

ارزیابی تغییرات فنوتیپ لنفوسیتی در خون محیطی بیماران مبتلا به آفت عودکننده دهانی

• دکتر مهدی عبدالهی نژاد

•• دکتر احمد مسعود

چکیده

آفت راجعه دهانی وضعیتی است دردناک که ۱۲-۱۰ درصد جمعیت دنیا از آن رنج می‌برند. شواهد قابل توجهی مبنی بر ارتباط پاسخهای ایمنی با آفت راجعه دهانی و نقش این پاسخها خصوصاً پاسخ ایمنی سلولی در پاتوژنر ضایعات آفتی در دست می‌باشد. مطالعه حاضر با تکیه بر این پیش فرض، در مورد فنوتیپ لنفوسیتی در بیماران مبتلا به آفت راجعه طی مراحل فعال و بهبودی بیماری، به تحقیق پرداخته است. نتایج بررسی ما نشان می‌دهد که سلولهای $CD4^+$ (سلولهای T کمکننده) طی مرحله فعال بیماری نسبت به افراد طبیعی دچار کاهش می‌شوند. ($p < 0.05$) تغییرات با اهمیتی در جمعیت‌های لنفوسیتی $CD3^+$ (جمعیت سلولی T) و $CD8^+$ (سلولهای T سایتوتوکسیک) ضمن مقایسه بیمار، در زمان فعال بیماری و افراد طبیعی دیده نشد. نسبت $CD4/CD8$ دچار کاهش می‌شود ($p < 0.05$) سلولهای $CD16^+$ (سلولهای کشنده طبیعی) طی فاز فعال بیماری دچار افزایش می‌شوند ($p < 0.05$). سلولهای $CD19^+$ نیز طی فاز فعال بیماری افزایش تقریباً قابل ملاحظه‌ای را نشان دادند ($0.05 < P < 0.1$).

مقدمه

در اکثر نقاط دنیا آفت از جمله شایعترین بیماریهای زخمی راجعه مخاط دهان بشمار می‌آید که اطلاعات اندکی در مورد اتیولوژی آن در دسترس می‌باشد. با وجودی که اصطلاح آفت برای سادگی کار به حضور یک زخم نامشخص نسبت داده می‌شود ولی ممکن است بیماری آفت راجعه دهانی بعنوان یک ضایعه محدود به مخاط یا جزئی از یک بیماری وزیکولوالسراتیو باشد که چندین ارگان را نیز درگیر کرده باشد. مشکل در تثبیت قطعی طبیعت ضایعه، وجود نماهای هیستولوژی غیراختصاصی زخمها و نیز عدم دستیابی به یک عامل، چه با منشأ داخلی، چه با منشأ خارجی، بعنوان مسبب ایجاد ضایعه می‌باشد.

با توجه به گزارشات قابل توجهی که در مورد مکانیسم‌های

اتیولوژیک بعنوان عامل ایجاد آفت وجود دارد به نظر می‌رسد پاتوژن‌زایمونولوژیک این بیماری بیشتر مشخص شده و بعنوان اتیولوژی قابل قبولتر باشد.^[۱۶] مطالعات هیستوپاتولوژیکی و ایمونولوژیکی دخالت مستقیم ایمنی با واسطه سلولی در بیماری آفت راجعه دهانی را مشخص نموده‌اند.^[۱۵] مطالعات میکروسکوپی ضایعات قبل از ایجاد آفت یا زخم وضعیت موضعی تشکیل حفره و دژنراسیون سلولهای اپی‌تلیال فوق پایه به همراه ارتشاح سلولهای تک هسته‌ای، عمدتاً لنفوسیتی در لامینا پروپریا را مشخص کرده است.^[۱۵] در قسمتهای عمیقتر ضایعه ارتشاح سلولی عمدتاً توزیع دور عروقی داشته و الگوی مشابه بعضی واکنشهای ازدیاد حساسیت نوع چهارم

