

## تغییرات کمی لنفوسیت‌های $CD_{29}^+$ T و سلول‌های NK در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید در مقایسه با افراد سالم

دکتر مهری غفوریان بروجردنیا<sup>۱</sup>، دکتر محمد سعید سراج<sup>۲</sup>، دکتر الهه جهانبخش<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۸۸/۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۸۸/۸/۲۷

### چکیده

**پیش زمینه و هدف:** آرتریت روماتوئید نوعی بیماری التهابی است که همچنان علت آن ناشناخته است. ممکن است در ایجاد بیماری پاسخ‌های ایمنولوژیکی نقش داشته باشد. هدف از مطالعه حاضر مقایسه لنفوسیت‌های  $CD_{29}^+$  T و سلول‌های NK در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید و افراد غیر بیمار و سالم می‌باشد.

**مواد و روش کار:** در این تحقیق ۲۵ بیمار که فقط به آرتریت روماتوئید مبتلا هستند (گروه آزمایش) و ۲۵ نفر از افراد سالم (گروه شاهد) مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه خون محیطی از هر دو گروه بعد از لیز گلبول‌های قرمز با آنتی بادی بر علیه لنفوسیت T ( $CD_3$ )، مارکر فعالیت دیررس ( $CD_{29}$ )، سلول NK ( $CD_{56}$ ) رنگ آمیزی شدند و سپس با دستگاه فلوسیتومتری درصد جمعیت‌های مختلف لنفوسیتی مشخص گردید. داده با آزمون T-test مورد آنالیز و مقایسه قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** اختلاف معنی‌داری بین میانگین درصد لنفوسیت‌های  $CD_{29}^+$  و سلول‌های NK در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). جمعیت لنفوسیت‌های  $CD_3^+$  T و لنفوسیت‌های  $CD_{29}^+$  T در بین گروه شاهد و گروه آزمایش اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

**بحث و نتیجه گیری:** به نظر می‌رسد فعالیت و افزایش لنفوسیت‌های  $CD_{29}^+$  و سلول‌های NK منجر به تولید سایتوکاین‌های التهابی می‌شود که در بروز بیماری و شدد آن در تخریب غضروف و فرسودگی استخوان تاثیر می‌گذارد. مطالعات بیشتری لازم است تا نقش لنفوسیت‌های T و سلول‌های NK در بیماران آرتریت روماتوئید و ارتباط آن با تظاهرات کلینیکی و شدد بیماری روشن تر شود.

**کلید واژه‌ها:** آرتریت روماتوئید، فلوسیتومتری، لنفوسیت‌های  $CD_{29}^+$  T، سلول‌های NK

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و یکم، شماره اول، ص ۶۷-۶۱، بهار ۱۳۸۹

**آدرس مکاتبه:** اهواز، دانشگاه پزشکی جندی شاپور، گروه ایمنولوژی دانشکده پزشکی، صندوق پستی ۱۸۹، مرکز تحقیقات هموگلوبینوپاتی و تالاسمی بیمارستان شفاء اهواز تلفن: ۰۶۱۱-۳۷۳۸۲۲۵

Email: Mehri\_Ghafourian@yahoo.com

### مقدمه

می‌شوند. این ضایعات دارای نمای مورفولوژیک یک واکنش ایمنی موضعی می‌باشند (۱). شیوع بیماری آرتریت روماتوئید در کل جمعیت تقریباً ۱ درصد می‌باشد و زنان سه برابر مردان به این بیماری مبتلا می‌شوند (۲). واکنش‌های ایمنی هومورال و سلولی، هردو ممکن است در ایجاد ضایعات بیماری نقش داشته باشند. سلول‌های  $CD_4^+$  T، لنفوسیت‌های B فعال

