

Tümör Nekrozis Faktör ve Karaciğer Hastalıklarındaki Rolü

Hakan ŞENTÜRK*

Tümör nekrozis faktör (TNF)'ün keşfi, immünolojik sistemin biyolojisinin anlaşılması açısından önemli bir ilerlemedir ve klinisyenlerde, gerek pek çok önemli hastalığın patogenezinin anlaşılmasına yardımı ve gerekse de tedavi edici bjr ajan olarak ümit verici olması nedeniyle heyecan uyandırmıştır.

TNF'nin Keşfi

1892-1931 yılları arasında New York Memorial hastanesinde cerrah olarak çalışan William B. Coley, boyun sarkomu olan bir hastada, şiddetli bir erizipel esnasında sarkomun sürekli bir küçülme ile kaybolduğunu ve hastanın 7 yıl süreyle normal bir yaşam sürdürdüğünü, yani büyük ihtimalle kür olduğunu gözlemlemiş ve bu gözleminde yola çıkarak Coley toksini adıyla bilinen ölü streptokok ve serratia ürünlerinin karışımından ibaret aşırı tümörlerin tedavisinde kullanmaya başlamıştır (1). Bazı tümörlerin bu tedaviyle gerçekten gerilemesine rağmen, bu kaba tedavi metodu, kemoterapi ve radyoterapinin çok daha rasyonel sonuçlar vermesi nedeniyle ortadan kaybolmuştur. Mikropların kanser tedavisindeki bu potansiyel rolü, eğer kızı Helen Coley Nauts'ın çabaları olmasaydı, onun ölümüyle birlikte tamamen unutulabilirdi. Ancak ABD Kanser Araştırma Enstitüsü'nde çalışan kızı, kendisini, babası W.B.Coley'in bulgularını tüm hekimlere duyurmaya adanmış ve bu muhtemel akibetin önüne geçmiştir.

Nihayet 1975'de Carswell ve Old, BCG ile infekte edilen sıçanlara endotoksin uygulandığında serumda beliren bir faktörün sarkomların

hemorajik nekrozuna yol açtığını göstermişler ve bu hipotetik maddeyi "tümör nekrozis faktör" olarak isimlendirmişlerdir (2). 1984'de tümör nekrozis faktör purifiye ve klone edilmiş ve böylelikle TNF'nin yaklaşık bir yüzyıl alan temel tanımlanma sürecine tamamlanmıştır (3).

Kaşektinin Keşfi

Kaşeksi, normal veya normale yakın bir kalori alımına rağmen gelişen anormal zayıflamayı ifade etmektedir. Malign hastalıklarda, kronik parazitik ve gram negatif infeksiyonlarda hipertrigliseridemi sık rastlanılan bir bulgudur (4-9).

Cerrahi grubu, sıçanlara endotoksin uygulamasını takiben ortaya çıkan bir serum faktörünün lipoprotein lipaz aktivitesini baskılayarak hipertrigliseridemiye yol açtığını göstermiş ve nihayet1985'de kaşektin purifiye edilerek TNF ile aynı madde olduğu anlaşılmıştır (10,11).

Moleküler Biyoloji

TNF geni ö.kromozomun kısa kolu üzerinde lokalize olup major histokompatibilite kompleksine çok yakın bulunmaktadır. 17kd bir polipeptid olan TNF'nin strüktürel yapısı, lenfotoksin, interleukin-1 ve çoğu interferonlara yakınlık göstermektedir (12-15).

İmal, Dağılım ve Klirensi

TNF, büyük ölçüde makrofajlar tarafından imal edilmekteyse de, T lenfositlerinin, doğal öldürücü "natural killer" hücrelerin, çeşitli, Ebstein-Barr virüsü ile transforme B hücre

*İst. Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. İç Hast. ABD, İSTANBUL

serilerinin, fibroblastların ve hatta bazı virüslerin TNF imal potansiyeline sahip oldukları gösterilmiştir (10,11,16-18).

TNF, üreten organizmaya özgü olmayıp, interferonun aksine, bir organizmanın ürettiği TNF, çoğunlukla diğerinde de aynı biyolojik aktiviteyi göstermektedir (19,20).

