

## Poszukiwanie serologicznego markera reumatoidalnego zapalenia stawów – rys historyczny

*Searching for a serological marker of rheumatoid arthritis: historical review*

Elwira Biernacka<sup>1</sup>, Jakub Ząbek<sup>1</sup>, Bożena Wojciechowska<sup>2</sup>, Agnieszka Palacz<sup>1</sup>, Katarzyna Roguska<sup>1</sup>, Iwona Horbacz<sup>1</sup>, Joanna Pyka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

<sup>2</sup>Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

**Słowa kluczowe:** reumatoidalne zapalenie stawów, czynnik reumatoidalny, przeciwciała dla cytrulinowanych białek.

**Key words:** rheumatoid arthritis, rheumatoid factor, anti-citrullinated protein antibodies.

### Streszczenie

Reumatoidalne zapalenie stawów jest najczęściej występującą przewlekłą chorobą zapalną o nieznaną etiologię. Mimo ustalonych kryteriów diagnostycznych, rozpoznanie tej jednostki nastrocza duże problemy, zwłaszcza we wczesnej fazie choroby. Trwają więc poszukiwania przeciwciał markerowych o dobrze ustalonej wartości diagnostycznej. Do niedawna jedynym laboratoryjnym kryterium diagnostycznym był tzw. klasyczny czynnik reumatoidalny klasy IgM, przeciwciała o bardzo dobrze poznanym i udokumentowanym udziale w patomechanizmie choroby. Od 2010 r. dodatkowym parametrem laboratoryjnym, który obok wysokiej swoistości i specyficzności ma także duże znaczenie prognostyczne, są przeciwciała dla cytrulinowanych białek ACPA. Głównym atutem tych przeciwciał jest to, że mogą one występować na wiele lat wcześniej przed pojawieniem się pierwszych objawów choroby. Zarówno czynnik reumatoidalny, jak i przeciwciała ACPA były rutynowo oznaczane w Instytucie Reumatologii niemalże od momentu pojawienia się wzmianek literaturowych na ich temat. Podejmowano także próby przeprowadzania własnych badań i wdrażania ich wyników do diagnostyki chorób tkanki łącznej. W artykule podjęto próbę prześledzenia historii tych badań.

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest najczęściej występującą przewlekłą, układową chorobą tkanki łącznej, która dotyczy ok. 1% populacji na świecie.

### Summary

Rheumatoid arthritis (RA) is the most frequent chronic inflammatory disease with unknown aetiology. Despite the established diagnostic criteria for the classification of RA, clinicians still have diagnostic problems, especially at the early stage of the disease. A search for marker antibodies of high diagnostic value still continues. For many years the only laboratory diagnostic criteria was the so-called classical rheumatoid factor – IgM RF, antibody of well-recognised and documented involvement in RA pathomechanism. From 2010 there are new laboratory parameter, which beside high specificity and peculiarity, has also a high prognostic value, is antibodies for citrullinated proteins ACPA. Their main value is their appearance many years before the first symptoms of the disease.

Both the rheumatoid factor and ACPA antibodies have been routinely detected at the Institute of Rheumatology since they were first mentioned in the literature. Many attempts were taken to develop laboratory methods useful in diagnosis of rheumatic diseases. In our article we are trying to look into the history of this study.

Etiologia tej choroby pozostaje ciągle nieznaną. Wiadomo natomiast, że na jej przebieg mają wpływ czynniki genetyczne, infekcyjne i hormonalne [1, 2].

---

### Adres do korespondencji:

mgr Elwira Biernacka, Zakład Mikrobiologii i Serologii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa, tel. +48 22 844 30 67, e-mail: elwira.biernacka@gmail.com

Praca wpłynęła: 27.06.2011 r.

Przebieg choroby jest zazwyczaj cykliczny, z przejściowymi remisjami. Niestety ok. 20% pacjentów cierpi na ciężką postać choroby, trudno poddającą się leczeniu, prowadzącą do kalectwa na skutek deformacji i zniszczenia stawów [3].