آرتریت روماتوئید (RA) نوعی بیماری مزمن التهابی با درگیری چندین دستگاه بدن است که علت آن هنوز ناشناخته می‌باشد. اصولاً این بیماری مفاصل اندام‌ها و به ویژه انگشتان را گرفتار می‌کند. با پیشرفت بیماری، مفاصل بزرگ بیشتر گرفتار می‌شوند. تخریب غضروف مفصلی و التهاب سینوویوم از مشخصات اصلی آرتریت روماتوئید محسوب

<sup>۱</sup> دانشیار گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> استادیار گروه داخلی، بیمارستان گلستان، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

<sup>۳</sup> الهه جهانبخش، دکترای عمومی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

لنفوسیت‌های T و سلول‌های NK در افراد سالم بدست آمده است (۳). لازم بذکر است که این تعداد نمونه از بین حدود ۲۰۰ بیمار که به مدت یک ماه به بیمارستان مراجعه می‌کردند با استفاده از اعداد تصادفی تولید شده توسط نرم افزار Minitab بدست آمد. همه بیماران و افراد سالم با رضایت نلمه در پروژه شرکت کردند. ۲ سی سی نمونه خون از هر دو گروه گرفته شد و بلافاصله بعد از لیز گلبول‌های قرمز لکوسیت‌ها با آنتی بادی‌های مونوکلونال کتزوگه به مواد فلورسنتی بر علیه  $CD_{29}$ ،  $CD_3$  و  $CD_{56}$  (ساخت شرکت Dako کشور دانمارک) رنگ آمیزی شدند و سپس با دستگاه فلوسیتومتری Dickenson Becton آمریکا آنالیز و میزان لنفوسیت‌های T، سلول‌های NK، لنفوسیت‌های  $CD_{29}^+$  و لنفوسیت‌های T که مارکر  $CD_{29}$  (لنفوسیت  $CD_{29}^+$ ) را بیان می‌کردند (متغیرهای تحقیق) در حوضه لنفوسیتی مشخص گردید. لازم به ذکر است متغیرها از نوع کمی پیوسته و با مقیاس در صد بدست آمدند. بررسی آماری داده‌ها و مقایسه متغیرهای ایمنی گروه آزمایش و کنترل با استفاده از آزمون T-test و نرم افزار Minitab نسخه ۱۳ صورت گرفت. لازم به ذکر است برای معنی‌دار بودن آزمون سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

### یافته‌ها

در جدول (۱) میانگین درصد جمعیت لنفوسیت‌های مختلف همراه با ۲ انحراف استاندارد میانگین در دو گروه آزمایش (بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید) و گروه شاهد (افراد سالم) نشان داده شده است.

مقایسه کل لنفوسیت‌های  $CD_{29}^+$  در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید و افراد سالم نشان داد که لنفوسیت‌های  $CD_{29}^+$  در بیماران نسبت به افراد سالم افزایش قابل توجهی داشته است ( $p = 0.031$ ). جمعیت لنفوسیت‌های  $CD_{29}^+$  T در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد نیز افزایش نشان داده است ولی اختلاف معنی‌دار نبود ( $p = 0.091$ ).

آزمون مقایسه جمعیت لنفوسیت‌های T  $CD_3^+$  در گروه آزمایش و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $p = 0.508$ ). مقایسه جمعیت لنفوسیت‌های  $CD_{56}^+$  (سلول‌های NK) در گروه آزمایش و شاهد نشان داد که لنفوسیت‌های  $CD_{56}^+$  در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد افزایش چشمگیری داشته است ( $p = 0.011$ ). انواع جمعیت لنفوسیتی در بیماران و افراد سالم در نمودار زیر نیز نشان داده شده است.

