

בעבודה זו, נבחנו השפעת התרופה הסטנדרטית MTX והשפעת התרופות האימוניות מהדור החדש-נוגדי TNF, על חולי דלקת מפרקים שגרונתית המטופלים בביה"ח תל השומר. בחנו את מנגנון פעילותן האפשרי של התרופות הללו כמו גם את השפעתן האימונית על תאים מונוקלארים בכלל ולימפוציטים מסוג CD4 בפרט. כאמור, חולים אילו מאופיינים בשגשוג יתר של לימפוציטים הן בסינביום שבין המפרקים והן בדם הפריפריאלי.

בבואנו לבחון את השפעת הטיפול השונים: MTX בלבד והטיפול המשולב המכיל את ה-MTX הסטנדרטי ובנוסף לו מעכבי TNF מהדור החדש, על התהליך האפופטוטי בתאים מונוקלארים שהופקו מהדם הפריפריאלי של החולים, מצאנו כי רק בקבוצת הטיפול המשולב התקבלה עלייה מובהקת רבה באפופטוזיס (38%) בהשוואה לתאי חולים שאינם מטופלים. ניכר כי קיימת השפעה אפופטוטית של תרופת ה-MTX בלבד בחולים המטופלים בה אם כי אינה מובהקת. (יש לציין כי בעבודה קודמת במעבדתנו בה נבדקו חולי RA אחרים, התקבלה השפעה מובהקת של תרופת הסטנדרט על התהליך האפופטוטי. כמו כן, קבוצת 6 חולים נדירה אשר טופלה רק בנוגדי TNF הציגה גם כן עלייה בתהליך האפופטוטי, אם כי אינה מובהקת. מתוצאות אילו ניכר כי הן לתרופת הסטנדרט והן למעכבי הציטוקין, השפעה מעודדת על התהליך האפופטוטי וניכר כי השפעה זו אדדטיבית בקבוצה המטופלת בטיפול המשולב. אנו מניחים כי ההשפעה האפופטוטית של MTX נתרמת בחלקה הודות למולקולות המחמצנות המגורות על ידה (ROS, NO), ויתכן כי לנוגדי ה-TNF השפעה סטימולטורית שונה (היות ולא מצאנו גירוי ליצירת ROS). מחקרים אחרים מציעים כי נוגדי TNF מעודדים אפופטוזיס כתוצאה מאינדוקציה של Caspase 3, אנזים מפתח בתהליך האפופטוטי, אנזים זה הוכח כמשופעל במודלים שונים ע"י נוגדי TNF שונים כדוגמת ה-Thalidomide (אנטי TNF) שהשרה אפופטוזיס בשורת תאי לוקמיים () או Adalimumab שהשרה אפופטוזיס במונציטים () ועוד. בעתיד נבחן האם נוגדי ה-TNF שנבחנו בעבודה זו () משרים אף הם אפופטוזיס בלימפוציטים של חולי RA דרך ה-Caspase 3.

עבודות קודמות במעבדתנו אשר בחנו את מנגנון הפעולה המשוער של MTX, הציגו כי ההשפעה האפופטוטית של התרופה על תאים מונוקלארים, מושרית כנראה ע"י יצירה של רדיקלים חופשיים מסוג ROS. השפעות של מולקולות ROS על מטבוליזם תאי הוכחו במערכות רבות (שבץ, התקף לב, מחלות אוטואימוניות שונות) ובמיוחד כמשרים מוות מתוכנן קרי אפופטוזיס.

ROS - ידועות השפעות נוספות כמו השריית עקה חימצונית (Oxidative Stress) במחלות כמו טרשת עורקים, פרקינסון, אלצהיימר ותסמונת העייפות הכרונית (). נמצא כי עקה חימצונית קלה ע"י ROS עשויה לגרות אפופטוזיס, ואילו עקה חימצונית חמורה עשויה לגרות נקרוזיס (). רדיקלים אלו נמצאו גם כמעבירים אותות תאיים (Redox Signaling בסכיזופרניה ודלקות שונות (,) .

