

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دوره ۲۸ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۵ صفحات ۹۶-۹۱

## تولید و خالص سازی آنتی بادی های پلی کلونال ضد لنفوسیت های انسان (ALG)

دکتر جعفر مجیدی: دانشیار ایمنولوژی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

E-mail: majidij@tbzmed.ac.ir

جلال عبدالعلی زاده: کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز  
مریم بنازاده امیرخیز: کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز  
حنیف جوانمرد خامنه: کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز  
بابک بیاض: تکنسین آزمایشگاه، بیمارستان امام، آزمایشگاه ایمنولوژی اختصاصی دانشگاه علوم پزشکی تبریز  
فاطمه حمزوی: تکنسین آزمایشگاه، بیمارستان امام، آزمایشگاه ایمنولوژی اختصاصی دانشگاه علوم پزشکی تبریز  
سعیده مجیدی: دانشجوی پزشکی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۴/۷/۱۲، پذیرش: ۸۴/۱۲/۲۳

### چکیده

**زمینه و اهداف:** آنتی لنفوسیت گلوبولین (ALG)، آنتی بادی پلی کلونال تولید شده در حیوانات مختلف از جمله خرگوش است که علیه مارکرهای سطحی لنفوسیت های انسان بوجود می آید. ALG یکی از عوامل سرکوبگر ایمنی است که در موارد بسیاری، از جمله برای جلوگیری از واژنش اعضا پیوندی و خصوصاً درمان بیماری آنمی آپلاستیک بکار رفته است. این آنتی بادی منجر به حذف لنفوسیت های انسان از گردش خون محیطی، تنظیم فعالیت های سیتوتوکسیک و بروز مرگ برنامه ریزی شده سلولی در آنها می گردد. هدف از مطالعه حاضر تولید ALG در داخل کشور می باشد.

**روش بررسی:** در این مطالعه ابتدا لنفوسیت های ۲۰ فرد سالم با استفاده از فایکول - های پاک جداسازی گردیده و با یکدیگر مخلوط شدند. حدود  $4 \times 10^9$  لنفوسیت به عنوان ایمنوژن از طریق رگ مارژینال (حاشیه ای) به خرگوش تزریق گردید. پس از تولید ALG به دنبال ایمنوآسیون های مکرر نسبت به خالص سازی آن با استفاده از روش کروماتوگرافی تبادل یونی که روشی ساده، نسبتاً سریع و کم هزینه می باشد اقدام شد. سرم خرگوش ایمنون با لنفوسیت های انسان، با آمونیم سولفات رسوب داده شد. رسوب غنی از ایمنوگلوبولین (ALG) پس از شستشوی مجدد با سولفات آمونیوم و دیالیز در برابر بافر نمکی فسفات به ستون تبادل یونی حاوی رزین دی اتیل آمینواتیل سفاروز برده شد. فراکسیون غنی از ALG طی مرحله نخست با عبور جریان بافر تریس - فسفات از ستون خارج گردید. فراکسیون دوم، حاوی باقیمانده ALG نیز با اعمال غلظت پلکانی کلرید سدیم از ستون تخلیص و خارج گردید.

**یافته ها:** کارائی رقت  $\frac{1}{40}$  از ALG تولید شده در مقایسه با ALG استاندارد، در قالب انجام تستهای سازگاری نسجی اثبات گردید. همچنین خلوص ALG تخلیص شده با روش SDS-PAGE در شرایط احیا به تایید رسید.

**نتیجه گیری:** با توجه به اینکه ALG تولید شده در رقت یک چهلم نیز همانند ALG استاندارد عمل می کند لذا می توان از آن به عنوان کنترل مثبت در انجام تستهای سازگاری نسجی به گستردگی استفاده نمود که این امر از لحاظ اقتصادی بسیار مقرون به صرفه و گامی در جهت خودکفایی کشور در زمینه تولید این محصول تلقی می گردد. بعلاوه از ALG خالص سازی شده می توان به عنوان داروی مهار کننده ایمنی استفاده نمود.

