مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۳، شماره ۴، صفحات ۳۳۱ تا ۳۳۶، (۱۳۸۴)

مقایسه تعیین مقدار TNF-α 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 ایمونولوژی
**دانشگاه تربیت مدرس، بخش هماتولوژی و سازمان انتقال خون ایران
*** کارشناس ارشد ایمونولوژی – دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده پزشکی
****آمار حیاتی و اپیدمیولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی

چکیده

مقدمه: عامل نکروز دهنده تومور (TNF-α) یک واسطه التهابی مهم در پاسخ‌های التهابی است و در بروز واکنشهای غیر همولیتیک تب زا (**F**ebrile **N**on-**H**eamolytic **T**ransfusion **R**eactions = FNHTRs) پس از تزریق پلاکتهای متراکم نقش ایفا میکند. تصور میشود لکوسیتهای باقیمانده منبع ابن سایتوکائین هستند لذا غیرفعال کردن یا کاهش تعداد آنها در کاهش این سایتوکائین مؤثر میباشند. با توجه به اختلاف روشهای متعدد اندازه گیری TNF-α ، هدف این مطالعه مقایسه تعیین TNF-α در مایع روئی پلاکتهای متراکم (**P**latelet **C**oncentrates = PCs) به دو روش Immunoassay (سنجش ایمنی) و Bioassay (سنجش زیستی) میباشد.

مواد وروشها: غلظت TNF-α با دو روش ELISA(سنجش ایمنی) و تجزیه سلولی (Cell Lysis) رده L929 (سنجش زیستی) در مایع روئی پلاکتهای متراکم تهیه شده بروش پلاسمای غنی از پلاکت ((Pletelet Rich Plasma =PRP از اهداکننده منفرد اندازه گیری شد. پلاکتهای متراکم در ٤ گروه تقسیم شدند :

۱- پلاکتهای متراکم صاف نشده (un flitered) و اشعه ندیده (n= ۱۳)
۲- پلاکتهای متراکم صاف نشده و اشعه دیده یا γ-irradiated (n= ۱٦)
۳- پلاکتهای متراکم صاف شده و اشعه ندیده (n= ۱٤)
٤- پلاکتهای متراکم صاف شده و اشعه دیده (n= ۱۱)

یافته‌ها: مقدار TNF-α اندازه گیری 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 نمیباشد. در مقایسه با نمونه‌های صاف نشده ، تابش اشعه و عبور از صافی (filtration) قبل از دوره نگهداری ، از افزایش TNF-α در روز سوم جلوگیری میکنند. ارتباطی بین اندازه گیری غلظت TNF-α به دو روش ELISA و سنجش زیستی وجود ندارد.

نتیجه گیری و توصیه ها: قبلا نیز گزارش شده است که در صورت اندازه گیری TNF-α در مایعات بیولوژیک بوسیله سنجش ایمنی و سنجش زیستی نتایج کمی مختلفی حاصل میشود. تصور میشود این اختلاف به حضور اشکال آنتی ژنیک مختلف (نظیرشکل مونومر یا مجموعه TNF-α با پذیرنده‌های محلول) مربوط میباشد که بوسیله سنجش زیستی غیرقابل تشخیص هستند.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

TNF-α 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 B و T ، 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 وخاصیت ضد ویروسی میباشد (۲). فعالیت بیولوژیک کلاسیک TNF-α القا تجزیه یا تخریب سلولهای هدف است. روشهای مختلفی برای اندازه گیری TNF-α وجود دارد که از نظر حساسیت و اختصاصیت با هم تفاوت دارند ، این روشها شامل Immunoassay (سنجش ایمنی) و Bioassay (سنجش زیستی) هستند. اندازه گیری TNF-α با روشهای ELISA و RIA از نوع سنجشهای ایمنی میباشند. برای سنجش زیستی ، از رده سلولی فیبروسارکومای موش (L929) که نسبت به TNF-α حساس است استفاده میشود. برای اندازه گیری مقادیر اندک TNF-α در مایعات بیولوژیک از ردههای سلولی بسیارحساستر WEHI164 استفاده میشود. نتایج حاصله از اندازه گیری TNF-α درمایعات بیولوژیک به دوروش سنجش ایمنی وسنجش زیستی متفاوت میباشند (۳). لذا در این مطالعه دو روش فوق جهت بررسی غلظت TNF-α در پلاسمای فوقانی بدست آمده از پلاکتهای متراکم (در روزهای صفر و سوم نگهداری) تهیه شده به روش PRP[1] یا پلاسمای غنی از پلاکت که برخی از واحدهای مذکور تحت شرایط تابش اشعه و یا کاهش لکوسیت قرار گرفتهاند ، با یکدیگر مقایسه شدند.