בעבודה הנכחית בחנו את השפעת הטיפולים השונים, על היצירה התוך תאית של רדיקלים חופשיים ע"י תאים מונוקלארים שהופקו מדם פריפריאלי של חולי RA. מצאנו כי ללימפוציטים של קבוצת החולים המטופלים ב-MTX בלבד, הייתה יכולת מובהקת להשרות יצירה של ROS, עלייה של 13% יחסית לתאי החולים בקבוצה הלא מטופלת. ואילו בלימפוציטים של קבוצת הטיפול המשולב, לא ניכרה השפעה מעודדת על יצירת הרדיקלים מעבר לרמה שנצפתה בלימפוציטים של קבוצת החולים הלא מטופלים. אנו מניחים כי לנוגדי ה-TNF המרכיבים את הטיפול המשולב יש השפעה אימונומודולטורית שונה מתרופת הסטנדרט MTX בלבד, בה נדון בהרחבה בהמשך הפרק.

ראוי לציין כי בתאי המודל המשמשים לביקורת, הן בתאים מונוקלארים שהופקו מדם פריפריאלי של מתנדבים בריאים והן בשורת תאי T הומאניים, בהם MTX ניתן *in vitro*, ניכרה השפעה מתגברת של MTX על יצירת ROS, דומה לזו שנצפתה בתאי החולים של קבוצת הטיפול ב-MTX – בלבד.

המשך מחקרנו בדק לראשונה את השפעת הטיפולים השונים על יצירת הרדיקל החופשי NO. גם למולקולה זו נמצאו תפקידים בתהליכי העברת אותות במצבים פיזיולוגיים ופתולוגיים כאחד. רמות

מתנות של הרדיקל נמצאו כמשרות התמוטטות כלי דם כמו בהלם ספטי (זיהומי), ואילו רמות כרוניות שלו נמצאו במחלות כמו סוכרת, טרשת נפוצה, קרצינומה בילדים ועוד (). ה- NO מיוצר באופן טבעי ע"י מונוציטים כחלק מהתגובה החיסונית. לציטוקינים כמו TNF ו-IFN γ יכולת לשפועל את האנזים Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) הנמצא בפגוציטים כמו מונוציטים ליצירת NO ().

בעבודה זו מצאנו כי בלימפוציטים שהופקו מחולים המטופלים ב-MTX בלבד וגם באילו שהופקו מחולים המטופלים בטיפול המשולב, יש יכולת מתגברת מובהקת דומה של יצירת NO יחסית לתאי חולים שאינם מטופלים. אנו מניחים כי יתכן של-NO הנוצר בתאי חולים המטופלים ב-MTX בלבד, יש השפעה אפופטוטית כפי שנמצא בתאים רבים: מאקרופאגים מפרטינאום של עכברים (), מיטוכונדריות של מאקרופאגים (), אסטרוציטים () ופיברובלסטים ().

אנו משערים כי מקור ההשפעה של רמות ה-NO המתגברות שנמצאו בחולים המטופלים בטיפול המשולב הוא ב-MTX, מהסיבות הבאות: ראשית, בשני החולים אשר טופלו בנוגדי TNF בלבד ונבדקו, לא נמצאה השפעה מובהקת של נוגדי ה-TNF על יצירת המולקולה NO. יתכן שאם היינו מעבים קבוצת ניסוי זו היינו מצליחים להסיק בוודאות האם נוגדים אלו משפיעים על יצירת המולקולה NO. אך חולים המקבלים נוגדי TNF בלבד הם נדירים מאוד, על כן לא הצלחנו לעבות קבוצה זו. הסיבה השנייה, כפי שמתוארת במודלים אחרים בספרות, היא יכולת הציטוקין TNF לשפועל NO synthase ליצירת NO. כאשר אנו מנטרלים ציטוקין זה באמצעות נוגדים כנגדו, טבעי שרמת הייצור של המולקולה תקטן. מעניין לציין כי בתאי המודל בהם בחנו את יצירת ה-NO - ע"י תאים מונוקלארים שהופקו מדם פריפריאלי של מתנדבים בריאים וע"י שורת תאי, אשר טופלו in vitro ע"י MTX, ניכרה השפעה מעכבת על יצירת המולקולה בהשוואה לקבוצת הביקורת של תאים שאינם מטופלים. יתכן והשוני הינו תוצאה של משך זמן החשיפה לתרופה הידוע כמשמעותי במקרה דנן (). כל החולים שנבדקו נחשפו לתרופת ה-MTX במשך שלושה חודשים לפחות, ואילו תאי המודל נחשפו לתרופה במשך 24 שעות.