شده و پلاسما سل‌ها را می‌توان در سینوویوم ملتهب یافت (۳). سایتوکاین‌های متعددی از جمله IL-8, IL-1, TNF, IFN $\gamma$  را در مایع سینوویال این بیماران یافته اند (۴). تصور می‌شود این سایتوکاین‌ها سلول‌های سینوویال مقیم را فعال می‌نمایند تا به تولید آنزیم‌های هیدرولیتیکی نظیر کلاژناز و متالوپروتئیناز بپردازند، این آنزیم‌ها موجب تخریب غضروف‌ها، رباط‌ها و تاندون‌های مفصلی می‌گردند. بسیاری از سایتوکاین‌هایی که گمان می‌رود نقشی در آغاز تخریب مفصلی ایفا کنند، احتمالاً در اثر فعال شدن موضعی سلول‌های T و ماکروفاژها تولید می‌شوند (۳). ویژگی سلول‌های T ایجاد کنندگی آرتریت و نیز ماهیت آنتی ژن (با آنتی ژن‌های) آغاز کنندگی پاسخ تاکنون ناشناخته مانده است. تعداد قابل توجهی سلول T، در مایع مفصلی بیماران یافت شده اند. اما نقش پاتوژنیک این زیر گروه از سلول‌های T نیز همانند عملکرد فیزیولوژیک آن‌ها مجهول مانده است. لنفوسیت‌های T بدنبال فعال شدن، آنتی ژن‌های فعالیت مانند HLA-DR و  $CD_{29}$  را در سطح خود بارز می‌کنند (۳). گزارشاتی گوناگونی مبنی بر تغییرات این مارکرها در سطح لنفوسیت‌های T به دنبال درمان در دسترس می‌باشد (۶-۷). تغییرات سلول‌های NK در خون محیطی و مایع مفصلی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید نیز گزارش شده است. این سلول‌ها با ترشح اینترفرون در دفاع مقابل عفونت‌های ویروسی نقش دارند (۸، ۲).

جهت بیشتر روشن شدن پاسخ‌های ایمنولوژیکی در بیماری آرتریت روماتوئید مطالعه حاضر قصد دارد تغییرات کمی لنفوسیت‌های  $CD_{29}^+$  T و سلول‌های NK بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید در مقایسه با افراد سالم به کمک فن فلوسیتومتری مورد بررسی قرار دهد.