**کلید واژه ها:** تولید، خالص سازی، آنتی لنفوسیت گلوبولین (ALG)

### مقدمه

لنفوسیت ها از مهمترین سلولهای دفاعی سیستم ایمنی بدن انسان می باشند که مسئول ویژگی و خاطره در پاسخهای ایمنی اکتسابی هستند. این سلولها در ارگانهای لنفاوی اولیه تولید و در بافتها و ارگانهای لنفاوی ثانویه و وظیفه شناسایی و پاسخ به آنتی ژنهای بیگانه را بر عهده دارند. لنفوسیت ها به سه گروه اصلی شامل لنفوسیت های T، لنفوسیت های B و سلولهای کشنده طبیعی تقسیم می شوند (۱). در مطالعه حاضر آنتی لنفوسیت گلوبولین آنتی بادی پلی کلونال تولید شده در بدن خرگوش بر ضد لنفوسیت های انسان می باشد. این آنتی بادی از کلاس IgG بوده و برای تولید آن، حیوان توسط لنفوسیت های انسانی تخلیص شده ایمن سازی می گردد (۲). آنتی لنفوسیت گلوبولین (ALG) از

جمله عوامل سرکوبگر ایمنی است که از دهه ۱۹۶۰ تا کنون به طور گسترده، مستقلاً و یا در ترکیب با عوامل سرکوبگر ایمنی<sup>۱</sup> دیگر برای جلوگیری از واژنش اعضا پیوندی (۳) و پیوند مغز استخوان (۴)، درمان بیماری هائی مثل پیوند علیه میزبان (۵)، آنمی آپلاستیک حاد و غیر حاد (۶ و ۷)، برخی سرطانها (۸) و بیماری های خود ایمنی (۹) بکار رفته است. بعلاوه از ALG به عنوان کنترل مثبت در تست های تعیین سازگاری نسجی بین دهنده و گیرنده پیوند مثل HLA-typing و WBC X match استفاده تشخیصی به عمل می آید. بنابراین کاربردهای درمانی متعدد به شرح فوق و نیز کاربردهای تشخیصی ALG، ضرورت بررسی، تحقیق و تولید ALG را در جهت خودکفایی می طلبد. مضافاً

بطور جداگانه به ارلن مایر حاوی کلیس پلاستیکی منتقل شده، به مدت ۲۰ دقیقه روی دستگاه روتاتور قرار گرفت تا خون دفیبرینه تشکیل گردد. ۵ میلی لیتر از این نمونه خونی با ۵ میلی لیتر از محلول هنکس (HBSS pH=۷/۴) مخلوط شد. ۵ میلی لیتر از مخلوط مذکور بر روی ۳ میلی لیتر محلول فایکول - های پاک با دانسیته ۱/۰۷۷ معلق گردید. پس از سانتریفوژ نمودن خون دفیبرینه حاوی فایکول، لایه غنی از سلولهای خونی تک هسته ای از آن جداسازی شد. نمونه لنفوسیت های حاصل به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰g سانتریفوژ گردید و پس از شستشوی مجدد با بافر هنکس، تعداد سلولها بوسیله شمارشگر سلولی تعیین شده و در رقت تقریبی  $4 \times 10^9$  سلول در هر میلی لیتر برای تزریق به خرگوش آماده شدند.

لنفوسیت های انسانی در رقت تقریبی  $4 \times 10^9$  سلول در هر میلی لیتر، بمقدار یک میلی لیتر از طریق رگ مارژینال (حاشیه ای) به خرگوش سفید نژاد نیوزیلندی تزریق گردیدند. تزریقات دوم و سوم در فواصل سه هفته ای با همان رقت از سلولها صورت پذیرفتند. دو هفته بعد از ایمونیزاسیون اول (اوج تشکیل IgM) و سوم (اوج تشکیل IgG) خونگیری از خرگوش به عمل آمده سرم غنی از ALG مربوطه جداسازی شد. سنجش میزان تیتراژ سرمی در مقایسه با ALG استاندارد (SANGSTAT, France) با استفاده از تست های سازگاری نسجی مثل تعیین نوع آنتی ژن های لکوسیتی انسان مبتنی بر روش میکروسیتوتوکسیسیته مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که یک میکرولیتر از لنفوسیت های فرد در ته چاهکهای پلیت تراساکای حاوی آنتی بادی های ضد آنتی ژن های مختلف لنفوسیتی اضافه گردید. در ته چاهک حاوی ALG تولیدی و استاندارد نیز یک میکرولیتر از لنفوسیت های فرد اضافه شد. پس از انکوباسیون به مدت ۲۰ دقیقه، کمپلمان خرگوش به مقدار ۵ میکرولیتر در هر چاهک اضافه و به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه گردید. در نهایت ائوزین و فرمالین در چاهک ها افزوده شد و ۲۴ ساعت بعد در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. خونگیری از قلب خرگوش ایمون با لنفوسیت های انسان بعمل آمد و سرم خون پس از جداسازی، با بافر نمکی فسفات (PBS pH=۷/۴) به نسبت ۱:۱ رقیق سازی شد.