בהמשך עבודתנו, התרכזנו ביכולת הטיפולים השונים להשפיע על מרקרים האופייניים לתתי אוכלוסיות הלימפוציטים מסוג T. עבודתנו התבססה על ממצאים קודמים המציגים העדר איזון אימוני במחלה זו, כאשר הפרופיל המוצע במחלה הינו של ציטוקינים מסוג Th1 (,). פרופיל זה נמצא הן בתאים מונוקלארים של חולים והן בתאים דנדריטים ובתאים שהופקו מרקמה סינוביאלית של חולים אילו (). מחלות כרוניות אוטואימוניות אחרות כמו טרשת נפוצה וסוכרת מסוג 1 גם מוצגות במחקרים אימוניים כמחלות בעלות דומיננטיות של לימפוציטים מסוג Th1. מחקרים אימונולוגיים רבים מציעים כי יתכן שלחוסר האיזון האימוני במחלות אילו יש חלק בפתוגנזה שלהן ().

אף על פי שהפתוגנזה של מחלת ה-RA אינה מובנת דיה, ברור שללימפוציטים מסוג Th1 יש תפקיד מרכזי באוטואימוניות של המחלה. לימפוציטים פעילים רבים כאלו נמצאו באתר הדלקת וטיפולים ישירים כנגד תאים אלו " T cell- directed therapies" הציגו שיפור קליני. מחקרים שהוצגו לאחרונה מציעים כי לתאי T מעורבות סיסטמית במחלה מעבר לזיהוי האנטיגני במפרקי החולים כפי שהוצג ().

בעבודה זו ניסינו לברר כיצד הטיפולים השונים משפיעים על הפרופיל האימוני של לימפוציטים בכלל ועל הפרופיל האימוני של תאי T עזר (T helper), המאופיינים ע"י ביטוי המולקולה CD4, בפרט. בחרנו זוג רצפטורים לכמוקינים CXCR3: CCR4-1 ו-2-1 Th2-1 IL- בתאמה. בנוסף, בחרנו לבחון את השפעת הטיפולים השונים על זוג הרצפטורים לציטוקינים: IL-4R-112R גם הם כמייצגי תתי אוכלוסיות הלימפוציטים Th1 ו-2 Th בתאמה. (שני זוגות רצפטורים אילו מוצגים על גבי לימפוציטים מסוג T: הן CD4+ והן CD8+).

לאחרונה, נמצאה פריסה הטרוגנית של הסמנים CXCR3 ו-CCR4 במחלות דלקתיות שונות כמו ליפת ריאתית, מחלות קולגן וסקולריות, חולשת שרירים חמורה וספחת מסוג פלאק ().

בחולי דלקת המפרקים שבדקנו, מצאנו כי לימפוציטים של חולים בקבוצת הטיפול המשולב הציגו ירידה מובהקת (68%) בסמן CXCR3 המאפיין תאי Th1 ועלייה קלה אשר אינה מובהקת בסמן תת האוכלוסייה CCR4 - Th2, בהשוואה ללימפוציטים של חולים שאינם מטופלים. יתר על כן, תופעה דומה ומשמעותית נצפתה גם בצפייה במרקרים הללו בתוך אוכלוסיית הלימפוציטים המבטאים CD4 בקבוצת החולים המטופלים בטיפול המשולב, ניכרה ירידה מובהקת בביטוי (72% CXCR3) ועלייה מובהקת בביטוי (65% CCR4). תוצאות אילו מחזקות את ממצאינו באוכלוסיית הלימפוציטים הכללית אשר הציגו שינוי משמעותי במאזן האימוני בחולים המטופלים בטיפול המשולב.