### مواد و روش کار

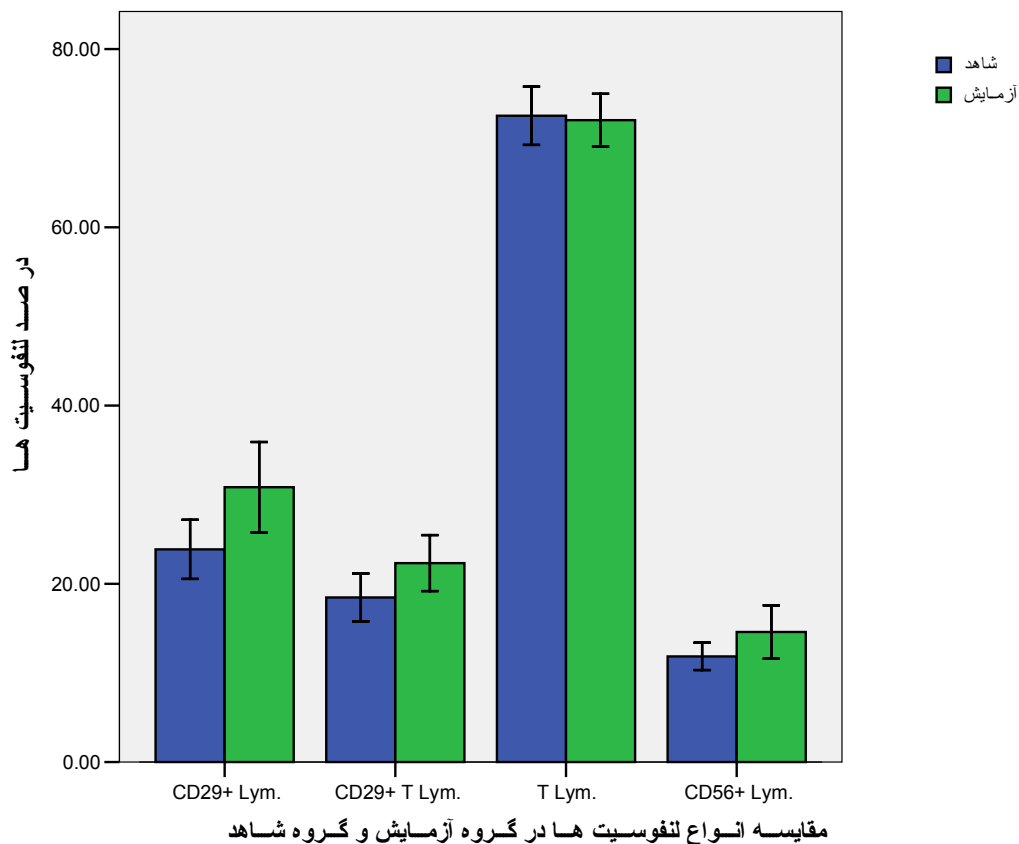
گروه آزمون شامل ۲۵ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید از بین بیماران مراجعه کننده به درمانگاه تخصصی روماتولوژی که بیماری آنها زیر نظر پزشک تائید شده بود و هنوز درمان جهت آنان شروع نشده بود، به‌طور تصادفی انتخاب گردید. گروه شاهد نیز شامل ۲۵ نفر از افراد غیربیمار جامعه بودند که از لحاظ متغیرهای زمینه‌ای نظیر سن، جنس مشابه گروه آزمون بودند و عدم ابتلا به بیماری‌هایی که سیستم ایمنی بدن آن‌ها را تغییر دهد یکی از شرایط مهم انتخاب آن‌ها در نظر گرفته شده بود. تعداد نمونه از

$$n = \frac{(z_{\alpha/2} + z_{\beta})\sigma^2}{\Delta^2} \quad \text{رابطه} \quad \text{با توجه به دامنه تغییرات}$$

## جدول شماره (۱): مقایسه جمعیت لنفوسیت‌های مختلف در گروه آزمایش

(بیماران آرتریت روماتوئید) و گروه شاهد (افراد سالم)

انواع جمعیت لنفوسیتی (متغیرها)	گروه	میانگین $\pm$ انحراف استاندارد میانگین
CD29 <sup>+</sup> لنفوسیت‌های	شاهد	۲۴/۶۸ $\pm$ ۲ (۱/۶)
	آزمایش	۳۰/۹ $\pm$ ۲ (۲/۴)
لنفوسیت‌های CD29 <sup>+</sup> T	شاهد	۱۹/۲۷ $\pm$ ۲ (۱/۶)
	آزمایش	۲۳/۲۳ $\pm$ ۲ (۱/۷)
لنفوسیت‌های T	شاهد	۷۱/۴۱ $\pm$ ۲ (۱/۸)
	آزمایش	۶۹/۴۱ $\pm$ ۲ (۱/۹)
لنفوسیت‌های CD56 <sup>+</sup> (سلول‌های NK)	شاهد	۱۱/۶۸ $\pm$ ۲ (۰/۷۴)
	آزمایش	۱۵/۷۴ $\pm$ ۲ (۱/۴)



سینویال اولین هدف بیماری التهابی آرتریت روماتوئید می‌باشد. هنگامی که بیماری آرتریت روماتوئید شروع می‌شود بافت‌های سینویال سراسر بدن محلی برای کمپلکسی از واکنش‌های سلول‌های مختلف ایمنی از جمله لنفوسیت‌های T، B cells، ماکروفاژها و نیز سلول‌های سینوویوم می‌شود (۲). جمعیت