مواد و روشها

تعداد ٥٤ واحد پلاکت متراکم بروش PRP (٤) از خون کامل تهیه شده و بصورت تصادفی به ٤ 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 (γ-irradiated) (تعداد ١٦ واحد)

۳- پلاکتهای متراکم صاف شده و اشعه ندیده (تعداد ١٤ واحد)

٤ - پلاکتهای متراکم صاف شده و اشعه دیده (تعداد 11 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 شرکتPall (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 وسپس در زیر هود منافذ ورودی و خروجی کیسه حاوی پلاکتهای متراکم و کیسه صافی دار بیکدیگر متصل و سپس با آویزان کردن بر اثر جاذبه عمل صاف کردن تسهیل میشود .تحت شرایط استریل از پلاسمای روئی پلاکتهای متراکم ml ۱۰ 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 g ۱۰۰۰ 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

[1] در روش PRP (Platelet Rich Plasma) , براي جداسازي پلاكتها ابتدا خون كامل را در دور پائين با نيروي جاذبه (g)كم, معمولاً g ۲۲۰۰ بمدت ۳-٤ دقيقه , سانتريفوژ كرده كه پلاسماي غني از پلاكت به راحتي از گلبولها قرمز جدا مي‌شوند. سپس PRP با نيروي جاذبه زيادتر و سرعت بالاتر , معمولا g ٤۰۰۰ بمدت ٥ دقيقه, مجدداً سانتريفوژ شده كه حاصل آن پلاكتهاي متراكم و پلاسماي كم پلاكت مي‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

لامNegeotte استفاده شد که حساسیت آن 0.1 WBC/ 1 µl تخمین زده شده است .شمارش گلبولها و کنترل PH در روزهای صفر و ۳ (و در مورد نمونه‌های صاف شده پس از فیلتراسیون شمارش سلو لی مجدداً) انجام گردید.

جهت اندازه گیری غلظت TNF-α ازکیت ELISA ۱۹۲تستی محصول(USA) Bio Source International (کمترین مقدار قابل ردیابی pg/ml ۱/۷) استفاده شد.

برای سنجش فعالیت بیولوژیکTNF-α به روش Bioassay از خاصیت تخریب سلولی آن استفاده میشود (۵و ٦) و روش بطور خلاصه شامل مراحل زیر میباشد: در شرایط استریل تعداد ۱۰۵ × ۵ –۱ از فیبروبلاستهای رده L929 در محیط کشت RPMI-1640حاوی ۱۰ ٪ FCS و ال–گلوتامین و مخلوط استرپتومایسین و پنی سیلین(که همگی از محصولات GIBCOBRL می‌باشند) را به حفرات پلیت ته صاف ۹٦ خانه Nunc افزوده وسپس ۵۰ میکرولیتر از مایع روئی پلاکتی و ۵۰ میکرولیتر از محلول ٤ میکروگرم/ میلی‌لیتر اکتینومایسین– D Cosmegen Lyovac) به حفرات ضافه کرده و بمدت ۱۸ ساعت درمحیط مرطوب با دمای ۳۷ درجه و فشار ۵ ٪ CO2کشت می‌دهیم. پس از این مدت مایع روئیی 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 ٦۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و نتایج بصورت U/ml گزارش می‌شوند. U 1 مقداری از TNF-α است که باعث القا ۵۰ ٪ تخریب سلولی می‌شود (٦،۵).