Tümör nekrozis faktörün en önemli hedefleri arasında, damar endoteli, karaciğer, cilt, böbrekler, akciğerler ve gastrointestinal sistem bulunmaktadır. İnsanlarda TNF'nin yarı ömrü 15-17 dakikadır (21).

Biyolojik Aktivitesi

TNF aşağıdaki biyolojik aktiviteleri göstermektedir (22).

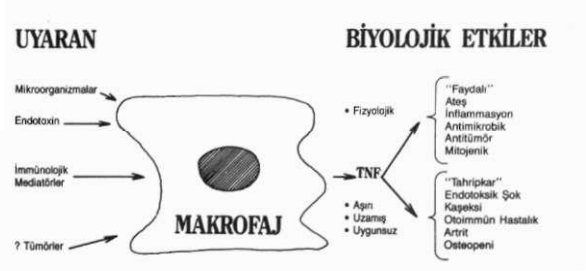
1. T hücrelerinin aktivasyonu
2. Tümör hücrelerine sitotoksik etki
3. Lipoprotein lipazın inhibisyonu
4. Pirojenik etki
5. Nötrofillerin aktivasyonu
6. Osteoklast aktivasyonu
7. Endotelial hücrelerde prokoagulan aktivitenin indüksiyonu
8. Fibroblastlara mitojenik etki
9. interferon beta-2'nin indüksiyonu
10. Kendi sentezinin indüksiyonu
11. İnterleukin 1 sentezinin indüksiyonu
12. Prostaglandin ve kollajenaz sentezinin artırılması
13. Koloni stimulan faktörün indüksiyonu
14. Akut faz proteininin indüksiyonu

Fizyoloji ve Fizyopatolojisi

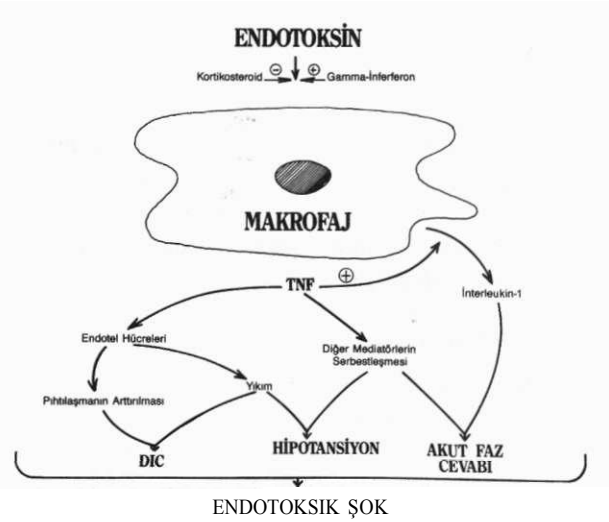
TNF üretiminin in vivo kinetiğini inceleyen çalışmalar, onun endotoksin stimülasyonunu takiben dakikalar içinde yüksek miktarlarda üretildiğini göstermiştir (23,24).

Tümör nekrozis faktör, fizyolojik şartlarda organizmaya yararlı bir madde olup, ateş ve inflamasyon patogenezinde rol oynamakta, antimikrobik, antitumor etki ve mitojenik aktivite gösterebilmektedir. Ancak, aşırı, uzamış veya uygunsuz salgılandığı takdirde tahripkar olup, endotoksik şok, kaşeksi, otoimmün fenomen, artrit ve osteopeniye yol açmaktadır (23,25) (Şekil 1-3).

Jan Vilçek, tümör nekrozis faktörünü, Hint kültürünün yaratış ve tahrip sembolü tanısı



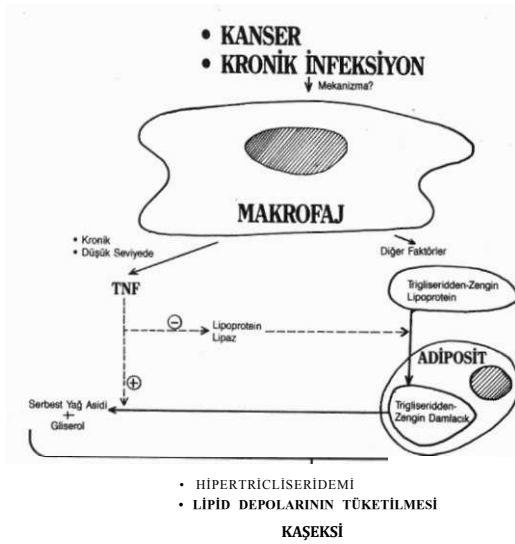
Şekil 1. Tümör nekrozis faktörün fizyolojisi.