#### رسوبدهی با سولفات آمونیوم:

به منظور رسوبدهی ایمونوگلوبولین های سرمی، سرم خرگوش ایمون بوسیله سولفات آمونیوم اشباع در غلظت نهایی ۵۰٪ رسوب داده شد. مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید و سپس فراکسیون غنی از ALG دو بار با سولفات آمونیوم ۵۰٪ شستشو داده شد. برای حذف نمک سولفات آمونیوم فراکسیون غنی از ALG تولید شده در بدن خرگوش به مدت یک شب در برابر بافر نمکی فسفات (pH=۷/۴) دیالیز گردید. فراکسیون سرمی غنی از ALG با حجم تقریبی ۳ میلی لیتر به ستون تبادل یونی حاوی رزین دی اتیل آمینواتیل سفاروز با سرعت بالا (فارماسیا) که با بافر تریس- فسفات (تریس

اینکه به منظور پاستوریزاسیون و تخلیص نهایی برای تولید شکل دارویی آنتی لنفوسیت گلوبولین و انجام آزمایش های بعدی بر روی مدل های حیوانی، تولید و تخلیص ALG به عنوان ماده اولیه ضروری است. دانشمندان تا کنون به طور کامل به فرآیند نحوه عملکرد ALG پی نبرده اند ولیکن مکانیسمهای مختلفی را برای نحوه عملکرد این آنتی بادی جهت سرکوب ایمنی بر شمرده اند که از آن جمله می توان به پاکسازی لنفوسیتها از گردش خون و تنظیم فعالیت لانه گزینی و عملکردهای سیتوتوکسیک آنها اشاره نمود. ALG همچنین قادر به سرکوب فرآیند خون سازی از طریق تهاجم به رده های سلولی خونساز (۴) و نیز کاهش شدید نیمه عمر پلاکتها می باشد (۱۰). ALG از طریق لیز وابسته به کمپلمان، سلولهای دندریتیک را تخریب نموده و از تحریک سلولهای T بواسطه آنها جلوگیری می نماید (۱۱). آنتی لنفوسیت گلوبولین به عنوان محرک ایمنی قادر است تولید لنفوکاین ها و فاکتور رشد خون ساز را تحت تاثیر قرار داده و مستقیماً پیش سازهای خونی را تحریک نماید. بدین معنی که مطالعات invitro نشان داده اند ALG یک اثر محرک ایمنی (ایمونواستیمولاتور) بر لنفوکاین ها داشته و نیز تولید فاکتورهای رشد هماتوپوئیتیک را تحریک می نماید، لذا از این طریق می تواند سلولهای پیش ساز هماتوپوئیتیک را مستقیماً تحریک نماید و منجر به افزایش پدیده هماتوپوئیز گردد (۴).

ALG حاوی آنتی بادی های سیتوتوکسیکی علیه برخی مارکرهای سطحی لنفوسیت ها همچون CD3, CD2, LFA, CD4, CD8, CD25, CD44, CD45, HLA-DR (۱۳) و (۱۲) و نیز CD5, CD11a, CD18, CD28, و آنتی ژن های آلفا و بتای گیرنده سلول T می باشد (۱۴).

این آنتی بادی با بیان ملکول Fas (CD95, Apo-1) می تواند باعث بروز مرگ سلولی در سلولهای T فعال شده بوسیله ایترلورکین ۲ گردد (۱۵). همچنین ALG اثری ضد تکثیر<sup>۱</sup> روی سلولهای B دارد (۱۶). در مطالعه حاضر ALG در خرگوش تولید و با روش کروماتوگرافی تبادل یونی تخلیص گردید.