Kryteria rozpoznania RZS zostały sformułowane po raz pierwszy w 1958 r., a następnie zmodyfikowane w 1987 r. przez Amerykańskie Towarzystwo Reumatologiczne (*American Rheumatism Association* – ARA) [4, 5]. Obejmowały one 5 kryteriów klinicznych, 1 kryterium radiologiczne i 1 serologiczne – obecność czynnika reumatoidalnego klasy IgM.

Od 2010 r. obowiązują nowe kryteria RZS wprowadzone przez Amerykańskie Kolegium Reumatologiczne (*American College of Rheumatology* – ACR) i Europejską Ligę Przewlekłą przeciwreumatyczną (*European League Against Rheumatism* – EULAR) (kryteria ACR/EULAR), w których obok obecności czynnika reumatoidalnego pojawiła się także obecność przeciwciał anty-CCP [6].

U pacjentów z zaawansowaną chorobą postawienie diagnozy z reguły nie następuje trudno. Najczęściej obserwuje się u nich symetryczne zapalenie stawów, występują nadżerki kości potwierdzone radiologicznie i podwyższony poziom czynnika reumatoidalnego w surowicy. Problemy pojawiają się w przypadku wczesnego RZS.

Objawy towarzyszące RZS w pierwszych okresach choroby to: osłabienie, zmęczenie, bóle stawów i sztywność poranna, czasami gorączka. Podobne objawy mogą się pojawiać także w innych chorobach reumatycznych. Ponadto zajęcie stawów nie zawsze jest symetryczne, a u ok. 10–15% chorych pierwszymi zajęętymi stawami mogą być stawy kolanowe, skokowe lub barkowe [7].

Radiologicznie potwierdzone nadżerki na powierzchni stawowej kości pojawiają się wg jednych autorów już w 4. miesiącu trwania choroby [3], wg innych – dopiero w 6. miesiącu [8], a po 2 latach występują u 2/3 wszystkich chorych [9]. Niestety, stwierdzone w badaniu radiologicznym nadżerki są nieodwracalne, dlatego tak istotne jest wczesne postawienie diagnozy i rozpoczęcie leczenia. Liczne badania wykazują, iż wcześniejsze wprowadzenie leków modyfikujących mogłoby złagodzić przebieg choroby [10, 11]. Dlatego nieustannie poszukuje się markerów serologicznych, których obecność w surowicy lub w płynie stawowym wyprzedzałaby wystąpienie objawów klinicznych RZS.

Uznany kryterium serologicznym jest czynnik reumatoidalny IgM RF (*rheumatoid factor*).

Opisany 60 lat temu przez Waalera i Rosego czynnik reumatoidalny, nazwany później klasycznym, jest przeciwciałem klasy IgM reagującym z fragmentem Fc zmienionej ludzkiej lub zwierzęcej immunoglobuliny G [12, 13]. Do produkcji czynników reumatoidalnych dochodzi w wyniku immunizacji przez zagregowaną lub zmienioną zwią-

zaną w kompleksie antygen–przeciwciało, poliklonalną stymulację komórek B lub niewyjaśnioną reakcję krzyżową między IgG i endogennym antygenem.

Klasyczny czynnik reumatoidalny IgM RF występuje w surowicy u 50–90% osób chorych na RZS (tzw. seropozytywne RZS) [14, 15], u ok. 30% dzieci chorych na młodzieńcze przewlekłe zapalenie stawów i u 2–30% osób zdrowej populacji [16, 17]. Z wiekiem odsetek osób o podwyższonym poziomie IgM RF wzrasta nawet do 40% [18].

