافي تبادل يوني مي باشد. **روش ها:** سرم غنی از ALG خرگوش ايمون با لنفوسـيت هـاي انـسان بـه نسبت يک به يک با بافر فسفات نمكی با pH=۷/۴ رقيق شد و با آمونيم سولفات اشباع در غلظت نهائي ۵۰% رسوب داده شد. اين رسوب پس از شستشوي مجدد با سـولفات آمونيوم ۵۰% در برابر بافر تريس فسفات با pH=۸/۱ ديالیزگرديد و سپس به ستون تبادل يوني حاوي رزبن دي اتيل آمينواتيل سفاروز برده شد.فراكسيون غني از ALG ابتدا بـا استفاده از بافر تريس- فسفات با PH=۸/۱ و در نهايت با استفاده از بافر تريس- فسفات حاوی كلريد سديم ۵۰ mM تخليص و از ستون خارج گرديـد. **يافتـه هـا:** خلـوص ALG با درصد خلوص بالا با روش SDS-PAGE و كارآئي آن با تستهاي سازگاري نسجي به تاييد رسيد. **نتيجه گيري:** محصول توليدی از نظـر خلـوص بـاALG اسـتاندارد تجاری قابل مقايسه بوده و گامی در جهت خودكفايي می باشد. رفت يک هشتادم ALG خالص سازي شده، لنفوسيتهای انسانی را در قالب انجام تستهاي سازگاري نسجي بـه خوبي ليز می كند و اين امر مبين كارآيي بالای محصول توليدی است.

واژه هاي كليدي: *خالص سازی، آنتی لنفوسيت گلوبولين.*

*نويسنده مسئول: دكتر جعفر مجيدي، دانشيار ايمونولوژی، مركز تحقيقات كاربردی دارويي، دانشگاه علوم پزشكی تبريز
تلفن: ۳۳۶۴۶۶۵؛ نمابر: ۳۳۶۴۶۶۵

**Corresponding Author: Dr Jafar Majidi, Associate Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz university of Medical Sciences. Tel: ۳۳۶۴۶۶۵; Fax:۳۳۶۴۶۶۵ ;E-mail: majidij@tbzmed.ac.ir*

۱- مقدمه

لنفوسيت ها گروه مهمي از سلولهاي دفاعي بدن انسان مي باشند كه مسئول ويژگي و خاطره در پاسخهاي ايمني اكتسابي هستند. اين سلولها در ارگانهاي لنفاوي اوليه توليد و در بافتها و ارگانهاي لنفاوي ثانويه وظيفه شناسايي و پاسخ به آنتي ژنهاي بيگانه را بر عهده دارند. لنفوسيت ها به سه گروه اصلي شامل لنفوسيتهاي T، لنفوسيت هاي B و سلولهاي كشنده طبيعي تقسيم مي شوند (۱). آنتي لنفوسيت گلوبولين[۱] آنتي بادي پلي كلونال خرگوش از كلاس IgG است كه پس از ايمونيزاسيون حيوان با لنفوسيتهاي انساني تخليص شده، توسط سيستم ايمني بدن حيوان عليه لنفوسيتها توليد مي شود (۲).

آنتي لنفوسيت گلوبولين يک عامل سركوبگر ايمني[۲] است كه به طور گسترده، مستقلاً و يا در تركيب با عوامل سركوبگر ايمني ديگر براي جلوگيري از وازنش اعضاء پيوندي (۳) و پيوند مغز استخوان (۴)، درمان بيماري هائي مثل پيوند در مقابل ميزبان[۳] (۵)، آنمي آپلاستيک حاد و غير حاد (۶،۷)، برخي سرطانها (۸) و بيماريهاي خود ايمني (۹) بكار مي رود.

مكانيسم عمل ALG تاكنون بطور كامل شناخته نشده است. ولي ازمكانيسم هاي عمده اي كه اين آنتي بادي به واسطه آنها باعث سركوبايمني مي گردد مي توان به پاكسازي لنفوسيتها از گردش خون و تنظيم فعاليت، لانه گزيني و عملكردهاي سيتوتوكسيک آنها اشاره نمود. اين آنتي بادي همچنين قادر به سركوب فرآيند خونسازي از طريق تهاجم به رده هاي سلولي خونساز (۴) و نيز كاهش شديد نرخ بقاي پلاكتها مي باشد (۱۰). آنتي لنفوسيت گلوبولين به عنوان محرک ايمني قادر است توليد لنفوكاين ها و فاكتور رشد خونساز را تحت تاثير قرار داده و مستقيما پيش سازهاي خوني را تحريک نمايد (۴). ALG از طريق ليز وابسته به كمپلمان سلولهاي دندريتيک را تخريب نموده و از تحريک سلولهاي T بواسطه آنها جلوگيري مي نمايد (۱۱).