روشهای مختلفی برای تخلیص آنتی بادیها وجود دارد که از آنجمله می توان به ژل فیلتراسیون (GF)، کروماتوگرافی گرایشی (AC)، HPLC، و غیره اشاره نمود. کروماتوگرافی تبادل یونی از جمله روشهایی است که در مقایسه با روش های فوق الذکر مزایای متعددی را داراست که از آنجمله می توان به سادگی، سرعت خالص سازی و هزینه کمتر آن نسبت به روشهای پیچیده خالص سازی اشاره نمود. ژل مورد استفاده در این روش دی اتیل آمینواتیل سفاروز بوده است که یکی از بهترین ژل های مورد استفاده در کروماتوگرافی تعویض یونی است.

#### مواد و روش ها

۱۰ میلی لیتر خون محیطی از هر یک از ۲۰ فرد سالم مراجعه کننده به آزمایشگاه جهت پیوند کلیه اخذ شد. نمونه خونی هر فرد

مراحل دوم و سوم ایمونیزاسیون نیز منجر به تولید ALG از کلاس IgG گردید که پس از ۴۰ بار رقیق سازی نیز بخوبی ALG استاندارد قادر به لیز نمودن لئفوسیت‌های انسان بود. تیتراژ آنتی بادی تولیدی طی فرآیند تولید ۲ مرتبه افزایش نشان داد که این امر حاکی از ایمونیزاسیون مناسب و موثر حیوان طی تزریقات متوالی بود.

طی فرایند خلص سازی، اعمال جریان بافر تریس - فسفات باعث تخلیص و خروج حدود ۱۵ میلی گرم ALG در قالب فراکسیون اول از ستون تبادل یونی گردید.

همچنین اعمال غلظت پلکانی کلرید سدیم ۵۰mM مقدار ۲ میلی گرم دیگر از پروتئین تخلیص شده را از ستون خارج نمود. لذا در مجموع حدود یک سوم مخلوط پروتئینی ناخالص برده شده به ستون یعنی حدود ۱۷ میلی گرم ALG تخلیص شده از ستون خارج گردید. در مجموع دو قله پروتئینی در فرآیند خلص سازی قابل مشاهده بود (شکل ۱).

بررسی الگوی الکتروفورز پروتئین در شرایط احیا نشان داد که پروتئین تخلیص شده عمدتاً شامل یک باند پلی پپتیدی مشخص در محدوده وزن ملکولی ۵۰ کیلو دالتون و یک باند منتشر در محدوده وزن های ملکولی ۲۰ الی ۳۰ کیلو دالتون است که به ترتیب مربوط به زنجیره های سنگین و سبک IgG خرگوش می باشند (شکل ۲). تقریباً هیچگونه ناخالصی واضحی در فراکسیون اول (بافر کار) دیده نمی شود که حاکی از خلوص بسیار بالای ALG تخلیص شده می باشد.

همچنین کارآئی آنتی لئفوسیت گلوبولین تولید شده در قالب انجام تست های سازگاری نسجی از جمله تعیین نوع آنتی ژن های لئفوسیتی انسان به عنوان کنترل مثبت و در مقایسه با ALG استاندارد به تایید رسید.

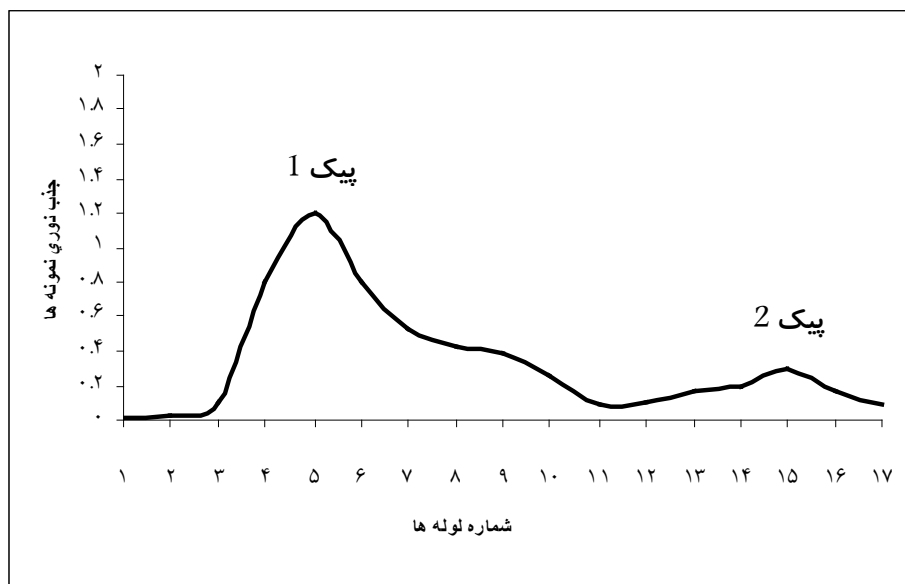
۴۰ mM و فسفات ۲۵ mM (pH=۸/۱) متعادل شده بود برده شد. با عبور جریان بافر کار فراکسیون اول حاوی ALG تخلیص شده از ستون خارج گردید. فراکسیون دوم نیز با اعمال غلظت پلکانی کلرید سدیم تخلیص و از ستون تخلیه شد. به این منظور از جریان بافر کار حاوی ۵۰ mM کلرید سدیم استفاده شد.