## بحث و نتیجه گیری

اگر چه پاتوژنز بیماری آرتریت روماتوئید به‌طور کامل شناخته نشده است و لیکن مهاجرت سلول‌های ایمنی از خون بداخل غشای سینویال، تغییراتی در فنوتایپ، تعداد و عملکرد سلول‌های موجود در سینویال در این بیماری مشخص شده است. بافت‌های

روی لنفوسیت‌های T مایع سینوویال نسبت به خون محیطی در بیماران مبتلا به آرتریت نوجوانان نیز گزارش شده است (۱۳). لنفوسیت‌های T تنظیمی که با مارکر  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  مشخص می‌شوند به طور قابل توجهی در مایع سینوویال در مقایسه با خون محیطی بیماران آرتریت روماتوئید و افراد سالم افزایش نشان می‌یابد. به نظر می‌رسد رسپتورهای کموکاینی در سطح این لنفوسیت‌ها در مهاجرت و لانه‌گزینی آن‌ها از جریان خون به مایع سینوویال نقش داشته باشد (۱۴). تغییرات لنفوسیت‌های T تنظیمی در خون محیطی بیماران اتوایمیون از جمله بیماری آرتریت روماتوئید و ارتباط آن با شدت بیماری گزارش شده است (۱۵).

کاهش جمعیت لنفوسیتی  $CD29^+$  در بیماران آرتریت روماتوئید بعد از درمان با متوترکسات مشاهده شده است که پیشنهاد می‌کند این تغییر با محدود شدن فعالیت سلول‌های  $CD4^+$  غیر طبیعی رابطه مستقیم دارد و در نتیجه مهاجرت لنفوسیت‌ها را به سینوویوم ملتهب کاهش می‌دهد (۱۲). مدارک مستندی در دسترس است که نقش عمده سلول‌های  $CD4^+ T$  را در آغاز نمودن و حرکت دهنده التهاب روماتیسمی نشان می‌دهد (۱۶).  $CD29$  در سطح سلول‌های  $CD4^+$  نمایی از یک فنوتایپ حافظه ای می‌باشد. افزایش جمعیت  $CD4^+CD29^+$  در مایع سینوویوم بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید در مقایسه با افراد سالم گزارش شده است (۱۷). افزایش نسبت سلول-های  $CD8^+CD29^+/CD8^+CD29^-$  به  $CD4^+CD29^+/CD4^+CD29^-$  در بیماران آرتریت روماتوئید در مقایسه با گروه شاهد نشان داده شده است (۱۸). لنفوسیت‌های  $CD4^+T$  عمدتاً به سلول‌های TH1 که سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند  $IFN\gamma$  و  $TNF\alpha$  را تولید می‌کنند، تمایز می‌یابند. این سایتوکاین‌ها با تاثیر بر روی سایر سلول‌های ایمنی از جمله ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها نقش مهمی در صدمه بافتی ایجاد می‌کنند و مسئول بسیاری از تظاهرات آرتریت روماتوئید فعال می‌باشند (۱).

مطالعات اخیر دخالت سلول‌های NK را در بیماری آرتریت روماتوئید مورد توجه قرار داده است. سلول‌های NK از سلول‌های پیش ساز خونی  $CD34^+$  منشأ می‌شوند و با روش فلوسیتومتری با بیان و عدم بیان  $CD56$  و  $CD16$  بعنوان سلول‌های بالغ، سلول‌های تنظیم ایمنی و سلول‌های سایتوتوکسیک مطرح هستند که در التهابات مفصلی نقش دارند (۲۰۱۹، ۲۰۱۰). افزایش سلول‌های NK در خون محیطی بیماران آرتریت روماتوئید در این تحقیق و دیگر مطالعات مشابه نشان داده شده است (۸). این افزایش ممکن است در پاتوژنز بیماری آرتریت روماتوئید از طریق سایتوتوکسیسیته با دخالت پر فورین و گگر آنزیم و تولید