ALG حاوي آنتي بادي هاي سيتوتوكسيكي عليه برخي ماركرهاي سطحي لنفوسيت هاهمچون CD45، CD44، CD25، CD8، CD4، CD3، CD2، LFA-1، HLA-DR (۱۳ و ۱۲) و نيز CD28، CD18، CD5،CD11a و آنتي ژنهاي آلفا و بتاي گيرنده سلول T ميباشد (۱۴).

اين آنتي بادي با بيان ملكول Fas (Apo-1, CD95) مي تواند باعث بروز مرگ برنامه ريزي شده سلولي در سلولهاي T فعال شده بوسيله اينترلوكين ۲ گردد (۱۵). همچنين ALG اثري ضدتكثيري[۴] روي سلول هاي B دارد (۱۶). در اين مطالعه ALG خرگوش با روش كروماتوگرافي تبادل يوني كه روشي سريع، دقيق و نسبتاً كم هزينه است در آزمايشگاه ايمونولوژي مركز تحقيقات كاربردي-داروئي دانشگاه علوم پزشكي تبريز تخليص گرديد.

۲- مواد و روشها

۲-۱: نمونه سرمي

پس از خونگيري از قلب خرگوش ايمون در مقابل لنفوسيتهاي انسان، سرم آن جدا شده و با بافر نمكي فسفات (PBS, PH: 7.4) به نسبت ۱:۱ رقيق سازي شد.

۲-۲: رسوبدهي با سولفات آمونيوم

سرم بوسيله سولفات آمونيوم اشباع رسوب داده شد تا ايمونوگلوبولين هاي سرمي در غلظت نهايي ۵۰% رسوب نمايند. مخلوط به مدت ۲۰ دقيقه با ۲۰۰۰ دور در دقيقه[۵] سانتريفيوژ گرديد. سپس فراكسيون سرمي دو بار با سولفات آمونيوم ۵۰% شستشو داده شد. براي حذف نمک سولفات آمونيوم فراكسيون غني ازALG به مدت يک شب در برابر بافر نمكي فسفات (PH=۷/۴) ديالیز گرديد.

۲-۳: كروماتوگرافي تبادل يوني

فراكسيون سرمي غني از ALG با حجم تقريبي ۳ ميلي ليتر (۲۰ mg/ml) به ستون تبادل يوني حاوي رزين دي اتيل آمينواتيل سفاروز با سرعت بالا (فارماسيا) كه با بافر تريس- فسفات (PH=۸/۱) متعادل شده بود برده شد.

با عبور جريان بافر كار فراكسيون اول حاوي ALG، تخليص شده از ستون خارج گرديد. فراكسيون دوم نيز با اعمال غلظت پلكاني كلريد سديم تخليص و از ستون تخليه شد. به اين منظور از جريان بافر كار حاوي NaCl ۵۰۰mM استفاده گرديد.

۲-۴: سنجش ميزان غلظت پروتئين

جذب نوري (OD) نمونه هاي تخليص شده با طول موج ۲۸۰nm در دستگاه اسپكتروفتومتر قرائت شد و ميزان غلظت پروتئين تخليص شده در نمونه هاي با جذب بالاي ۰/۱ براي هر فراكسيون محاسبه گرديد (۱۷). اين نمونه ها با يكديگر مخلوط شده و پس از رسوبدهي با سولفات آمونيوم در دماي ۴°+ سانتيگراد نگهداري شدند.