جذب نوری نمونه های تخلیص شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۸۰nm قرائت شد و میزان غلظت پروتئین تخلیص شده در نمونه های با جذب بالای ۰/۱ برای هر فراکسیون محاسبه گردید (۱۷). این نمونه ها مخلوط شده و پس از رسوبدهی با سولفات آمونیوم در یخچال در دمای ۴۰+ سانتیگراد نگهداری شدند.

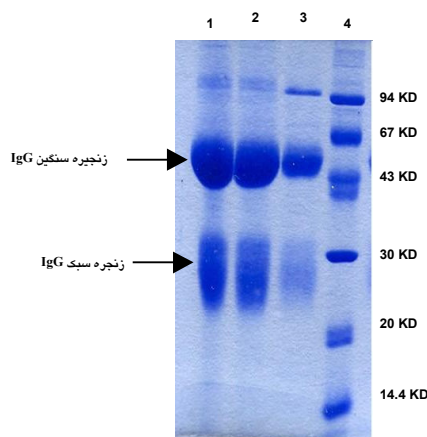
الکتروفورز پروتئین ها بر اساس روش Laemmli (۱۸) در حضور ۲- مرکاپتواتانول انجام گرفت. به این منظور از ژل پلی اکریلامید ۱۲٪ استفاده شد. چهار حجم نمونه تخلیص شده از هر فراکسیون به یک حجم از بافر نمونه (5x) افزوده شده و مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد جوشانیده شد. به هر یک از چاهک های ژل مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه اضافه گردید. به چاهک انتهائی نیز از مارکرها با وزن ملکولی کم (فارماسیا) افزوده شد. الکتروفورز در ولتاژ ثابت تا رسیدن نوار سرمه ای رنگ بر موفنل به انتهای ژل ادامه یافت. سپس ژل با استفاده از رنگ آبی کوماسی G-250 (فارماسیا) رنگ آمیزی شد.

## یافته ها

پس از ایمن سازی خرگوش با لئفوسیت‌های انسان در مرتبه نخست، آنتی لئفوسیت گلوبولین پلی کلونال از کلاس IgM حاصل گردید که تیتراژ آن همانند نمونه استاندارد در سنجش میکروسیتوتوکسیستی قادر به لیز نمودن لئفوسیت ها بود.



شکل ۱: منحنی جذب نوری نمونه های ALG خارج شده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی حاوی DEAE-Sephrose 6B در طول موج ۲۸۰ نانومتر؛ پیک اول مربوط به فراکسیون اول (بافر کار تریس - فسفات pH=۸/۱)، پیک دوم مربوط به فراکسیون دوم (بافر کار حاوی NaCl ۵۰ میلی مولار)



**شکل ۲:** آنتی لئوسیت گلوبولین تخلیص شده با کروماتوگرافی تعویض یونی در شرایط احیا ستون های ۲: فراکسیون اول (بافر کار تریس - فسفات (pH=۸/۱)، ستون ۳: فراکسیون دوم (بافر کار به همراه NaCl ۵۰ میلی مولار) ستون ۴: مارکرهای وزنی

## بحث

در مطالعه حاضر، آنتی بادی پلی کلونال ضد لئوسیت های انسان (ALG) در خرگوش تولید و با روش کروماتوگرافی تبادل یونی روی ژل دی اتیل آمینو اتیل سفاروز 6B خالص سازی گردید.