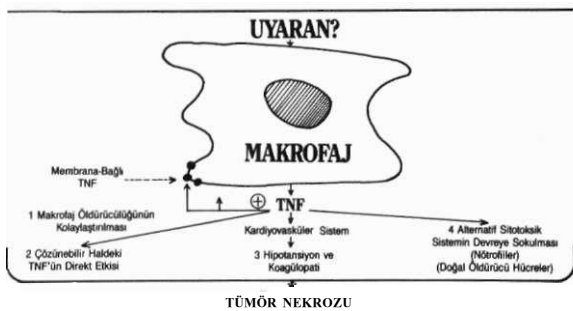
Şekil 2. Endotoksik şokun fizyolojisi. Bakteriye endotoksin makrofajları uyararak, bol miktarda TNF ve IL-1 imaline yol açar. Makrofajların dah önceden kortikosteroid ile muamelesi bu cevabı bloke ederken, gamma-interferon ile muamele bu cevabı arttırmaktadır. Sirküle eden TNF direkt ve indirekt (IL-1 ve diğer inflammatuar mediatorlerin imalini uyararak) yolla endotoksik şokun, tüm karakteristik klinik özellikleriyle, ortaya çıkmasını sağlayabilir.

Shiva'ya benzetmiştir. Shiva, çoğunlukla, bir elinde yaratışın kutsal fincanını diğer elinde ise tahrip alevini tutar biçimde sembolize edilmektedir. Tümör hücrelerini yok ederken normal hücrelere zarar vermeyen hatta onların çoğalmasını provoke eden, fizyolojik koşullarda organizmaya yararlı iken, patolojik koşullarda tahripkar olabilen bu madde için çok uygun bir benzetme olsa gerektir (26).

Tümör nekrozis faktör, genellikle 3 mekanizmayla tümör nekrozuna yol açmaktadır (27) (Şekil 4).



Şekil 3. Kaşeksinin fizyopatolojisi: Kronik infeksiyon veya kanser, konak makrofajlarının TNF imalini arttırmaktadır. TNF'e ilave olarak, makrofajlar ve belki bizzat tümör hücreleri ve infeksiyon amilleri tarafından imal edilen diğer birtakım, tanımlanması henüz yapılamamış, maddelerde kaşeksiye yol açabilir. Düşük konsantrasyonlarda olsa dahi, TNF'ün uzun süre sirkülasyonda bulunması gerek lipolizi uyararak gerekse de lipoprotein lipaz aktivitesini bloke ederek adipositlerin trigliserid depolarını tüketmektedir.



Şekil 4. TNF'ün tümör nekrozunu uyarma mekanizması. Neoplastik doku, mekanizması bilinmeyen yollara makrofajlar tarafından TNF imalini uyarmaktadır. Çözünabilir TNF tümör hücrelerine direkt olarak toksiktir. İlave olarak TNF hem makrofaj membranına direkt etkiyle hem de makrofajı aktive ederek onun öldürücü kapasitesini arttırmaktadır. TNF, hipotansiyon ve sistemik koagülopati oluşturarak tümörün iskemik nekroza yolaçabilir. Nihayet, TNF immün sistemin alternatif kollarını devreye sokabilir.

1. Çözünabilir haldeki tümör nekrozis faktörün, makrofaj ile ilişkili direkt etkisi

2. İmmün sistemin diğer dallarının devreye sokulması

3. Sistemik hipotansiyon ve tümörü besleyen kan damarlarının trombotik tıkanmasına yol açması

Bu etkilerden hangisinin daha önemli rol oynadığı tartışmalıdır.