۲-۵: الكتروفورز روي ژل پلي اكريلاميد در حضور سديم دودسيل سولفات[۶]

الكتروفورز پروتئين ها بر اساس روش Laemmli (۱۸) در حضور ۲- مركاپتواتانول انجام گرفت. به اين منظور از ژل پلي اكريلاميد ۱۲% استفاده شد. چهار حجم نمونه تخليص شده از هر فراكسيون به يک حجم از بافر نمونه (5x) افزوده شده و مخلوط به مدت ۵ دقيقه در دماي ۱۰۰ درجه سانتيگراد جوشانيده شد. به

۱- ALG
۲- Immunosuppressive agent
۳- GVHD
۴- Antiproliferative
۵- RPM
۶- Peak

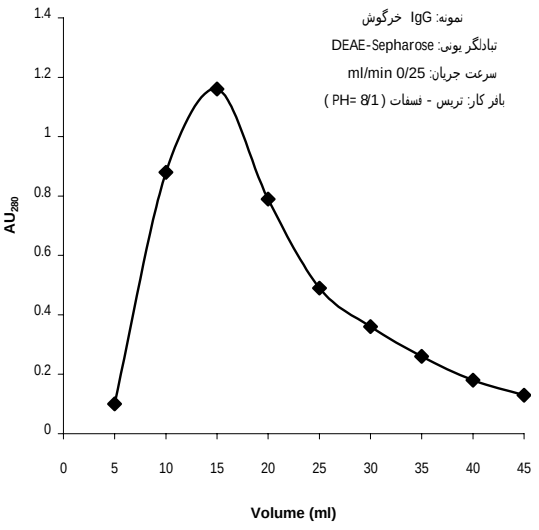
هريک از چاهک ها مقدار ۱۵ ميکروليتر از هر نمونه اضافه شد. به چاهک انتهائي نيز از مارکر وزن ملکولي با وزن کم (فارماسيا) افزوده شد. الکتروفورز در ولتاژ ثابت تا رسيدن نوار سرمه اي رنگ بروموفينول به انتهاي ژل ادامه يافت. سپس ژل با استفاده از رنگ آبي کوماسي G-250 (فارماسيا) رنگ آميزي شد.

۲-۶: تستهای سازگاری نسجی

اين تست بر اساس روش ميکروسيتوتوکسيسيتی انجام يافت. بدين ترتيب که به مقدار يک ميکروليتر از رقت های مختلف ALG تخليص شده همراه با ALG استاندارد به عنوان کنترل مثبت در چاهکهای پليت تراساکی ريخته شد. سپس يک ميکروليتر از لکوسيتهای جداسازی شده با فايکول (D =۱/۰۷۷) در هر چاهک افزوده گرديد و به مدت نيم ساعت تحت انکوباسيون بر روی شيکر قرار گرفت. سپس ۵ ميکروليتر از کمپلمان خرگوش به هر چاهک اضافه گشت و در نهايت ائوزين و فرمالين افزوده شد و ۲۴ ساعت بعد در زير ميکروسکوپ معکوس مورد مطالعه قرار گرفت.

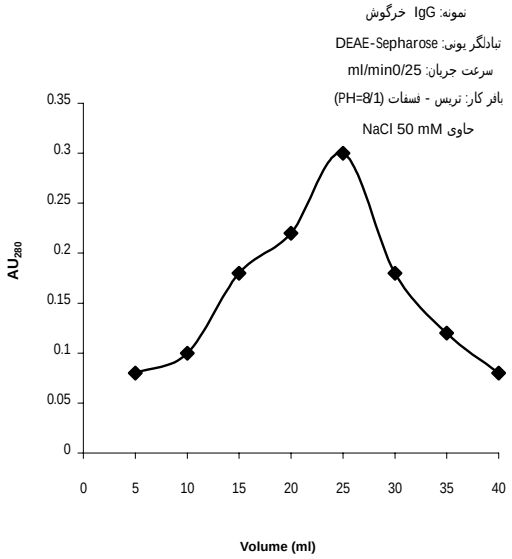
۳- نتايج

اعمال جريان بافر تريس- فسفات باعث تخليص و خروج حدود ۱۶ ميلي گرم ALG در قالب فراکسيون اول از ستون تبادل يوني گرديد. در اين مرحله يک قله (۲) پروتئيني مشاهده شد (شکل ۱).