♦ دندانپزشک - متخصص ایمونولوژی

♦ استاد گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تهران

بهمکاری خود ادامه دادند که از این تعداد ۱۱ نفر را خانمها و ۱۹ نفر بقیه را آقایان تشکیل دادند. متوسط سنی بیماران مرحله اول ۲۷/۶ بود که بیماران در فاصله سنی ۱۴-۵۲ سال قرار داشتند. و متوسط سنی بیماران مرحله دوم ۲۷/۳ بود که فاصله سنی آنها بین ۱۶-۵۲ سال بود. تعداد ۳۰ نفر نیز در محدوده سنی ۲۰-۵۵ سال بدون هیچگونه سابقه‌ای از آفت بعنوان کنترل طبیعی انتخاب شدند.

برای بررسی فنوتیپ لنفوسیتی خون محیطی از روش فلوسایتومتری با استفاده از آنتی‌بادیهای مونوکلونال کونژوگه استفاده شد. آنتی‌بادیهای مونوکلونال مورد استفاده از این قرار بودند:

آنتی‌بادیهای مونوکلونال دو رنگی CD3/CD16 (برای ردیابی سلولهای NK)، CD3/CD19 (برای شناسایی سلولهای B)، CD4/CD8 (برای شناسایی سلولهای T کمکی و سایتوتوکسیک) و CD45/14 (برای شناسایی محدوده لنفوسیت‌های خون محیطی). مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از خون غیرلخته به‌مراه ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادیهای مونوکلونال در لوله‌های مجزا ریخته شده بمدت نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس ۳ سی‌سی محلول تخریب‌کننده گلبول قرمز به لوله‌ها اضافه شد. پس از ۱۳ دقیقه لوله‌ها در ۳۰۰g بمدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از آن دو مرحله شستشو توسط PBS^۴ در ۳۰۰g انجام شد. نمونه‌های آماده شده جهت قرائت به دستگاه فلوسایتومتری منتقل شدند.

نتایج

نتایج بدست آمده از بیماران در مرحله اول نمونه‌گیری (مرحله فعال بیماری) با نتایج حاصله از افراد طبیعی مقایسه گردید که در جداول زیر ملاحظه می‌شوند.

دارند.^[۱۵] پاسخهای ترانسفورماسیون لنفوسیتی نسبت به میتوزنها در بیماران آفتی بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش نشان می‌دهند.^[۳] بنابراین پیشنهاد می‌شود که یک نقص و ناهماهنگی در زیر جمعیت‌های سلولهای ایمنی وجود دارد.^[۳] در سال ۱۹۸۸ گروهی از محققین^[۱۲] فنوتیپ لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به آفت راجعه مینوررا در فاز فعال بیماری و فاز بهبودی با افراد طبیعی مقایسه کردند. نتایج آنها تغییرات قابل ملاحظه‌ای را بین مقادیر نسبت CD4/CD8 نشان نداد ولی این نسبت بین افراد بیمار و کنترل دارای تغییرات معنی‌داری بود.^[۱۲] مقادیر سلولهای CD4⁺ در این بیماران کاهش پیدا کرده ولی تعداد سلولهای CD8⁺ بالا می‌رود^[۱۲] نسبت این دو به یکدیگر نیز کاهش می‌یابد.^[۲] این نتایج را نمونه‌های بافتی تهیه شده از ضایعات نیز تایید می‌کنند.^[۱۲] Greenspan در سال ۱۹۸۱ نیز نشان داد که در فعالیت ADCC^۱ بیماران مبتلا به آفت راجعه حین مراحل اولیه بیماری نسبت به اشخاص کنترل افزایش قابل ملاحظه‌ای دیده می‌شود^[۲] البته بین فازهای بهبودی و اولیه بیماری این تغییرات قابل توجه نیستند.^[۲] Savage و همکارانش^[۱۴] نیز چند سال بعد با تحقیقاتی دیگر بر روی سلولهای کشنده طبیعی (NKC)^۲ این سؤال را مطرح کردند که فعالیت سایتوتوکسیک احتمالی NKCها چگونه بوده و اهداف این سلولها چیست؟ با مطالعات و آزمایشات متعدد نشان دادند سلولهای ای‌تی‌لیال که از نظر مکانی با NKCها تفاوت دارند در ضایعات آفتی راجعه‌دهان هدف فعالیت NKC هابشمار می‌آیند. با توجه به مراتب بالا بر آن شدیم که فنوتیپ لنفوسیتی بیماران مبتلا به آفت دهانی را مورد بررسی قرار دهیم.