ALG ماهیتاً از جمله عوامل سرکوبگر سیستم ایمنی است که سالها برای درمان آنمی آپلاستیک حاد، رد پیوند اعضا، بیماری پیوند علیه میزبان، و برخی بیماری های خود ایمنی بکار رفته است (۹-۳). همانگونه که ذکر گردید در جریان فرآیند تولید ALG رقت های  $\frac{1}{2}$  و  $\frac{1}{4}$  سرم خرگوش ایمون با لئوسیت های انسان به فاصله دو هفته پس از تزریقات اول و سوم مانند نمونه ALG استاندارد قادر به لیز نمودن لئوسیت ها بود. همچنین ۲ مرتبه افزایش در تیتراژ آنتی بادی تولیدی حین فرآیند تولید نشان دهنده تزریقات موثر با فواصل زمانی مناسب بود که این امر در تولید انبوه آنتی بادی های پلی کلونال از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است. در مطالعه حاضر حداقل ۵۰ میلی لیتر سرم غنی از ALG در هر بار خونگیری از خرگوش بدست آمد که با اعمال ضریب رقت  $\frac{1}{2}$  و  $\frac{1}{4}$  حدود ۱ لیتر آنتی لئوسیت گلوبولین با ماهیت IgM و ۲ لیتر آنتی لئوسیت گلوبولین با ماهیت IgG می توان از هر خرگوش تهیه نمود. این فرآیند از لحاظ اقتصادی فوق العاده مقرون به صرفه و تولید بهینه محسوب میگردد.

در این مطالعه پس از تخلیص در فراکسیون اول (بافر کار تریس - فسفات (pH=۸/۱)، پروتئینی با غلظت بالای ۹۸٪ حاصل گردید که خلوص آن توسط روش SDS-PAGE به تأیید رسید. در فراکسیون های بعدی (بافر کار بعلاوه NaCl ۵۰ میلی مولار) مقادیر دیگری از پروتئین های باند شده به ستون خارج گردید. از آنجا که پروتئین جدا شده قابل توجه نیست و بعلاوه دارای

خلوص بالا (نسبت به فراکسیون اول) نیست، از اینرو استفاده از بافر کار برای خالص سازی IgG خرگوش کافی است و دیگر نیازی به استفاده از اعمال غلظت پلکانی NaCl برای تخلیص بیشتر نیست. همچنین ثابت شد که پروتئین ۵۰ کیلودالتونی تخلیص شده آنتی لئوسیت گلوبولین تولید شده در بدن خرگوش، با ماهیت IgG بوده است. همچنین کارائی این آنتی بادی به عنوان کنترل مثبت در مقایسه با ALG استاندارد در تستهای سازگاری نسجی به تأیید رسید.

نتایج بدست آمده همانند تجربیات پیشین حاکی از آن است که روش کروماتوگرافی تبادل یونی که اساس آن اتصال برگشت پذیر ملکولهای باردار محلول به گروه های ثابت تبادلگر یونی با بار مخالف است، روشی مناسب برای تخلیص آنتی بادی ها با ماهیت IgG است (۱۹). این روش در مقایسه با برخی از روشهای دیگر همچون کروماتوگرافی تمایلی روی پروتئین A و پروتئین G، و ژل فیلتراسیون آسان و کم هزینه می باشد.

استفاده از دی اتیل آمینو اتیل سفاروز با سرعت بالا بعنوان تبادلگر آنیونی برای انجام فرآیند خالص سازی گزینه مناسبی است چرا که این تبادلگرها با توجه به ساختار آگاروزی و اتصالات عرضی موجود در آن و همچنین محدوده وسیع pH عملکردی (۲ الی ۹)، برای استفاده در ستون تبادل یونی بسیار مناسب هستند. این تبادلگر جذب غیراختصاصی بسیار ضعیفی داشته و آلودگی های میکروبی در آن مشاهده نمی شود. همچنین پایداری شیمیائی و فیزیکی، این ژل را کاندید مناسبی برای استفاده در امر خالص سازی می کند (۲۰).

از سوی دیگر یافته ها نشان داد اعمال غلظت پلکانی کلرید سدیم در محدوده ای بین صفر تا صد میلی مولار قادر است حجم نسبتاً کمتری از پروتئین های خارج نشده از ستون طی شرایط اولیه

شکل می دهند که محصول نهائی آن ایمونوگلوبولینی با درصد خلوص بالا است (۱۹). بعلاوه نتایج نشان می دهند که خلوص سازی مقدماتی مناسب و نیز تخلیص با کیفیت و دقیق فراکسیون نخست، نیاز به اعمال غلظت پلکانی در مراحل متعدد و با غلظتهای متفاوت را مرتفع می سازند.