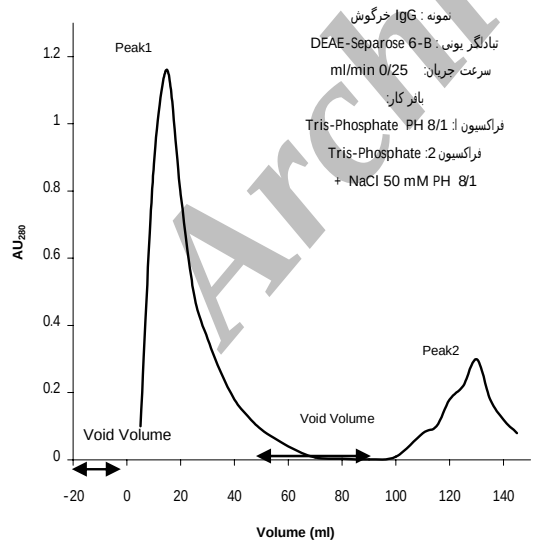


شکل ۱: منحني مربوط به جذب نمونه هاي فراکسيون اول

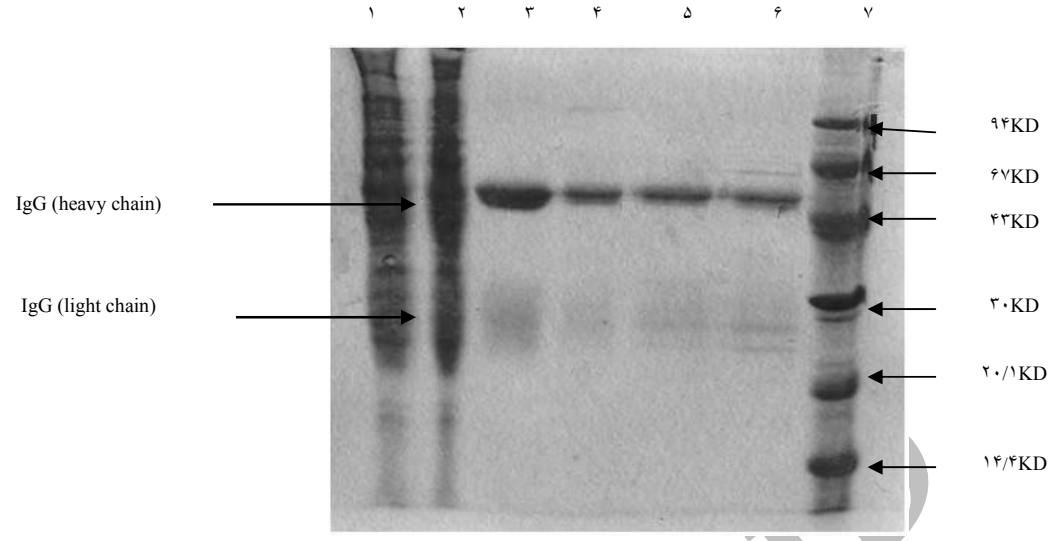
همچنين اعمال غلظت پلکاني کلريد سديم ۵۰ mM مقدار ۵ ميلي گرم ديگر از پروتئين تخليص شده را از ستون خارج نمود. (شکل ۲). لذا در مجموع حدوديک سوم مخلوط پروتئيني ناخالص برده شده به ستون يعني حدود ۲۱ ميلي گرم ALG تخليص شده از ستون خارج گرديد. در کل فرآيند تخليص دو قله قابل مشاهده بود. (شکل ۳)



شکل ۲: منحني مربوط به جذب نمونه هاي فراکسيون دوم



شکل ۳: منحني مربوط به کل فرايند خالص سازي روي ستون تبادل يوني و مقادير جذب نوري



بررسي الگوي الكتروفورز پروتئين در شرائط احيا نشان داد كه پروتئين تخليص شده عمدتاً شامل يک باند پلي پپتيدي مشخص در محدوده وزن ملكولي ۵۰ كيلو دالتن و يک باند منتشر در محدوده وزن هاي ملكولي ۲۰ الي ۳۰ كيلو دالتن است كه به ترتيب مربوط به زنجيره هاي سنگين و سبک IgG خرگوش مي باشند (شكل۴). الكتروفورز مخلوط پروتئيني پيش از انتقال به ستون تبادل يوني نيز (ستون ۱ و ۲) باندهاي پلي پپتيدي پراكنده مابين وزن هاي ملكولي بالا تا پائين را نشان مي دهد كه نشان دهنده وجود انواع پروتئين های سرمي و ناخالصي هاي ديگر در فراكسيون سرمي قبل از تخليص روي ستون مي باشد. تقريباً هيچگونه ناخالصي واضحي در شكل ديده نمي شود كه حاكي از خلوص بسيار بالاي ALG تخليص شده مي باشد.