بیماران و روشها

از تعداد ۴۵ بیمار در نوبت اول (مرحله فعال بیماری) مقدار ۵سی‌سی خون درحضور EDTA^۲ تهیه شد. ۱۷ نفر از این بیماران را خانمها و ۲۸ نفر بقیه را آقایان تشکیل می‌دادند. از ۴۵ بیمار در مرحله اول فقط ۳۰ نفر در مرحله دوم تحقیقات

1- Antibody Dependent Cell - Mediated Cytotoxicity

2- Natural Killer Cell

3- Ethylenediaminetetraacetic acid

4- Phosphate Buffer Saline

جدول ۱

	مرحله فعالیت بیماری	افراد طبیعی	
میانگین	۷۱	۷۳/۳	مقایسه مقدار سلولهای CD3 ⁺
واریانس	۶۲/۷	۷۵/۱	بین افراد بیمار و کنترل سالم
انحراف معیار	۷/۹۲	۸/۶۶	
تعداد بیماران	۴۵	۳۰	

با توجه به جدول (۱) تفاوت معنی داری بین دو گروه بیمار و سالم از نظر مقادیر سلولهای CD3⁺ دیده نمی شود.

جدول ۲

	مرحله فعالیت بیماری	افراد طبیعی	
میانگین	۳۹/۹۵	۴۵/۵۲	مقایسه مقدار سلولهای CD4 ⁺
واریانس	۷۱/۵۴	۶۰/۷۰	بین افراد بیمار و کنترل سالم
انحراف معیار	۸/۴۵	۷/۷۹	
تعداد بیماران	۴۵	۳۰	

با توجه به جدول (۲) تفاوت دو گروه بیمار و سالم از نظر مقدار سلولهای CD4⁺ با خطای کمتر از ۵٪ ($P < 0.05$) معنی دار می باشد.

جدول ۳

	مرحله فعالیت بیماری	افراد طبیعی	
میانگین	۳۱/۵۲	۳۰/۷۷	مقایسه مقدار سلولهای CD8 ⁺
واریانس	۵۲/۱۶	۴۸/۲۹	بین افراد بیمار و کنترل سالم
انحراف معیار	۷/۲۹	۶/۹۴	
تعداد بیماران	۴۵	۳۰	

با توجه به جدول (۳) تفاوت دو گروه بیمار و سالم از نظر مقدار سلولهای CD8⁺ معنی دار نیست.

جدول ۴

	مرحله فعالیت بیماری	افراد طبیعی	
میانگین	۱/۳۲	۱/۵۵	مقایسه نسبت CD4/CD8 بین
واریانس	۰/۱۶	۰/۱۸	افراد بیمار و کنترل سالم
انحراف معیار	۰/۴۰	۰/۴۳	
تعداد بیماران	۴۵	۳۰	

با توجه به جدول شماره ۴ تفاوت بین دو گروه بیمار و سالم از نظر نسبت CD4/CD8 با احتساب خطای کمتر از ۵٪ ($P < 0.05$) معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۵

	مرحله فعالیت بیماری	افراد طبیعی	
میانگین	۱۲/۴۴	۸/۲۶	مقایسه سلولهای CD16 ⁺ بین
واریانس	۲۴/۷۰	۱۹/۶۰	افراد بیمار و کنترل سالم
انحراف معیار	۴/۹۷	۴/۴۳	
تعداد بیماران	۴۵	۳۰	

جدول شماره ۵ تفاوت بین دو گروه و کنترل سالم از نظر سلولهای CD16⁺ با احتساب خطای کمتر از ۵٪ ($P < 0.05$) را معنی‌دار نشان می‌دهد.