לשמחתנו, בקבוצת הטיפול המשולב (9 חולים), קיבלנו את היחס הנמוך ביותר בין פריסת הסמנים CXCR3/CCR4 (Ratio=0.34), תוצאה המרמזת על איזון אימוני המתקבל בחולים אילו. ראוי לציין כי חולים אשר קיבלו רק את תרופת הסטנדרט MTX הציגו פער גבוה בין שני הסמנים המאפיינים את שתי תתי אוכלוסיות הלימפוציטים, (Ratio=0.53) פער שהיה קרוב לפער שהתקבל אצל הלימפוציטים של החולים הלא מטופלים (Ratio=0.64). כמו כן, גם בפריסת הסמנים CD4+CCR4/CD4+CXCR3+ (Ratio=0.2) לעומת תאי הביקורת של חולים שאינם מטופלים (Ratio=2).

ממצאים אילו משלימים עבודות אחרות כמו של Norii M ושותפיו () אשר הציגו לאחרונה גיוס סלקטיבי של תאים המבטאים פנוטיפ של CD4+ CXCR3 + ו- CCR5+CD4+ ברקמת הסנוביום של חולי RA שאינם מטופלים ומעט תאים בעלי פנוטיפ של CD4+ CCR4+. קבוצה זו כמו גם קבוצתו של Krystufkova OK (), מציעות כי תאים אילו מגויסים מן הדם הפריפריאלי אל הסינוביום באמצעות כמוקנים אשר יתכן ומעורבים גם במשיכתם וגם בשפעולם. לכמוקנים כמו Mig, Mip-1, Mip-1 beta ו- IP-10 תיתכן השפעה על הגיוס הסלקטיבי של תאי T אילו מן הדם אל הסינוביום ().

עבודה אחרת מציגה כי תאי פיטום (Mast Cells) רבים בסינוביום החולים בעלי פנוטיפ של CXCR3, מגויסים מן הדם הפריפריאלי אל הסינוביום ().

מאמר בודד מציג כי חולים המטופלים בנוגדי TNF בלבד הציגו עלייה בתאים המבטאים CXCR3 לאחר 6 עד 14 שבועות של טיפול. בחולים אילו לא ניכר שינוי ברמת ה-CCR4, תוצאה אשר התקבלה גם במעבדתנו בשתי קבוצות הטיפול ובקבוצה שאינה מטופלת. אנו מניחים כי השינוי הפנוטיפי שהתקבל בעבודה זו הינו תלוי שתי התרופות האימונומודולטוריות שקיבלו חולים אילו. תופעה זו מקבלת חיזוק גם מממצאינו הקודמים בהם הוכחנו כי רק הקבוצה המטופלת בטיפול המשולב הצליחה להעלות באופן מובהק את אחוז התאים האפופטוטיים.

נראה כי לתרופות נוגדות TNF יש השפעה ישירה על יצירת הכמוקנים, ו/או השריית ביטוי ליגנדים כמו CXCR3. במספר מודלים נמצא כי ל-TNF יש יכולת להגביר את ביטוי CXCR3. בפיברובלסטים שנלקחו מסינוביום של חולי RA נמצא כי עירור שלהם ע"י ציטוקינים כמו IFN γ ו-TNF גרם לביטוי מוגבר של CXCR3 ו-CCR5 (). כנראה שהשפעה הסינרגיסטית של ציטוקינים אילו חשיבות ביצירת הכמוקנים בסינוביום (ueno 2005). על סמך הממצאים הללו ניתן להניח כי נוגדי TNF מורידים את ביטוי כמוקנים אילו, כפי שמצאנו בעבודתנו.