همچنين خلوص و كارآئي آنتي لنفوسيت گلوبولين تخليص شده در تست هاي سازگاري نسجي از جمله تعيين نوع آنتی ژن های لكوسيتی انسان[۷] به عنوان كنترل مثبت و در مقايسه با ALG استاندارد به تاييد رسيد. به اين ترتيب كه رقت $\frac{1}{80}$ از ALG توليدی نشان داد كه همانند ALG استاندارد قادر به تشكيل كمپلكس ايمنی باآنتی ژنهای لكوسيتی و فعال نمودن كمپلمان خرگوش از راه كلاسيک و تشكيل كمپلكس حمله به غشاء می باشد.

۴- بحث

در مطالعه حاضر، آنتي بادي پلي كلونال خرگوش، ضد لنفوسيتهاي انسان (ALG) با روش كروماتوگرافي تبادل يوني روي ژل دی اتيل آمينو اتيل سفاروز 6B[۸] خالص سازي گرديد.

ALG ماهيتاً از جمله عوامل سركوبگر سيستم ايمني است كه سالها براي درمان آنمي آپلاستيک حاد، رد پيوند اعضا، بيماري پيوند عليه ميزبان، و برخي بيماري هاي خود ايمني بكار رفته است (۹-۳). در اين طرح تحقيقاتي پس از تخليص، پروتئيني با غلظت بالاي ۹۸% حاصل گرديد كه خلوص آن توسط روش SDS-PAGE به تأييد رسيد و ثابت شد كه پروتئين ۵۰ كيلو دالتوني تخليص شده آنتي لنفوسيت گلوبولين خرگوش با ماهيت IgG بوده است. همچنين كارآئي اين آنتي بادي به عنوان كنترل مثبت در مقايسه با ALG استاندارد در تستهاي سازگاري نسجي به تأييد رسيد. بدين صورت كه رقت $\frac{1}{80}$ از ALG توليدی همانند ALG استاندارد عمل نمود، يعنی توانايي تشكيل كمپلكس ايمنی و فعال نمودن كمپلمان خرگوش و در نهايت ايجاد كمپلكس تهاجم غشايي را دارا بود. چرا كه چاهک مربوط به ALG توليدی در زير ميكروسكوپ معكوس دقيقاً همانند چاهک مربوط به كنترل مثبت يعنی ALG استاندارد مشاهده گرديد.

نتايج بدست آمده همانند تجربيات ديگران حاكي از آن است كه روش كروماتوگرافي تبادل يوني كه اساس آن اتصال برگشت پذير ملكولهاي باردار محلول به گروه هاي ثابت تبادلگر يوني با بار مخالف است، روشي مناسب براي تخليص آنتي بادي هاي با ماهيت IgG است (۱۹). اين روش در مقايسه با برخي از روشهاي ديگر همچون كروماتوگرافي گرايشي روي پروتئين A و پروتئين G، و ژل فيلتراسيون آسان و كم هزينه مي باشد.

همچنين نتايج مؤيد يافته هاي پيشين مبني بر كارآيي بيشتر ستونهاي كم ارتفاع و با قطر زياد براي روش كروماتوگرافی تعويض يونی[۹] ميباشد (۲۱).

۷- HLA-Typing
۸- DEAE- Sepharose-6B

۹- Ion Exchange Chromatography (IEX)

خالص سازي روي تبادلگر آنيونيدي اتيل آمينو اتيل سفاروز با سرعت بالا انجام شد كه به نظر ميرسد اين تبادلگرها با توجه به ساختار آگاروزي و اتّصالات عرضي موجود در آن و همچنين محدوده وسيع PH عملكردي (۲ الي ۹)، براي استفاده در ستون تبادل يوني بسيار مناسب هستند. اين تبادلگر جذب غيراختصاصي بسيار ضعيفي داشته و آلودگي هاي ميكروبي در آن ملاحظه نشد. همچنين پايداري شيميائي و فيزيكي اين ژل را كانديد مناسبي براي استفاده در امر خالص سازي نمود. (۲۰)