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

یافته‌ها

میانگین غلظت TNF-α بین روز صفر، روز تهیه ، (۱۵/٤٤ Pg/ml) و روز سوم (۲٤/۰٦ Pg/ml) در گروه اول (با P=0.021) طی نگهداری افزایش معناداری را نشان میدهد. در سایر گروهها میانگین غلظت TNF-α در روز سوم از روز صفر کمتر است که این کاهش درگروههای دوم ، سوم وچهارم (بترتیب با P = 0.011 ، P = 0.04 و P = 0.037) معنی دار میباشد ، بعبارتی در پلاکتهای متراکم صاف شده و اشعه دیده غلظت TNF-α طی نگهداری نه تنها افزایش نمی یابد بلکه بصورت معنی داری کاهش نیز نشان میدهد .

بررسی فعالیت بیولوژیک TNF-α نشان داد میانگین غلظتTNF-α (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) ، بعبارتی فعالیت بیولوژیک TNF-α در روز سوم فقط در گروه سوم بصورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. میانگین و انحراف معیار غلظت TNF-α (در روزهای صفر و ۳) در گروههای مختلف به دو روش فوق الذکر در جدول شماره ۱و اشکال ۱ و ۲ نشان داده شده اند. بررسی آماری اطلاعات ما نشان داد که نتایج حاصله از اندازه گیری غلظتTNF-α 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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

گروهها	سنجش زیستی (U/ml) TNF روز صفر	سنجش زیستی (U/ml) TNF روز سوم	P Value	سنجش ایمنی (p g /ml) TNF روز صفر	سنجش ایمنی (p g /ml) TNF روز سوم	P Value
گروه اول	۱۵/٤٤	۲٤/۰٦		٥٦۹/۹	٤٤۹/۳	
میانگین ± SE	±٥/۳۲	±۱۱/۰٤	۰/۰۲۱	±۹٤۸/۷	±۷۱۹/۷	۰/٥۱
حداقل- حداکثر	۱۲-۳۲	۹- ٤٤/۸		۸۰- ۲٥٦۰	۸۰- ۲٥٦۰	
N = ۱۳						
گروه دوم	۳۳/۱	۲٤/۳۹		۲۱٥	۲٥٦	
میانگین ± SE	±۱۱/۹۹	± ۱۰/۱۱	۰/۰۱۱	± ۱۸۸/۷	± ۷۰۳/٤	۰/٤٤
حداقل- حداکثر	۸/٤ -٤٦	۱۰/٥- ۳۸		۸۰ - ۳۲۰	۸۰ - ۱۲۸۰	
N = ۱٦						
گروه سوم	۳٥/۲۷	۳۲/۱۸		٤۳٤/۳	۱٤۹/۹	
میانگین ± SE	±٦/۸۲	± ۷/٥۹	۰/۰۳۷	±٤۲۹/۹	±۱٥۷/٥	۰/۰۱٤
حداقل- حداکثر	۱٥-٤۲/ ۳	۱٥/۳-٤۰/۲		۸۰ - ۱۲۸۰	۸۰ - ٦٤۰	
N = ۱٤						
گروه چهارم	۳۲/۹۲	۲۸/۷		۲٦۹/۱	۱٦۲/۳	
میانگین ± SE	±٦/٤۸	± ۹/۳۳	۰/۰٤	± ۳٥۱/۱	± ۱۷۳/۳	۰/٤۱
حداقل- حداکثر	۱۸/٥-۳۹/٥	۱٤/۷-٤۰/۸		۸۰ - ۱۲۸۰	۸۰ - ٦٤۰	
N = ۱۱						

بحث

یافته‌های ما نشان دادند در حالیکه نتایج اندازه گیری غلظتTNF-α بروش 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-α در گروههای اول ، دوم و چهارم طی نگهداری از روز صفر تا سوم تغییری نمی یابد و فقط در گروه سوم کاهش معنی داری نشان میدهدکه درهمین گروه نتیجه آزمایش به روش ELISA نیز بیانگر کاهش معنی‌داری می‌باشد. اما در بین نتایج دو روش فوق در کلیه گروه‌ها ارتباط معناداری مشاهده نمی‌شود.