KARACİĞER HASTALIKLARI VE TNF

Tümör nekrozis faktör, endotoksinin etyopatogenezinde rol oynadığı pek çok olayın nihai aracı (mediatörü) olarak gösterilmiştir (23,28,29,30). Örneğin sıçanlarda galaktosamin ile oluşturulan karaciğer yetersizliğinde, karaciğer nekrozuna yol açan faktörün, endotoksin etkisiyle imal ve sekrete edilen TNF olduğu iddia edilmiştir (31). Tümör nekrozis faktörün ilginç bir etkisi de, granülom oluşmasını ve korunmasını sağlamasıdır. Deney hayvanlarında, karaciğer ve akciğerlerdeki granülomların oluşmasının TNF etkisiyle mümkün olabildiği, TNF etkisinin bloke edilmesi halinde granülomların küçüldüğü ve yok olduğu saptanmıştır (32). Granülomlarla karakterize sarkoidozda bronko-alveoler lavaj ile elde edilen makrofajların, spontan TNF imalini arttırdığı ileri sürülmüştür. Tarafımızdan King's College Hastanesi Karaciğer Ünitesinde henüz tamamlanan çalışmada, primer biliyer sirozda, kontrollere ve primer sklerozan kolanjitli hastalara kıyasla plazma ve çevresel kan mononükleer hücreleri (ÇKMH) süpernatantlarında TNF konsantrasyonunun anlamlı olarak arttığı ve TNF konsantrasyonu ile karaciğer biopsi materyalinde granülom bulunması arasında istatistiki anlamlı bir korrelasyon bulunduğu gösterilmiştir. İspanya'da yapılan bir çalışmada da primer biliyer sirozda plazma ve ÇKMH süpernatantı TNF konsantrasyonu ile osteodistrofi arasında pozitif bir korrelasyon bulunduğu bildirilmiştir.

Yine King's College Karaciğer Ünitesinde yapılan bir çalışmada kronik hepatit B infeksiyonunda ÇKMH'lerin TNF imalini arttırdığı ve lipopolisakkaride (endotoksin) in vitro cevabın normalden daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu artışın, yetersiz interferon imali ile birlikte gittiğini gören grub, interferon tedavisine dirençli hepatit B hastalarında tedaviye TNF eklendiğinde, hastaların anlamlı bir çoğunluğunda HBV-DNA titresinin düştüğünü ve interferona direncin yenildiğini

göstermişlerdir. Çalışma halen sürmektedir. TNF tedavisi esnasında, birkaç hastada geçici hipotansiyon dışında ciddi bir yan etkiyle karşılaşılmamıştır.

Avusturya'da halen devam eden çalışmada da TNF uygulananın, inoperabl hepatomalarda iyi sonuç verdiği bildirilmektedir. Son 5 çalışma muhtemelen yakın bir gelecekte yayınlanacaktır.

Alkolik hepatitlerde yapılan bir çalışmada ÇKMH'lerin spontan ve in vitro LPS ile uyarılmış TNF imallerinin arttığı gösterilmiştir (33).

Fülminan hepatitin etyolojisinde, TNF'nin rolü olduğu düşünülmüş ve aşağıdaki hipotez ileri sürülmüştür (26).

Benign akut viral hepatitlerde serum interferon düzeyi artmıştır ve ÇKMH'ler anti-viral hasaya sahiptirler. Buna karşılık fülminan hepatitli hastalarda ÇKMH'ler anti-viral özellik kazanamadıkları gibi, interferon imalleri de artmamıştır. Bu hastalara eksojen interferon uygulandığında ÇKMH'ler antiviral özellik kazanabilmektedirler. Bu da hastaların hücre içi interferon bağımlı sistemlerinin işler durumda olduğunu göstermektedir. Benign akut viral hepatit geçirmekte olan bir hastada salgılanan interferon (İFN) virus ile infekte olmamış hücrelerde anti-viral bir ortam yaratırken ÇKMH'ler tarafından salgılanan İF, bir yandan virus ile infekte olmuş hücrelerin tahribini hızlandırmakta, öte yandan sağlam hepatositlerin rejenerasyonunun arttırmaktadır. Oysa akut fülminan hipatitli bir hastada, salgılanan İFN yetersiz düzeyde olduğundan ve ÇKMH'ler anti-viral hale gelemediğinden, hepatositlerin tahribi süratlenmekte ve ağırlaşmakta, İFN'nin koruyucu etkisi ile dengelenemeyen TNF salgılanması bu tahribi arttırmaktadır. İFN ile, infekte olmaktan korunan hepatosit kalmadığından rejeneratif cevap da gerçekleşmemektedir. Bu koşullarda akut benign viral hepatitte İFN ile birlikte yararlı olan TNF, akut fülminan hepatitte zararlı bir madde gibi ortaya çıkmakta ve karaciğer nekrozunu hızlandırmaktadır. Bu hipotez, kortikosteroidlerin akut B hepatitindeki zararlı etkisini de izah etmektedir. Kortikosteroidler TNF sekresyonunu baskıladığı için virus ile infekte olan hücreler daha uzun yaşamakta ve kronik hepatit oluşmaktadır. Yine bu teori fülminan hepatitte alfa-interferon