جدول ۶

	مرحله فعالیت بیماری	افراد طبیعی	
میانگین	۱۱/۱۳	۹/۸	مقایسه مقادیر سلولهای CD19 ⁺ بین
واریانس	۱۲/۳	۲۹/۷۱	افراد بیمار و کنترل سالم
انحراف معیار	۳/۵۰	۵/۴۵	
تعداد بیماران	۴۵	۳۰	

با توجه به جدول شماره ۶ تفاوت بین دو گروه بیمار و سالم از نظر مقدار سلولهای CD19⁺ با احتساب خطای بین ۰/۰۵ تا ۰/۱ ($0.05 < P < 0.1$) معنی‌دار می‌باشد.

نتایج بدست‌آمده از آزمایشات در مرحله اول نمونه‌گیری با نتایج حاصله از مرحله دوم نمونه‌گیری (مرحله بهبودی کامل ضایعه) مقایسه گردید که در جداول ۷ تا ۱۲ ملاحظه می‌شود.

جدول ۷

	مرحله فعال بیماری	مرحله بهبودی	
میانگین	۷۱	۷۱/۴	مقایسه مقادیر سلولهای CD3 ⁺
واریانس	۶۲/۷۲	۵۷/۱۴	بین مراحل فعال و بهبودی بیماری
انحراف معیار	۷/۹۲	۷/۴	
تعداد بیماران	۴۵	۳۰	

با توجه به جدول شماره ۷ تفاوت معنی‌داری بین دو مرحله بیماری از نظر مقادیر سلولهای CD3⁺ دیده نمی‌شود.

جدول ۸

	مرحله فعال بیماری	مرحله بهبودی	
میانگین	۳۹/۹۵	۴۱/۹۶	مقایسه مقادیر سلولهای CD4 ⁺
واریانس	۷۱/۵۴	۵۱/۶۱	بین مراحل فعال و بهبودی بیماری
انحراف معیار	۸/۴۵	۷/۰۶	
تعداد بیماران	۴۵	۳۰	

با توجه به جدول شماره ۸ تفاوت معنی‌داری میان دو مرحله بیماری از نظر مقادیر سلولهای CD4⁺ دیده نمی‌شود.

جدول ۹

	مرحله فعال بیماری	مرحله بهبودی	
میانگین	۳۱/۵۲	۳۰/۵	مقایسه مقادیر سلولهای CD8 ⁺
واریانس	۵۲/۱۶	۷۱/۴۳	بین مراحل فعال و بهبودی بیماری
انحراف معیار	۷/۲۹	۸/۳۰	
تعداد بیماران	۴۵	۳۰	

با توجه به جدول شماره ۹ تفاوت معنی‌داری میان دو مرحله بیماری از نظر مقادیر سلولهای CD8⁺ دیده نمی‌شود.

جدول ۱۰

	مرحله فعال بیماری	مرحله بهبودی	
میانگین	۱/۳۲	۱/۴۳	مقایسه نسبت CD4/CD8
واریانس	۰/۱۶	۰/۱۴	بین مراحل فعال و بهبودی بیماری
انحراف معیار	۰/۴۰	۰/۳۷	
تعداد بیماران	۴۵	۳۰	

با توجه به جدول شماره ۱۰ تفاوت بین دو مرحله بیماری از نظر نسبت CD4/CD8 معنی‌دار نمی‌باشد.