בניסיונות הבאים בחנו שני רצפטורים נוספים: IL-12R ו-IL-4R המייצגים את שתי תתי אוכלוסיות הלימפוציטים Th1 ו-Th2 בהתאמה. כאשר נבחנה אוכלוסיית הלימפוציטים כולה, נמצאה ירידה מובהקת בביטוי (54% IL-4R) בקבוצת החולים אשר קיבלו את הטיפול המשולב לעומת הקבוצה שאינה מטופלת. לעומת זאת, בבחינת תת אוכלוסיית CD4 בקבוצת החולים המטופלת בטיפול

המשולב, נצפתה תופעה הפוכה של עלייה בביטוי (78% IL-4R), יחסית לתאים שאינם מטופלים, ממצא המעיד על הפרת האיזון האימוני לכיוון של Th2. הבדל נוסף, ניכר בביטוי הרצפטור לציטוקין IL-12R. בעוד שבאוכלוסיית הלימפוציטים הכללית לא ניכר הבדל מהותי בביטוי הרצפטור לציטוקין בין קבוצות החולים השונות, בבחינת תת אוכלוסיית CD4 בקבוצת הטיפול המשולב נמצאה ירידה מובהקת בביטוי (66%) לעומת הקבוצה שאינה מטופלת. אנו מניחים כי אוכלוסיית תאי CD4 היא הדומיננטית במחלה ועוברת מודולציה בעקבות הטיפול האימונומודולטורי. מעניינת התופעה שנצפתה באומדנו את היחס בין IL-12R/IL-4R, כאשר הפעם בניגוד לתוצאות שהוצגו קודם לכן, היחס הגדול ביותר התקבל בחולים המטופלים המשולב (Ratio = 3.2) לעומת החולים שאינם מטופלים (Ratio = 1.2). ואילו באוכלוסיית תאי CD4, היחס הקטן ביותר בין CD4+IL-12R+/CD4+IL-4R (Ratio = 2.5) לעומת הקבוצה שאינה מטופלת (Ratio = 18).

הממצא המובהק של היחס הפנוטיפי השונה שהתקבל בקבוצות השונות, עשוי לסייע רבות בבחינת יעילות הטיפול לפני נתינתו. מגמה זו של "Personalized Therapy" המתבססת על חיזוי השפעה תרופתית במערכת In Vitro (תאים מונוקלארים שהופקו מדם פריפריאלי) עשויה לתת מענה לחולים ולצוות הרפואי המתלבטים אודות יעילות הטיפולים השונים בחולים אילו. אנו בעתיד ננסה לבחון פרמטרים אימוניים נוספים אשר עשויים לחזות את האופטימאליות של טיפולים שונים.

במהלך המחקר, גילינו כי לחלק ניכר מחולי RA יש שתי תתי אוכלוסיות לימפוציטים ברורות. כפי שנצפה במכשיר FACSscan flow cytometer, שתי תתי אוכלוסיות הלימפוציטים נבדלות בגודלן ובגרונולריות שלהן. בניסיונות הבאים בחנו האם ניכר הבדל בביטוי הרצפטורים שנבחנו בעבודה זו בין שתי תתי האוכלוסיות.

התוצאות מצביעות על כך שבחלק מהחולים שנבדקו, הלימפוציטים הגדולים (Blasts) הציגו באופן הניכר ביותר את הפנוטיפ הנבדק, יחסית לביטוי אותו פנוטיפ בקבוצת הלימפוציטים הקטנים (Small Lymphocytes) באותו חולה. תופעה זו הייתה משמעותית במיוחד בביטוי הפנוטיפים IL-12R, CXCR3, ו-IL-4R. מעניין כי בביטוי הפנוטיפ CCR4 לא ניכרה תופעה דומה. אנו מניחים כי הלימפוציטים הגדולים הם התאים המשופעלים, אשר פגשו את הגורם האוטואימוני ולכן הביטוי הפנוטיפי אצלם הינו המשמעותי ביותר יחסית לאוכלוסיית הלימפוציטים הקטנים שיתכן שהם עדיין נאיביים. יתכן כי הלימפוציטים הגדולים הם המסתננים מן הדם הפריפריאלי אל הסינוביום באמצעות הכמוקנים ומעורבים בתהליך הדלקתי והאימוני כאחד. השערה זו תבחן בקפידה במחקר שיערך בעתיד במעבדתנו.