ALG تولیدی و تخلیص شده برای استفاده به عنوان کنترل مثبت در تست های سازگاری نسجی همچون تعیین نوع آنتی ژن های لئوسیتی انسان و کاربردهای مطالعاتی، تحقیقاتی و آزمایشگاهی دیگر مناسب و کارآمد بوده و با لحاظ این نکته که ALG تولیدی در مقایسه با مشابه خارجی کیفیت و کارائی بالا و قابل قبولی دارد می توان از روش مورد استفاده در انجام این تحقیق برای تولید و تخلیص ALG با خلوص بالا، با صرف هزینه کمتر و زمان کوتاه تر بجای تحمیل هزینه های گزاف به مراکز تحقیقاتی و درمانی برای خرید نمونه های مشابه خارجی با قیمتهای کلان، بهره گرفت.

### تقدیر و تشکر

نگارندگان بر خود لازم می دانند از کارشناسان آزمایشگاه ایمونولوژی مرکز آموزشی و درمانی امام خمینی (ره) تبریز که در جداسازی لئوسیت ها با فایکول همکاری بی شائبه داشته اند، صمیمانه قدردانی نمایند.

### References

- Lydyard P, Whelan A, Fanger MW. *Immunology-Instant Notes*. 2<sup>nd</sup> ed. Guildford-UK, BIOS Scientific 2004; P: 41-46.
- Konomi K, Deodhar SD. Preparation and purification of horse antihuman lymphocyte globulin (ALG). *Cleve Clin Q* 1968; **35**(4): 199-205.
- Di Filippo S. Anti-IL-2 receptor antibody vs polyclonal anti-lymphocyte antibody as induction therapy in pediatric transplantation. *Pediatr Transplant* 2005; **9**(3): 373-80.
- Marsh JC, Gordon-Smith EC. The role of antilymphocyte globulin in the treatment of chronic acquired bone marrow failure. *Blood Rev* 1988; **2**(3): 141-8.
- Bacigalupo A. Antilymphocyte / thymocyte globulin for graft versus host disease prophylaxis: efficacy and side effects. *Bone Marrow Transplant* 2005; **35**(3): 225-31.
- Leong KW, Teh A, Bosco JJ, Jayaranee S, Sadat U. Anti-lymphocyte globulin therapy in aplastic anaemia-a university hospital experience. *Med J Malaysia* 1995; **50**(2): 158-61.
- Locasciulli A, Bruno B, Rambaldi A, Saracco P, Dufour C, Finelli C, 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*; **89**(9): 1054-61.
- Aivado M, Rong A, Stadler M, Germing U, Giagounidis A, Strupp C, 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; (4): 210-6.
- Abdulkadyrov KM, Bessmel'tsev SS. Immunological and rheological parallels in patients with autoimmune thrombocytopenic purpura treated with antilymphocyte globulin. *Klin Med (Mosk)* 1990; **68**(6): 49-53.
- Gratama JW, Brand A, Jansen J, Zwaan FE, Valentin RM, Eernisse JG. Factors influencing platelet survival during antilymphocyte globulin treatment. *Br J Haematol* 1984; **57**(1): 5-15.
- Monti P, Allavena P, Di Carlo V, Piemonti L. Effects of anti-lymphocytes and anti-thymocytes globulin on human dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 2003; **3**(2): 189-96.
- Bourdage JS, Hamlin DM. Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte / antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. *Transplantation* 1995; **59**(8): 1194-200.
- Raefsky EL, Gascon P, Gratwohl A, Speck B, Young NS. Biological and immunological characterization of ATG and ALG. *Blood* 1986; **68**(3): 712-719.

14. Bonnefoy-Berard N, Vincent C, Revillard JP. Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* 1991; **51**(3): 669-673.
15. Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antilymphocyte globulins. *Blood* 1998; **91**(7): 2360-2368.
16. Bonnefoy-Berard N, Flacher M, Revillard JP. Antiproliferative effect of anti-lymphocyte globulins on B-cells and B-cell lines. *Blood* 1992; **79**(8): 2164-2170.
17. Delves PJ. Measuring antibody concentration by UV adsorbance In: Wiley NY, Antibody application, essential techniques series. 1995; 16-17.
18. Laemmli UK. 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 and Methods 2003; 46-48.