جدول ۱۱

	مرحله فعال بیماری	مرحله بهبودی	
میانگین	۱۲/۴۴	۱۲/۴	مقایسه مقادیر سلولهای CD16 ⁺
واریانس	۲۴/۷۰	۲۵/۵۵	بین مراحل فعال و بهبودی بیماری
انحراف معیار	۴/۹۷	۴/۹۷	
تعداد بیماران	۴۵	۳۰	

با توجه به جدول شماره ۱۱ تفاوت معنی‌داری میان دو مرحله فعال و بهبودی بیماری از نظر مقادیر سلولهای CD16⁺ ملاحظه نمی‌شود.

جدول ۱۲

	مرحله فعال بیماری	مرحله بهبودی	
میانگین	۱۱/۱۳	۱۰/۸۳	مقایسه مقادیر سلولهای CD19 ⁺
واریانس	۱۲/۳	۱۴/۱۴	بین مراحل فعال و بهبودی بیماری
انحراف معیار	۳/۵۰	۳/۶۹	
تعداد بیماران	۴۵	۳۰	

با توجه به جدول شماره ۱۲ تفاوت معنی‌داری بین دو مرحله فعال و بهبودی از نظر مقادیر سلولهای CD19⁺ بچشم نمی‌خورد.

بحث

قبلاً پیشنهاد شده بود که جریان بیماری آفت عودکننده دهانی انعکاس بوجود آمدن یک ناهماهنگی در ایمنی می‌باشد.^[۳] جمعیت سلولی که با احتمال زیاد دچار چنین تغییراتی می‌شوند یک گروه فرعی لنفوسیت T یا سلولهای CD4⁺ هستند.^[۵، ۶، ۷، ۹، ۱۴]

مطالعه ما نیز این موضوع را نشان داده است (جدول ۲). نکته مهم این است که این تغییر و تفاوت با اهمیت (تغییر در مقادیر CD4⁺) در مقایسه با افراد طبیعی مشاهده می‌شود ($P < 0.05$)، (جدول ۲). GREENSPAN گزارش کرد که تعداد سلولهای CD3⁺ در بیماران آفتی دچار کاهش و سلولهای CD4⁺ و CD8⁺ دچار تغییری نمی‌شوند.^[۱۲] DAVIS نیز قادر به یافتن تغییری در مقادیر سلولهای CD3⁺، CD4⁺ و CD8⁺ نشد.^[۱۲]

نتایج تحقیقات ما نیز تغییرات با اهمیتی را در جمعیت‌های لنفوسیتی CD3⁺ و CD8⁺ بین افراد بیمار در فاز فعال و افراد طبیعی نشان نداد (جدول ۱ و ۳) ولی همانطور که گفته شد تغییرات CD4 بین این دو گروه از نظر آماری ($P < 0.05$) با اهمیت بوده است.

در مطالعه‌ای که توسط PEDERSON و همکارانش روی ۳۳ بیمار و ۲۵ فرد طبیعی بدون در نظر گرفتن مرحله بیماری انجام گرفت، افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان سلولهای CD8⁺ نسبت به‌دیگر نشان داده شد.^[۹] اما این یافته در تحقیقات ما تأیید نشد. SAVAGE و همکارانش نیز هیچ تفاوت معنی‌داری را بین فازهای فعال و بهبودی بیماری از نظر CD8 در بیماران پیدا نکردند، (این یافته را تحقیق ما نیز تأیید می‌کند. به جدول ۹ مراجعه شود). اگرچه این مقدار تمایل به افزایش را طی مرحله بهبودی نشان می‌داد.^[۱۲] طی تحقیقات ما تمایل به افزایش در تعداد سلولهای CD8⁺ طی مرحله فعال بیماری مشاهده می‌شود (جدول ۳).