kullanımının yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

TNF Ölçümünde Kullanılan Testler

1. Biyolojik Testler

a) Sitotoksik Testler: Sitotoksinlerin (TNF-alfa ve lenfotoksin) varlığında L-929, L-N ve Wehi 164 klon 13 gibi duyarlı hücre serileri dejenere olmakta ve ölmektedirler. Tek tabaka halinde hücrelerin yerleştirildiği mikropleytlere, sitotoksin konsantrasyonunun tayin edilmek istendiği materyal ve standard TNF dilüsyonları ilave edilip, inkübe edilmekte ve daha sonra çeşitli boyama yöntemleriyle, ölen hücrelerin oranı ELİSA okuyucusunda saptanmakta ve standardlar ile karşılaştırılarak sitotoksin konsantrasyonu ölçülmektedir. Mikropleyt kuyucuklarına Aktinomin D ilave edildiğinde testin duyarlılığı artmaktadır. Serum ile çalışıldığında, serumdaki sitotoksin dışımda hücre viabilitesini etkileyen çeşitli maddeler testin spesifitesini azaltmaktadırlar. Ancak serumdan arındırılmış, örneğin ÇKMH süpernatanı gibi, bir materyal için, TNF-alfa ve beta (lenfotoksin)'nin birlikte ölçüldüğü dikkate alındığında, iyi sonuçlar verebilmektedir (34-36).

b) Alternatif Testler: TNF ve kaşektinin aynı madde olduğu bilinmektedir. Kültüre edilmiş adipositlere, kaşektin düzeyi ölçülecek materyal ilave edildikten sonra, heparin uygulanmakta ve lipoprotein lipaz aktivitesi ölçülmektedir. Süpresyon derecesine göre kaşektin yani TNF konsantrasyonu hakkında karar verilmektedir (8,37,38).

TNF-alfa ve lenfotoksin (TNF-beta)'in makrofaj benzeri hücre serilerinden prostaglandin imalini uyarıcı etkisine dayanan bazı testler ortaya çıkmışsa da, güçlükleri oranında duyarlı bulunmamışlardır.

2. İmmünolojik Testler

Bu testler, biyolojik testlere nazaran TNF-alfa için daha hassas sonuçlar vermektedirler.

a) İRMA: Bu immunoradyometrik testde, yakalayıcı antikorların bulunduğu tüplere serum ilave edilmekte ve takiben radyoaktif madde ile işaretlenmiş antikor ilave edildikten sonra tüpler yakınmakta ve radyoaktivite gamma sayıcısında okunarak TNF düzeyi saptanmaktadır. Bu test, halen en duyarlı testlerden birisidir (39).

b) ELİSA: Bu testde, mikropleyt kuyucuklarında, monoklonal ve poliklonal anti-TNF antikorları ve TNF düzeyi ölçülecek materyal biraraya getirilmekte ve poliklonal antikorlara yönelik peroksidaz ilave edildikten sonra, kromojen ile boyama yapılmakta, sülfürik asit ile reaksiyon durdurulduktan sonra renk değişimi ELİSA-pleyt okuyucusunda belirli bir dalga boyunda okunmaktadır (40-45).

Bu son iki testde sensitivite sınırı 1-5 pg/ml'ye kadar inmektedir (Normal serum TNF düzeyi 11 pg/ml'nin altındadır).

Doku düzeyinde TNF tayini için ise immunohistochemistry ve in-situ hibridizasyon teknikleri kullanılmaktadır.