יתר על כן, בעבודה קודמת במעבדתנו מצאנו כי בחולים אשר הציגו שתי תתי אוכלוסיות לימפוציטים: גדולים וקטנים, ההשפעה האפופטוטית של תרופת הסטנדרט MTX הייתה בעיקר על הלימפוציטים הגדולים. יתכן כי התאים המשופעלים הם המהווים אתר מטרה לטיפול המשולב של החומרים האימונומודולטורים שנבדקו בעבודה זו (MTX ו-TNF). ואילו ההשפעה הקלינית המעודדת שנצפתה עבורם, היא בחלקה הודות להשפעה האפופטוטית. מחקר שיערך בעתיד במעבדתנו יבחן את הטיפולים השונים והשפעתם האפופטוטית על שתי תתי אוכלוסיות הלימפוציטים.

המשך מחקרנו בחן את התאים האימוניים בקבוצות החולים השונות באופן ייחודי ופרטני. במעבדתנו פותח מנשא לתאים חיים בעל יתרונות רבים. ע"י שימוש במיקרוסקופ והטענת התאים על גבי מנשא התאים החיים, מתאפשרים צפייה ומעקב ארוך טווח אחר התא האינדיווידואלי, וביצוע מדידות חוזרות ובו-זמניות של מספר משתנים באופן ציטומטרי בתאים האינדיווידואליים בקרב האוכלוסייה. יש לציין כי בעבודתנו עם המנשא הייחודי והחדש התגלו מדי פעם בעיות טכניות אשר הינן פרי פיתוחו של מנשא זה. אי לכך, לא הצלחנו תמיד לעבות את כל קבוצות הניסוי ולהציג את כל התוצאות שנבחנו בצורה שוטפת במכשיר FACSscan flow cytometer.

כאשר בחנו את ביטוי זוגות הרצפטורים לכמוקינים והרצפטורים לציטוקינים בלימפוציטים של קבוצות החולים השונות, ע"י צפייה במיקרוסקופ בתאים שהוטענו ע"ג המנשא, התקבלו תוצאות דומות לתוצאות שהתקבלו בהרצה במכשיר FACSscan flow cytometer. ניכר כי ביטוי הרצפטור לכמוקין CXCR3 ירד באופן ניכר (52%) באוכלוסיית התאים שהופקה מחולים בקבוצת הטיפול המשולב. תוצאה זו מקבילה לירידה הניכרת (68%) שנצפתה באותם תאים אשר נמדדו בFACS. - לא ניכר שינוי בביטוי הרצפטור לכמוקין CCR4 בקבוצות החולים השונות שנצפו במיקרוסקופ ע"ג מנשא התאים החיים. תוצאה זו אינה סותרת את ממצאינו ב-FACS, בהם נרשמה עלייה קלה אם כי אינה מובהקת בביטוי רצפטור לכמוקין זה. נתון מעניין נוסף אשר נבחן באנליזה מיקרוסקופית לתאים הנמדדים ע"ג המנשא, מתייחס לעוצמת הביטוי של CCR4. מצאנו כי עוצמת הביטוי של CCR4 באוכלוסיית T עזר המבטאת CD4 גבוהה באופן מובהק מעוצמת ביטוי באוכלוסיית הלימפוציטים הכללית. תופעה זו נצפתה הן בקבוצת החולים הלא מטופלים והן בקבוצה המטופלת בטיפול המשולב.

כאשר בחנו את התאים השונים ע"ג המנשא הייחודי התמקדנו במדד נוסף: שטח התא, הניתן למדידה מדויקת ע"ג המנשא באופן פרטני פר תא. להפתעתנו, מצאנו כי שטח התאים המבטאים את הרפרטואר של Th1 קרי CXCR3 + CD4 גדול באופן ניכר משטח תאי CD4 - שאינם מבטאים CXCR3. ממצא תומך ומקביל נוסף שנמצא בבחינת התאים ע"ג המנשא, הוא שטח תאים גדול יותר בתאים המבטאים CD4 + IL-12R, שוב רפרטואר של לימפוציטים מסוג Th1, מאשר בתאי CD4 שאינם מבטאים IL-12R. שני ממצאים אילו תומכים זה בזה ובמצאים שנמצאו במחקרים אחרים בהם האוכלוסייה השולטת במחלה הינה Th1, וכנראה היא ההופכת ל-Blasts ומגורה ע"י האנטיגן העצמי (). לימפוציטים גדולים (Blasts) המציגים פרופיל אימוני של Th1 נמצאו במודלים רבים כמו בלוטות לימפה (), תאי סרטן () ועוד.