Pierwotną metodą oznaczania czynnika reumatoidalnego był odczyn, który swoją nazwę uzyskał od połączonych nazwisk jego odkrywców. W Instytucie Reumatologii odczyn Waalera-Rosego wykonywany był niemal od początku istnienia Instytutu. W metodzie tej wykorzystuje się zdolność wiązania zawartego w badanych surowicach czynnika RF IgM z króliczą IgG, którą są opłaszczane czerwone krwinki barana. W przypadku reakcji pozytywnej dochodzi do hemaglutynacji krwinek. Jako wynik podawane jest najwyższe rozcieńczenie surowicy, w którym wystąpiła hemaglutynacja. Jest to metoda dość pracochłonna, wymagająca ustawiania długich szeregów probówek z roztworem krwi baraniej i rozcieńczonych surowic. Dużym uproszczeniem procedury oznaczania RF IgM były wprowadzone w latach 80. ubiegłego wieku testy lateksowe, w których zamiast krwinek baranich opłaszczonych króliczą IgG zastosowano cząsteczki lateksu opłaszczane ludzką IgG. Jako wynik dodatni traktuje się aglutynację lateksu w roztworze zawierającym 1 kroplę odczynnika lateksowego i 1 kroplę nierozcieńczonej surowicy badanej, nasilenie aglutynacji ocenia się na 1, 2 lub 3 plusy. Test lateksowy można traktować jako samodzielne badanie lub jako uzupełnienie bądź badanie poprzedzające test Waalera-Rosego.

W połowie lat 90. ubiegłego wieku w Zakładzie Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii opracowano test ELISA do oznaczania czynników reumatoidalnych klasy IgG i IgA. Czynniki reumatoidalnych innych klas niż IgM nie można oznaczyć metodami aglutynacyjnymi z powodu braku zdolności aglutynacyjnych.

Mikroplótkę opłaszczano króliczą IgG, z którą następnie mogły reagować obecne w surowicy czynniki reumatoidalne. Aby ustalić normy dla czynników reumatoidalnych oznaczanych tą metodą, przebadano dużą grupę osób zdrowych. Jako wynik dodatni przyjęto średnią wartość ekstynkcji w surowicach dawców plus 2 odchylenia standardowe [19].

Badanie na obecność tych czynników wykonuje się głównie w celach naukowych, szczególnie w celu monitorowania zmian zapalnych w obrębie naczyń krwionośnych i prognozowania ciężkości przebiegu choroby. Obecnie na rynku występują gotowe testy do oznaczania czynników reumatoidalnych różnych klas, jednak to nadal RF IgM jest rutynowo oznaczanym przeciwciałem w diagnostyce RZS.

Klasyczny czynnik reumatoidalny oznaczany jest dziś w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej metodą immunochemiczną na analizatorze do białek specyficznych, w którym wykorzystuje się reaktywność czynnika z ludzką immunoglobuliną G.

Obecność wysokich mian czynnika reumatoidalnego nie ogranicza się jednak wyłącznie do surowic osób chorych na RZS. Występuje on w surowicach pacjentów z innymi chorobami tkanki łącznej, ale także w takich chorobach, jak: kiła, trąd, sarkoidoza, gruźlica, przewlekłe zakażenia paciorkowcami, trypanosomoza, malaria, infekcyjne zapalenie wsierdza i wiele innych [20], co znacznie zmniejsza diagnostyczną wartość IgM RF. Trwają więc poszukiwania innych bardziej swoistych przeciwciał, pozwalających na wczesne rozpoznanie choroby.

Obecnie największym zainteresowaniem cieszą się przeciwciała dla cytrulinowanych białek ACPA (*anti-citrullinated protein antibodies*), których historia jest prawie tak długa, jak badania nad czynnikiem reumatoidalnym. Ponieważ długo nie udawało się odkryć antygenów docelowego tych przeciwciał, pojawiały się one pod różnymi nazwami.