SONUÇ

Yaklaşık 100 yıldan beri devam eden sitotoksinler konusundaki çalışmalar, 5 yıl önce TNF'nin pürifiye ve klone edilmesiyle daha objektif hale

gelmiştir. TNF'nin pek çok önemli hastalığın (Kanser, gram negatif enfeksiyonlar, endotoksik şok, malarya, tripanosomiyas, hepatitler, granülomatöz hastalıklar, artritler vs.) patogeneğinde rol oynadığı ortaya konulmuş ve tedavi edici bir ajan olarak da kullanılabileceği konusunda umut verici bulgular elde edilmiştir. TNF, organizma homeostazı harmoni içinde olduğu takdirde stresslere karşı, organizmayı koruyucu bir akut faz reaktanı olarak ortaya çıkmakta, ancak bu hormoninin bozulması halinde tahripkar ve zararlı bir hale gelebilmektedir. TNF'nin, alkolik hepatit, kronik B hepatiti, fulminan hepatit, primer biliyer siroz ve hepatosellüler karsinom gibi karaciğer hastalıklarıyla ilişkisi olduğu iddia edilmiş, tedavi edici olarak kronik B hepatiti ve hepatosellüler karsinomda kullanımından söz edilmiştir.

Önümüzdeki yıllarda da, TNF konusu tüm boyutlarıyla klinisyenlerin ilgisini çekmeye devam edecek gibi görünmektedir.

1. Coley WB: Late results of the treatment of inoperable sarcoma by the mixedtoxins of erysipelas and Bacillus Prodigious. *Am J Med Sci* 1906; 131:375-430.
2. Carswell EA, Old LJ, Kassel R: An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72:3666-3670.
3. Aggarwal BB, Kore WJ, Hass PE et al: Human tumor necrosis factor: production, purification and characterisation. *J Biol Chem* 1985; 260:2345-2354.
4. Brenneman DE, Mathur SN, Spector AA: Characterisation of hyperlipidemia in mice bearing the Ehrlich ascites tumour. *Eur J cancer* 1975; ii:225-230.
5. Rouzer CA, Cerami A: Hypertriglyceridemia associated with trypanosoma brucei infection in rabbits: Role of defective triglyceride removal. *Mol Biochem Parasitol* 1980; 2:31-38.
6. Gallin JI, Kaye DO'Leary WM: Serum lipids in infection. *N Engl J Med* 1969; 281:1081-1086.
7. Kawakami M, Cerami A: Studies of endotoxin induced decrease in lipoprotein lipase activity. *J Exp Med* 1981; 154:631-639.
8. Kawakami M, Pekala PH, Lane MD, Cerami A: Lipoprotein lipase supression in 3T3-L1 cells by an endotoxin-induced mediator from exudate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:912.
9. Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A: Purification of cachectin, a lipoprotein-lipase supressing hormone secreted by endotoxin induced RAW 2647 cell. *J Exp Med* 1985; 161:984-995.
10. Beutler B, Cerami A: Cachectin More than just a tumour necrosis factor. *Engl J Med*,1987; 316:379-385.
11. Beutler B, Cerami A: Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986; 320:584-588.
12. Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D, Strominger JL: Genes for the tumor necrosis factor alpha and beta are linked to the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8699-8702.
13. Gardner SM, Mock BA, Hilgers J, Huppi KE, Roeder WD: Mouse lymphotoxin tumour necrosis factor: Structural analysis of the cloned genes, physical linkage, and chromosomal position *J Immunol* 1987; 139: 476483.
14. Collart MA, Belin D, Vasalli JD, de Kossodo S, Vassali P: Gamma interferon enhances macrophage transcription of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 1987; 262:6951-6954.
16. Cuturi MC, Murphy M, Costa-Giomi MP, Weinmann R, Perussia P, Trinchiera G: Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1987; 165:1581-1594.
17. Degliantoni G, Murphy M, Kobayashi M, Francis MK, Perussia B, Trinchiera B: Natural killer (NK) derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor: relationship with tumor necrosis factor and synergy with immune interferon *J Exp Med* 1985; 162:1512-1530.