از سوي ديگر يافته ها نشان داد اعمال غلظت پلكاني كلريد سديم در محدوده اي بين صفر تا صد ميلي مولار قادرست حجم قابل توجهي از پروتئين خارج نشده از ستون طي شرايط اوليه را تخليص و تخليه نمايد. در جريان اين عمل با تغيير قواي يوني بافر تريس – فسفات در PH ثابت (كه بطور معمول ۰/۵ تا ۱ واحد بالاتر از نقطه ايزوالكتريک IgG در نظر گرفته مي شود و در جريان كار روي ۸/۱ تثبيت شد) باعث گسسته شدن بسياري از اندركنشهاي موقّتي بين يونهاي با بار مخالف شده و آنچنان كه در مورد فراكسيون دوم با اعمال غلظت پلكاني كلريد سديم ۵۰mM مشاهده شد، بخش ديگري از IgG را از ستون تخليه مينمايد. به اين ترتيب مي توان گفت در مقايسه با روش پيچيده و پر هزينه اعمال شيب pH، روش اعمال غلظت پلكاني نمک ساده تر و سريعتر می باشد. (البتّه اين نكته هنگامي صادق است كه مراحل مختلف خالص سازي منجمله رسوبدهي، آماده سازي نمونه و خالص سازي روي ستون تبادل يوني با دقّت كامل انجام گيرند). استفاده از بافر تريس – فسفات به عنوان بافر كار در اين تحقيق نتايج مناسبي را در پي داشت و با توجه به اينكه PH اين بافر در محدوده PH عملكردي دی اتيل آمينو اتيل سفاروز واقع است، استفاده از اين بافر همراه با ژل مزبور براي تخليص موقّق IgG و حصول درجات خلوص بالا پيشنهاد مي شود. تنظيم سرعت جريان تقريبي ستون روي ۰/۲۵ml/min امكان خالص سازي سريع و دقيق حجم ۳ ميلي ليتري نمونه سرمي را در مدت زمان مناسب فراهم نمود، ضمن اينكه اخلالي در خلوص محصول نهائي ايجاد ننمود.

شايان ذكر است، خالص سازي اوليه و مقدماتي سرم حاوي ALG از طريق رسوبدهي با سولفات آمونيوم ۵۰% و ديالیز فراكسيون نمكي در برابر بافر فسفات كمک شاياني به حذف ناخالصيهاي عمده، پيش از انجام خالص سازي اصلي روي ستون تبادل يوني، نمود.

به نظر ميرسد تيمار مقدماتي[۱۰] نمونه سرمي خرگوش به نوبه خود درصد خلوص نمونه را افزايش ميدهد و در همراهي با مراحل بعدي شامل خالص سازي روي ستون تبادل يوني دی اتيل آمينو اتيل سفاروز و اعمال غلظت پلكاني كلريد سديم، يک فرآيند جامع خالص سازي موقّق را شكل ميدهند كه محصول نهائي آن ايمونوگلوبولينی با درصد خلوص بالا است (۱۹). بعلاوه نتايج نشان مي دهند خالص سازي مقدماتي مناسب و نيز تخليص با كيفيت و دقيق فراكسيون نخست، نياز به اعمال غلظت پلكاني در مراحل متعدد و با غلظتهاي متفاوت را مرتفع مي سازد. ALG تخليص شده براي استفاده به عنوان كنترل مثبت در تستهاي سازگاري نسجي همچون تعيين نوع آنی ژنهای لكوسيتی انسان و كاربردهاي مطالعاتي، تحقيقاتي و آزمايشگاهي ديگر مناسب و كارآمد بوده و مي توان از روش مورد استفاده در انجام اين تحقيق براي تخليص ALG با خلوص بالا، صرف هزينه كمتر و زمان كوتاه تر به جاي تحميل هزينه هاي گزاف به مراكز تحقيقاتي و درماني براي خريد نمونه هاي مشابه خارجي با قيمت هاي كلان، بهره گرفت (با لحاظ اين نكته كه ALG توليدي در مقايسه با مشابه خارجي كيفيت و كارآئي بالا و قابل قبولي دارد).

در نهايت پيشنهاد مي شود مراحل نهائي تخليص و پاستوريزاسيون در آينده روي محصولات ALG توليدي انجام گيرد تا امكان توليد فرآورده داروئي آنتي لنفوسيت گلوبولين در داخل كشور فراهم گردد. همچنين پيشنهاد مي شود مكانيسم عمل ALG كه تا بحال بطور قطعي شناخته نشده است در تحقيقات بعدي روي ALG در سطوح سلولي و ملكولي مورد مطالعه و بررسي قرار گيرد.