لنفوسیت‌های  $CD3^+ T$  عمده سلول‌های تک هسته دای در این منطقه را تشکیل می‌دهند که زیر جمعیت لنفوسیت‌های  $CD4^+$  نسبت به جمعیت لنفوسیت‌های  $CD8^+$  غلبه دارد. این سلول‌ها در نزدیکی ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک  $HLADR^+$  هستند. اهمیت واکنش متقابل سلول‌های T با ماکروفاژها در تولید سایتوکاین‌های روماتیسمی گزارش شده است (۹). جمعیت کوچکی از لنفوسیت‌های T را لنفوسیت‌های T گاما دلتا تشکیل می‌دهند که نقش آن‌ها هنوز در بیماری آرتریت روماتوئید مشخص نشده است (۱). سلول‌های NK در سینوویوم تشخیص داده شده و دخالت آن در بیماری آرتریت روماتوئید مورد توجه است (۱۰).

جهت روشن تر شدن مکانیزم‌های ایمونولوژیکی در بیماری آرتریت روماتوئید مطالعه حاضر بدلیل محدودیتی که در گرفتن مایع مفصلی داشت، چند مارکر لنفوسیتی شامل  $CD3$ ,  $CD29$ ,  $CD56$  را بر روی خون بیماران آرتریت روماتوئید با فن فلوسیتومتری مورد بررسی قرار داد. این فن نقش مهمی در تحلیل پروسه‌های ایمونولوژیکی بیماری آرتریت روماتوئید می‌تواند ایفا کند (۱۱). شاخص آنتی ژنی  $CD29$  به وفور بر سطح لکوسیت‌ها و سلول‌های غیرخونی یافت می‌شود و میانجی اتصال سلول‌ها به ماتریکس خارج سلولی و نیز  $VCAM-1$  اندوتلیوم می‌شوند.  $CD29$  به احتمال زیاد یکی از پروتئین‌های سطحی اصلی می‌باشد که در لانه‌گزینی لنفوسیت‌ها در اندوتلیوم جایگاه‌های محیطی التهاب مانند سینوویوم در آرتریت روماتوئید نقش دارد. پروتئین  $CD29$  در ساختمان مارکر فعالیت دیررس<sup>۱</sup> شرکت می‌کند. این مارکر دو تا چهار هفته پس از تحریک مکرر سلول‌های T، بر سطح این سلول‌ها ظاهر می‌شود (۳).

در مطالعه حاضر جمعیت لنفوسیت‌های T و لنفوسیت‌های T که مارکر  $CD29$  را بیان می‌کردند، در خون محیطی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید در مقایسه با افراد سالم اختلاف قابل توجهی را نشان نداد، ولیکن جمعیت لنفوسیت‌های  $CD29^+$  و سلول‌های  $CD56$  افزایش چشمگیری را نشان داد. مطالعات مشابه تغییر نکردن لنفوسیت‌های T و زیر جمعیت‌های آن شامل سلول‌های  $CD4^+$  و  $CD8^+$  در خون بیماران آرتریت روماتوئید و افزایش کم لنفوسیت‌های  $CD29^+T$  در زمان حاد بیماری را نیز گزارش کرده‌اند (۱۲). در راستای تحقیق حاضر در مطالعه ای بر روی سلول‌های تک هسته ای خون محیطی با استفاده از فلوسیتومتری در بیماران آرتریت روماتوئید نشان داده شد که تعداد سلول‌های  $CD4^+CD29^+$  و سلول‌های  $CD8^+CD29^+$  نسبت به افراد نرمال افزایش دارد (۸). افزایش بیان  $CD29$  و  $HLA-DR$  بر