ראוי לציין כי שטח התא הגדול של הלימפוציטים המבטאים ליגנדים האופייניים ל-Th1 אינו סותר את הממצאים שהתקבלו ובהם ניכרת ירידה משמעותית בביטוי הרצפטור לכמוקין CXCR3. הלימפוציטים הגדולים שעליהם נמצאו סמנים לאוכלוסיית ה-Th1 מחזקים את ממצאינו הקודמים וממצאים של חוקרים אחרים המוכיחים דומיננטיות של תת אוכלוסיה זו של לימפוציטים (,).

ממצאים אחרונים בעבודה זו מציגים את יתרונו הבולט של מנשא התאים הפרטני שפותח במעבדתנו, פיתוח המאפשר מעקב בזמן אחר מספר פרמטרים או סמנים בתאים אינדיווידואליים. מצאנו קורלציה מובהקת בין שטח התא כלומר גודלו לבין יכולתו להפריש Nitric Oxide. תוצאה זו חזרה על עצמה ב-308 תאי חולים המטופלים ב-MTX אשר נצפו ונמדדו. בעתיד נבחן קורלציה זו בתאי חולים נוספים הן מקבוצת דלקת מפרקים שגרנית והן מחלות אוטואימוניות נוספות. יתר על כן, כאשר בחנו תאי חולים אילו המבטאים את הרצפטור לציטוקין IL-4R נמצאה אף בהם אותה קורלציה מעניינת בין שטח התא ויכולתו להפריש NO. ניתן להניח כי דווקא ללימפוציטים הגדולים המשופעלים יש יכולת מוגברת לייצר NO, תופעה שנצפתה במודלים נוספים כמו תאים סרטניים של ארנבת (,). השאלה המרכזית הינה האם יצירת NO היא בין הגורמים לשפעול התא או שיש לה תפקיד בהעברת הסיגנל האפופטוטי שנמצא בקבוצת חולים אילו. כפי שצוין קודם לכן, מחקרים רבים מציגים את יכולת ההשפעה השונה של רדיקל זה, יכולתו לבקר שגשוג תאי T ויצירת ציטוקינים מחד כמו גם השראת מוות אפופטוטי מאידך (). ההשפעות הביולוגיות השונות של רדיקל זה ידועות כנגרמות כתוצאה מהאינטראקציה שלו עם מגוון חלבוני מטרה הכוללים קבוצה מטלית או טיולית וממוקמים באתרי הפעילות (). חלבוני מטרה אילו כוללים תעלות יוניות, טרנספורטים, אנזימים ו-G חלבונים כמו גם פקטורי שעתוק המעורבים בתהליכים אפופטוטיים (,). מחקר עתידי יבחן את הקשר הישיר האפשרי בין היצירה של הרדיקל להשריית התהליך האפופטוטי, ויברר מיהו חלבון המטרה בתאים אילו. יתכן והרצפטור IL-4R, הינו אחד מהחלבונים המעורבים באופן ישיר או עקיף באתר הפעילות של NO.

עבודה זו מציגה שתי מסקנות חשובות . האחת ברמה האימונית, ניכר כי לטיפול המשולב בחולים אוטואימוניים מסוג דלקת מפרקים שגרונית יש השפעה מאזנת על הדומיננטיות של תת אוכלוסיית Th1 במחלה זו. והשנייה ברמה הטכנית, ניכר כי למנשא התאים הייחודי יתרון בבחינת הפרמטרים האימוניים התוך תאיים והחוץ תאיים בחקירת מחלות אוטואימוניות בכלל ו- RA בפרט ודרכי הטיפול בהן.