LANDESBERG طی تحقیقات خود^[۶] نشان داد که

فقط یکی از شش بیمار مبتلا به آفت مورد مطالعه‌اش در نسبت CD4/CD8 کاهش نشان می‌دهد و فقط این بیمار در بین بیماران دیگر شدیدترین حالت بیماری را داشت. GREENSPAN نیز در تحقیقات خود نتوانست در نسبت مذکور کاهشی را ثابت نماید.^[۶]

در حالیکه SAVAGE در جمعیت بیمار خود کاهش این نسبت را نشان داد.^[۱۲] مطالعات PEDERSON^[۹] نشان داد که تغییر نسبت CD4/CD8 در بیماران مبتلا به آفت قابل ملاحظه نیست ولی تحقیقات بعدی همین محقق این تغییر را با اهمیت تلقی کرده است.^[۱۰] مطالعه ما تغییرات نسبت CD4/CD8 را در مقایسه با افراد طبیعی با اهمیت نشان داد بطوریکه این نسبت بمقدار قابل ملاحظه‌ای در مرحله فعال بیماری کاهش پیدا می‌کند ($P < 0.05$) (جدول ۴). سلولهایی که شاخص CD16 را از خود نشان می‌دهند فقط در مرحله قبل از زخمی شدن و مرحله ابتدایی زخم دیده می‌شوند.^[۱۴] این سلولها عمدتاً NKCها نامیده می‌شوند و در فعالیت ADCC یا فعالیت کشندگی طبیعی شرکت دارند.^[۱۴] در تحقیقات دیگری نشان داده شده است که بیماران در مراحل اولیه آفت عودکننده دهانی در مقایسه با افراد کنترل، در فعالیت ADCC بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش نشان می‌دهند.^[۱۴]

تحقیقات ما نیز تفاوت مقادیر سلولهای CD16⁺ را در مرحله اولیه بیماری نسبت به افراد طبیعی معنی‌دار می‌داند (جدول ۵). بطوریکه این سلولها بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش نشان می‌دهند ($P < 0.05$). این تغییرات در مقایسه با مرحله بهبودی بیماری قابل ملاحظه نیست (به جدول ۱۱ مراجعه شود). مطالعه قبلی نیز چنین مطلبی را گزارش می‌کند.^[۱۴] البته SAVAGE^[۱۲] برچنین افزایشی اعتقاد ندارد و نیز اضافه می‌کند اگر افزایشی هم وجود داشته باشد احتمال دارد که نمونه‌های خون محیطی در مراحل پیشرفته بیماری گرفته شده باشند. البته به نظر می‌رسد که این تغییر بیشتر افزایش عملکردی سلولها باشد تا اینکه افزایش تعداد آنها.^[۱۲]

Summery

Recurrent aphthous ulcer (RAU) is a painful lesion in mouth. generally, 10-12% of the population in world suffered from it.

There are some evidences which suggest that is a correlation between immune mechanisms and pathogenesis of the RAU. Histopathological and immunological studies have indicated involvement of the cell mediated immunity in RAU.

We investigated cell phenotype identification of CD3, CD4, CD8, CD16/CD56, and CD19 surface markers by flowcytometry.

Our study is indicates that patients with RAU have significantly lower number of CD4⁺ cells in compare to that of the normal controls ($p < 0.05$). CD3⁺ and CD8⁺ cells did not show any significant alteration between active RAU and the normal controls. CD16⁺ cells were significantly higher in the active phase of RAU than that of the normal controls ($p < 0.05$), but this marker were not altered in the remission phase in comparison with active phase of the RAU. CD19⁺ cells (B cells) in active RAU have been significantly higher than that of the normal controls ($0.05 < P < 0.1$).

این مسئله وجود دارد که در بیماران مبتلا به آفت ماژور، زمانی که ضایعات بصورت فعال هستند فعالیت سلولهای NK افزایش یافته و طی مراحل بهبودی کاهش پیدا کند.^[۱۷]