<sup>۱</sup> very late activation

قابل توجهی ندارد ولیکن تعداد سلول‌های NKT کاهش می‌یابد که به مطالعات بیشتری در این راستا نیاز دارد (۲۶).  
با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد که لنفوسیت‌های فعال شده که عمدتاً لنفوسیت T می‌باشد و سلول‌های NK در روند بیماری آرتریت روماتوئید نقش مهمی دارند چرا که اکثر سایتوکاین‌هایی که باعث بروز و شدت این بیماری در روند تخریب غضروف و استخوان می‌شوند به وسیله لنفوسیت T فعال شده و سلول‌های NK ترشح می‌شوند (۲۷، ۲۸). این یافته‌ها دلالت بر آن دارند که بیماری آرتریت روماتوئید رویدادی است که با واسطه پاسخ‌های ایمنولوژیکی صورت می‌گیرد.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از سرکار خانم راشین بیک پوریان جهت همکاری در آزمایشات فلوسیتومتری حاضر تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از سرکار خانم الهه جهانبخش که متحمل هزینه آزمایشات جهت پایان نامه خود شدند تشکر می‌شود.

### References:

1. Lipsky PE. Rheumatoid arthritis. In: Fauci AS, Braunwald E, Editors. Harrison's principal of internal medicine. 17thEd. New York: McGraw Hill Medical; 2008. P.2083-92.
2. Simms RW. Rheumatoid athritis. In: Andreoli TE, Carpenter CJ, Editors. Cecil essentials of medicine. 7<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. P.804-12.
3. Abbas A, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6th Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. P. 419-41.
4. Mullazehi M, Mathsson L, Lampa J, Ronnelid J. Surface-bound anti-type II collagen-containing immune complexes induce production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, and interleukin-8 from peripheral blood monocytes via Fc gamma receptor IIA: a potential pathophysiologic mechanism for humoral anti-type II collagen immunity in arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54(6):1759-71.
5. Lacki JK, Mackiewicz SH. The effect of immunosuppressive drugs on expression of

سایتوکاین‌ها نیز نقش داشته باشد. اینترلوکین ۱۵ سبب گسترش و فعالیت سلول‌های NK می‌شود. افزایش اینترلوکین ۱۵ در سرم و سینویوم مفاصل در میان بیماران آرتریت روماتوئید تشخیص داده شده است. (۲۰، ۲۱). سلول‌های NK فعال شده می‌توانند به‌عنوان سلول‌های عرضه کننده سوپر آنتی ژن سبب تحریک غیراختصاصی لنفوسیت‌های T شوند (۲۲). کاهش سلول‌های NK در نوجوانان مبتلا به آرتریت روماتوئید گزارش شده است (۲۳). در بیماری روماتوئید سیستمیک نوجوان کاهش سایتوتوکسیتی سلول‌های NK نیز گزارش شده است (۲۴). اخیراً فعال شدن سلول‌های NK که مارکر CD54 را بیان می‌کردند و ارتباط آن با پاسخ‌های کلینیکی در بیماران آرتریت روماتوئید نشان داده شده است (۲۵). جمعیت کوچکی از لنفوسیت‌ها را در خون محیطی سلول‌های NKT تشکیل می‌دهد این سلول‌ها دارای هر دو مارکر سطحی CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> را دارا می‌باشند (۳). در مطالعه ای بر خلاف تحقیق حاضر نشان داده شد تعداد سلول‌های NK در خون محیطی بیماران آرتریت روماتوئید در مقایسه با افراد سالم اختلاف

- surface antigens of lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Pol Arch Med Wewn* 1997; 97(2): 134-43.
6. Lacki JK, Schochat T, Sobieska M, Leszczynski P, Wiktorowicz K, Mackiewicz U. Immunological studies in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate or cyclophosphamide. *Z Rheumatol* 1994; 53(2):76-82.
  7. Hidaka T, Suzuki K, Matsuki Y. Changes in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes subsets in circulating blood and synovial fluid following filtration leukocytapheresis therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Ther Apher* 1999; 3(2):178-85.
  8. Markejjevic J, Marusic M, Uzarevic B. T cell subset composition in remission phase of systemic connective tissue diseases. *J Clin Lab Immunol* 1991; 35(1): 33-9.
  9. Brennan FM, Foey AD, Feldmann M. The importance of T cell interactions with macrophages in rheumatoid cytokine production. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 305: 177-94.