18. Williamson BD, Carswell EA, Rubin BY, Prendergrast JS, Old LJ: Human tumor necrosis factor produced by human B cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80:5379-5401.
19. Marrenout A, Fransen L, Tavernier J et al: Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. Eur J Biochem 1985; 152:515.
20. Pennica D, Hayflick JS, Bringmann TS, Palladino MA, Goeddel DV: Cloning and expression in escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:6060.
21. Michie HR, Manogue KR, Springs DR, Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. N Engl J Med 1988; 318:1481-1486.
22. Le J, Vilček J: tumor necrosis factor and interleukin-1: cytokines with multiple overlapping biological activities. Lab Invest 1987; 56:234-248.
23. Beutler B, Milsark IW, Cerami A: Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution and metabolic fate in vivo. J Immunol 1985; 135:3972-3977.
24. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF et al: Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. Science 1986; 234:470-474.
25. Michalek SM, Moore RN, McGhee JR, Rosenthal DC, Mergenhagen SE: The primary role of lymphoreticular cells in the mediation of host responses to bacterial endotoxin. J Infect Dis 1980; 141:56-63.
26. Aderka D, Levo Y: Does tumor necrosis factor play a role in the pathogenesis of fulminant hepatitis Med Hypotheses 1988; 27:193-196.
27. Van Der Merwe PA: Tumor necrosis factorS African Med J 1988; 27:193-196.
28. Gifford GE, Lohmann-Matthes ML: Gamma interferon priming of mouse and human macrophages for induction of tumor necrosis factor production by bacterial lipopolysaccharide J Natl Cancer Inst 1987; 78:121.
29. Beutler B, Milsark IW, Cerami A: Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effects of endotoxin. Science 1985; 229:869-871.
30. Lehmann V, Freudenberg M and Galanos C: Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. J Exp Med 1987; 165: 657-663.
31. ties G, Wolter M, Wendel A: Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin induced hepatitis in mice. Biochem Pharmacol 1989; 38:627-631.
32. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P: The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. Cell 1989; 56:731-740.
33. Mc. Clain CJ, Cohen DA: Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. Hepatology 1989; 9:349-351.
34. Meager A, Leung HL, Wooley J: Assays for tumor necrosis factor and related cytokines. J Immunol Meth 1989; 116:1-17.
35. Kramer SM, Carver ME: Serum free in vitro bioassay for the detection of tumor necrosis factor. J Immunol Meth 1986; 93:201-206.
36. Flick DA, Gifford GE: Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumour necrosis factor. J Immunol Meth 1984; 468:167-175.
37. Beutler B, Grrenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan WCE, Mathison J, Ulerich R, Cerami A: Identity of tumour necrosis factor and the macrophage secreted factor cachectin. Nature 1985; 316:552.
38. Nilsson-Ehle P, Schotz MC: A stable radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. J Lipid Res 1976; 17:536.
39. Meager A, parti S, Leung H, Peil E, Mahon B: Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against antigenic determinants of recombinant human tumor necrosis factor (rTNF). Hybridoma 1987; 6:305.
40. Yamazaki S, Onishi E, Enami E, Natori K, Kohase M, Sakamoto II, Tanouchi M, Hayashi II: Proposal of standardised methods and reference for assaying recombinant human tumor necrosis factor. Jpn Med Sci Biol 1986; 39: 105.
41. Brigham TS, Agganwal BB: monoclonal antibodies to human tumor necrosis factor alpha and beta: application for affinity purification immunoassays and as structural probes. Hybridoma 1987; 6:489.
42. Fendly BM, Toy KJ, Creasy AA, Vitt CR, Larrick JW, Yamamoto R, Lin LS: murine monoclonal antibodies defining neutralizing epitopes on tumour necrosis factor. Hybridoma 1987; 6: 359.
43. Hirai M, Okaura N, Terano Y, Tusjimoto M, Nakazato H: Production and characterization of monoclonal antibodies to human tumor necrosis factor. J Immunol Methods 1987; 96:57.
44. Scuderi P, Lam KS, Ryan KJ et al: Raised serum levels of tumour necrosis factor in paratuberculosis. Lancet 1986; ii: 1364.
45. Balkwill F, Burke F, Talbot P et al: Evidence for tumor necrosis factor/cachectin production in cancer. Lancet 1987 ii: 1229.