سلولهای با مارکر CD19 حدود ۱۰ درصد از سلولهای موجود در محل ضایعه را، عمدتاً دریافت همبند تشکیل می دهند، ولی تعدادی از آنها نیز بصورت داخل اپی تلیالی نزدیک به غشاء پایه مشاهده می شوند.^[۱۸] یادآور می شویم که افزایش تقریباً قابل ملاحظه ای ($0.05 < P < 0.1$) از سلولهای CD19⁺ در خون محیطی بیماران مبتلا به آفت (مرحله فعال بیماری) در مقایسه با افراد کنترل در آزمایشات، نشان داده شد (جدول ۶) ولی مقایسه بین مراحل فعال و بهبود بیماری در مورد سلولهای مذکور تغییر قابل ملاحظه ای را نشان نداد (جدول ۱۲). شاخص CD19 یک گلیکوپروتئین غشایی است که برای سلولهای B اختصاصی بوده و بطور غیر کووالان به اجزاء مجموعه پذیرنده لنفوسیت B متصل می باشد. بطوریکه در مراحل اولیه انتوزنی بر روی غالب سلولهای Pre B وجود داشته و تا مراحل نهایی تمایز سلول B به پلاسما سل ها بر روی آنها می ماند و می پندارند که این شاخص برای پاسخهای طبیعی لنفوسیتی اساسی می باشد.^[۸] بنابراین افزایش این سلولها در خون محیطی بیماران مبتلا به آفت راجعه دهانی می تواند موضوعی جالب و قابل پی گیری باشد.

REFERENCES

1. Colasante, A. [et.al]. (1992): Distribution and phenotype of immune cells in normal human gingiva" active immune response versus unresponsiveness. *J.Oral Pathol. Med.* ; 21:12-16.
2. Eversole, L.R. (1994): Immunopathology of oral mucosa in ulcerative, desquamative and bollus disease: selectivereview of the literature. *Oral Surg. Oral Med. Oral. Pathol.* ; 77: 555-71.
3. Greenespan, J.S. & Shllitoe, E.J.(1984): Microbial pathogenicity in oral soft tissue disease. *J. Dent. Res.* ; 63(3): 1431-4.
4. Hudson, L. & Hay, F.C. (1989): Appendices, Buffers and media. *Practical immunology*, 3rd ed. Blackwell. 471.
5. Hyrinen - Immunen, R. (1992): Immune activation in Rou. *J. Dent. Res.* ; 100: 222-7
6. Landesberge, R. (1990): Alteration of T helper/inducer and T suppressor/inducer cells in patients with Rau. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* ; 69:205-8.
7. Landesberg, R. (1987): Altered T4/T8 ratio's in a patient with severe Rau: report a case. *J. of Oral maxillofaci.surg.* ; 45:980-2.
8. Paul, W.E. ED. (1993): *Fundamental immunology*. Raven press.; 564.
9. Pederson, A. ed. [et.al]. (1991): Peripheral lymphocyte subpapelations in Rau. *Acta odontologica scandinavica.*; 49(4): 203-6.
10. Pederson, A.[et.al]. (1992): T lymphocyt subsets in oral mucosa of patients with Rau. *J. Oral Pathol. Med.* 21:176-80.
11. Rose, N.R. ed. (1992): *Manual of laboratory clincial immunology*. 4th ed. American society for microbiology, chapter 64.: 410.
12. Savage, N.W. (1988): The proportion of suppressor inducer T lymphocytes is reduced in Ras.*J. Oral Pathol.* ; 17(6): 293-7
13. Savage, N.W. (1994): Specific lymphocytotoxic destruction of autologous epithelial cell targets in Ras. *Aust. Dent. J.* ; 39(2): 98-104
14. Savage, N.W. (1985): T lymphocyte subset changes in Ras. *Oral Surg. Oral Med. Oral pathol.* ; 60: 175-181.
15. Scully, C. (1989): Ras. Current concepts of etiology, pathogenesis and management.*J. Oral Pathol. Med.* ; 18(1): 21-7
16. Soames, J.V. (1993): *Oral pathology*. 2nd ed. Oxford: 202-10
17. Sun, A.[et.al]. (1991): Mechanisms of depressed natural killer cell activity in recurrent aphthous ulcers. *Clin Immunol. Immunonopathol.*; 60:83-92.