10. Namkawa T, Snyder MR, Yen JH, Goehring BE, Leibson PJ, Weyand CM, et al. Killer cell activation receptors function as costimulatory molecules on CD4/CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2000; 165:1138-45.
11. Lewis DE, Barron KS, Miller GP, Rich RR. Multiparameter analysis of human lymphocyte subpopulations using flow cytometry. *Surv Synth Pathol Res* 1985; 4(3): 234-47.
12. Lacki JK, Korzowska I, Mackiewicz SH. Quantitative changes in peripheral blood lymphocytes in erosive rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate correlation with disease activity. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1999; 9(2):96-100.
13. Silverman ED, Isacovics B, Pestche D, Laxer RM. Synovial fluid cells in juvenile arthritis: evidence of selective T cell migration to inflamed tissue. *Clin Exp Immunol* 1993; 91(1): 90-5.
14. Jiao Z, Wang W, Jia R, Li J, You H, Chen L, et al. Accumulation of FoxP3-expressing CD4+ CD25+ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2007; 36(6): 428-33.
15. Sempere-Ortells JM, Pérez-García V, Marín-Alberca G, Peris-Pertusa A, Benito JM, Marco FM, et al. Quantification and phenotype of regulatory T cells in rheumatoid arthritis according to disease activity score-28. *Autoimmun* 2009; 42(8):636-45.
16. Skapenko A, Lipsy PE, Schulze-Koops H. T cell activation as starter and motor of rheumatic inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 305: 95-211.
17. Cush JJ, Pietschmann P, Oppenheimer-Marks N, Lipsky PE. The intrinsic migratory capacity of memory T cells contributes to their accumulation in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1992; 35(12): 1434-44.
18. Mertens AV, de Clerck LS, Moens MM, Bridts CH, Stevens WJ. Lymphocyte activation status, expression of adhesion molecules and adhesion to human endothelium in rheumatoid arthritis relationship to disease activity. *Res Immunol* 1994; 145(2): 101-8.
19. Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T. Stimulation of T cell auto reactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U SA* 2003;100: 945-57.
20. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2004; 25: 47-52.
21. Mendes R, Browelow KW, Westby M, Galea-Lauri J, Smith IE, O'Brien ME, et al. Flow cytometric isolation of cytokine production by CD3-CD56+NK cells and CD3+CD56+NK-T cells in whole blood. *Cytometry* 2000; 39: 72-8.
22. D'Orazio JA, Stein-Streileni J. Human natural killer (NK) cells present taphylococcal enterotoxin B (SEB) to T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1996; 104:366-73.
23. Wouters CHP, Ceuppens JL, Stevens EAM. Different circulating lymphocyte profiles in patients with different subtypes of juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: 239-48.
24. Villanueva J, Lee S, Giannini EH, Graham T, Passo MH, Filipovich A, et al. Natural killer cell dysfunction is a distinguishing feature of systemic onset juvenile rheumatoid arthritis and macrophages activation syndrome. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 30-7.
25. Lurati A, Marrazza G, Re KA, Scarpellini M. Relationship between NK cells activation and clinical response in rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Int Biomed Sci* 2009; 5(2): 92-5.
26. Yanagihara Y, Shiozawa K, Takai M, Kyogoku M, Shiozawa S. Natural killer (NK) T cells are

- significantly decreased in the peripheral blood of patients with rheumatoid (RA). *Clin Exp Immunol* 2000; 118:131-6.
27. Iking-Konert C, Ostendorf B, Sander O, Jost M, Wagner C. Trans differentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(10):1436-42.
28. Dalbeth N, Gundle R, Davies RJ, Lee YC, McMichael AJ, Callan MF. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol* 2004; 173(10): 6418-26.