۱۰- Pretreatment

5- References:

1. Lydyard P., Whelan A. Fanger M.W. Immunology-Instant Notes. 2nd ed., BIOS Scientific Pub, Guildford, UK: 2004, 41-46.
2. Konomi K., Deodhar S.D. Preparation and purification of horse antihuman lymphocyte globulin (ALG). Cleve Clin Q. 1968, Oct, 35 (4): 199-205.
3. Di Filippo S. Anti-IL-2 receptor antibody vs. polyclonal anti-lymphocyte antibody as induction therapy in pediatric transplantation. Pediatr Transplant. 2005, Jun, 9 (3) 373-80.
4. Marsh J.C., Gordon-Smith E.C. The role of antilymphocyte globulin in the treatment of chronic acquired bone marrow failure. Blood Rev. 1988, Sep; 2 (3): 141-8.
5. Bacigalupo A. Antilymphocyte/thymocyte globulin for graft versus host disease prophylaxis: efficacy and side effects. Bone Marrow Transplant. 2005, Feb, 35 (3): 225-31.
6. Leong K.W., Teh A., Bosco J.J., Jayaranee S., Sadat U. Anti-lymphocyte globulin therapy in aplastic anaemia--a university hospital experience. Med J Malaysia. 1995, Jun, 50 (2): 158-61.
7. Locasciulli A., Bruno B., Rambaldi A., et al. Treatment of severe aplastic anemia with antilymphocyte globulin, cyclosporine and two different granulocyte colony-stimulating factor regimens: a GITMO prospective randomized study. Haematologica. Sep, 89 (9): 1054-61.
8. Aivado M., Rong A., Stadler M., et al. Favorable response to antithymocyte or antilymphocyte in low-risk myelodysplastic syndrome patients with a 'non-clonal'pattern of X-chromosome inactivation in bone marrow cells. Eur J Haematol. 2002, Apr (4): 210-6.
9. Abdulkadyrov K.M., Bessmel'tsev S.S. Immunological and rheological parallels in patients with autoimmune thrombocytopenic purpura treated with antilymphocyte globulin. Klin Med (Mosk). 1990, Jun, 68 (6): 49-53.
10. Gratama J.W., Brand A., Jansen J., et al. Factors influencing platelet survival during antilymphocyte globulin treatment. Br J Haematol. 1984, May, 57 (1): 5-15.
11. Monti P., Allavena P., Di Carlo V., Piemonti L. Effects of anti-lymphocytes and anti-thymocytes globulin on human dendritic cells. Int Immunopharmacol. 2003, Feb, 3 (2): 189-96.
12. Bourdage J.S., Hamlin D.M. Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. Transplantation. 1995, Apr, 27, 59 (8): 1194-200.
13. Raefsky E.L., Gascon P., Gratwohl A., et al. Biological and immunological characterization of ATG and ALG. Blood. 1986, 68 (3): 712-719.
14. Bonnefoy-Berard, N., Vincent, C., Revillard, J.P. Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. Transplantation, 1991, 51 (3): 669-673.
15. Genestier L., et al. Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antilymphocyte globulins. 1998., Blood. 91 (7): 2360-2368.
16. Bonnefoy-Berard N., Flacher M., Revillard, J.P. Antiproliferative effect of anti-lymphocyte globulins on B-cells and B-cell lines. Blood. Vol. 79, 1992, No 8, 2164-2170.
17. Delves P.J. Measuring antibody concentration by UV adsorbence in: Antibody application, essential techniques series. Wiley.N.Y., 1995, 16-17.
18. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970, 227: 680-685.
19. Stec J., Bicka L., Kuzmak J. Isolation and purification of polyclonal IgG antibodies from bovine serum by high performance liquid chromatography. Bull Vet Inst Pulawy. 2004, 48: 321-327.
20. Amersham pharmacia biotech. Ion Exchange Chromatography, Principles & Methods.
۲۱. داودي نژاد كوروش.۱۳۷۶. بررسي پارامترهاي مؤثّر در كروماتوگرافي تعويض يوني آنزيم آلفا آميلاز. پايان نامه كارشناسي ارشد (بيوشيمي). دانشكده مهندسي شيمي، دانشگاه علم و صنعت ايران.