تحقیقات مختلفی بیانگر افزایش غلظت IL-1β،IL-1 IL-8،6 و TNF-α طی نگهداری (Storage) پلاکت‌های متراکم می‌باشند (۱۰-۷). تصور میگردد تجمع سایتوکائینها در 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 (۱۰ ، ۹). در پلاکتهای متراکم با تعداد لکوسیت کمتر از $۰/۱ \times ۱۰^{۹}$ نمی‌توان سایتوکائینها را ردیابی نمود (۱۳-۱۱). نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که غلظت TNF- α طی نگهداری پلاکتهای متراکم تهیه شده بروش PRP درنمونه‌های اشعه ندیده افزایش ودر نمونه‌های تحت تابش اشعه و یا صاف شده کاهش میابد که از این نظر موید مطالعات مشابه قبلی می‌باشد (۱۰-۷). در سال ۱۹۹۷ ، Fujihara و همکاران (۷) پلاکت‌های متراکم تهیه شده بروش آفرزیس را به سه بخش تقسیم و آنها را تحت تالش اشعه گاما ، UV و صاف کردن (با استفاده از صافی PXL-8 محصول Pall) قرارداده و غلظت

Archive of SID
www.SID.ir

IL-1β،IL-6،IL-8 ، TNF-α و MCP-1 را بررسی نمودند. غلظت IL-1β،IL-6،IL-8 و TNF-α از روز صفر تا ۵ در نمونه‌های فیلتر نشده افزایش یافت. در نمونه‌های فیلتر شده فقط غلظت IL-8 اقزایش 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-α 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 برغلظت اجزا کمپلمان ندارد. در سال ۱۹۹۵ ، Aye و همکاران (۱٤) غلظت IL-1β،IL-8،6 و TNF-α 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-1β,IL-6,IL-8 افزایش میابد اما غلظت TNF-α 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-α در نمونه‌های فیلتر نشده طی نگهداری برخلاف یافته مطالعه حاضر می‌باشد، نتایج ما نیز نشان دادند طی نگهداری پلاکتهای متراکم کم لکوسیت غلظت TNF-α کاهش می‌یابد، بعبارتی کاهش لکوسیت‌ها قبل از نگهداری مانع تولید و تجمع بیشتر این سایتوکائین شده است. و این امراحتمالاً بیانگر اثر فیلتراسیون در مهار افزایش این سایتو کائین طی نگهداری پلاکتهای متراکم می‌باشد.

در مطالعه حاضر نیز همانند گزارشات قبلی مبنی بر اختلاف بین دو روش سنجش ایمنی و سنجش زیستی برای اندازه گیری غلظت TNF-α (۳) ، بین این دو روش در تعیین غلظت این سایتوکائین اخنلاف 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 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 (۱٦). اشکال محلول پذیرنده‌های TNF-α (sTNFR) شامل TNFR1(P55) و TNFR2(P75) میباشند (۱۹-۱۷). با استفاده از کیتهای ELISA علاوه بر سایتوکائینهای آزاد ، سایتوکائینهای متصل به پذیرنده‌های محلول نیز ردیابی میشوند. بعبارتی سایتوکائینهائی که از نظر بیولوژیکی غیرفعالند ، یا قطعات آنها نیز ممکن است در سنجشهای ایمنی ردیابی شوند. (۲۰). تصور میشود اختلاف بدست آمده بین نتایج اندازه گیری غلظت TNF-α در مایعات بیولوژیک به دو روش سنجش ایمنی و سنجش زیستی به حضور اشکال آنتی ژنیک TNF-α ، که با روش سنجش زیستی قابل اندازه گیری نیستند ، مربوط است. این اشکال شامل مجموعه‌های تشکیل شده با پذیرنده‌های محلول یا مونومرهای TNF-α میباشند. بهمین دلایل سنجش زیستی برای غربالگری مناسب نمیباشد. (۸).

بطور خلاصه یافته‌های این تحقیق نشان دادند در مدت نگهداری پلاکتهای متراکم غلظتTNF-α افزایش می‌یابد اما تابش اشعه گاما و یا کاهش گلبول‌های سفید مانع تجمع این سایتوکائین میگردد اما فعالیت بیولوژیک TNF-α 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 .

Archive of SID

www.SID.ir

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.

٦. 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. Buoel.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-α 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: Souluble 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 disociation during assay incubation. J.Immunol. Methods 1994, 177 (1- 2): 191-8.

Archive of SID
www.SID.ir