W latach 60. XX w. Nienhuis i Mandema opublikowali pracę, w której opisali przeciwciała obecne w surowicach pacjentów chorych na RZS, reagujące ze składnikami granul keratohialiny otaczającymi jądro komórkowe. Przeciwciała te nazwali czynnikiem antypery nuklearnym (*antiperinuclear factor* – APF) [21]. Badacze dokonali tego odkrycia przy użyciu techniki immunofluorescencji pośredniej na ludzkich komórkach nabłonka policzkowej błony śluzowej. Dalsze badania wykazały, że przeciwciała APF występują w surowicach 49–91% chorych na RZS, ze swoistością 73–99% [22]. Niestety, ze względu na trudności techniczne przy pobieraniu materiału antygenowego, badanie to nigdy nie weszło na stałe do programu badań serologicznych. Wysoki odsetek komórek APF-dodatnich można uzyskać tylko u 5% dawców. Kolejne utrudnienie to standaryzacja tej metody oraz częściowo sama technika – immunofluorescencja pośrednia.

Dziesięć lat później dokonano kolejnego odkrycia przeciwciał specyficznych dla RZS – przeciwciał antykeratynowych (*antikeratin antibodies* – AKA) [23]. Wykryto je także metodą immunofluorescencji pośredniej, używając jako substratu skrawki przetyków szczurzych. Surowice, w których występowały przeciwciała AKA, wykazywały zdolność wiązania komórek warstwy rogowej nabłonka przetyku, a ponieważ główną składową tej warstwy jest keratyna, stąd nazwa tych przeciwciał. Czulość tego testu waha się od 40% do 60%, a swoistość wynosi 88–99% [23, 24].

Struktura antygenów, z którym reagują przeciwciała APF i AKA, długo pozostawała nieznana. Dopiero w 1992 r. Simon i wsp. metodą Western-blotting wyizolowali ze skóry ludzkiej białko o masie cząsteczkowej 40 kDa reagujące

swoiście z surowicami osób chorych na RZS [25]. Białkiem tym okazała się neutralno-kwaśna izoforma filagryny.

Oczyszczone i wyizolowane metodą powinowactwa przy użyciu białka o masie cząsteczkowej 40 kDa, pochodzące od pacjentów z RZS frakcje IgG reagowały zarówno w testach APF, jak i AKA, co wskazywało, że są to przeciwciała o tej samej swoistości antygenowej [25]. Rozpatrywano nawet pomysł zmiany nazwy testu z AKA na AFA (*anty-filagrin antibodies*) [26].

Filagryna (*filament aggregating protein*), znana także jako białko bogate w histydynę (*histidine rich protein*), z uwagi na dużą zawartość podstawień histydynowych (11–12%), jest białkiem epidermalnym, pełniącym funkcję „agregatora” filamentów cytokeratyny [27]. Białko to jest produkowane podczas późnej fazy różnicowania komórek nabłonkowych ssaków, jako silnie fosforylowane białko prekursorowe (profilagryna) składające się z kilku (10–12) powtarzających się jednostek filagryny rozdzielonych białkowym łącznikiem [28].

W procesie rogowacenia profilagryna ulega defosforylacji i staje się dostępna dla specyficznej proteazy, która odcina kationowe jednostki filagryny o masie cząsteczkowej 37 kDa [29]. Przeciwciała APF i AKA reagują z neutralno-kwaśną izoformą filagryny, stąd narodziło się przypuszczenie, że kluczową rolę w tych reakcjach odgrywa cytrulina [25]. W celu sprawdzenia tej hipotezy zsyntetyzowano kilka peptydów, w których w miejsce arginy podstawiono cytrulinę [28]. Badania te wykazały, że cytrulina jest główną składową determinantów antygenowych reagujących z przeciwciałami obecnymi w surowicach u chorych na RZS. Następnie wybrano peptyd zawierający cytrulinę, który wykazywał największą reaktywność z przeciwciałami, i użyto go jako antygenów opłaszczającego płytkę w teście ELISA. Okazało się, że najlepsze wyniki dawało użycie cyklicznego cytrulinowanego peptydu (CCP) [30]. Czulość tego pierwszego testu wynosiła 45%, swoistość zaś 96–100%. Pozytywną wartość prognostyczną oceniono na 91%, a negatywną na 78% [30, 31].

Niezależnie od opisanych wcześniej badań w 1994 r. Despres i wsp. odkryli przeciwciała anty-Sa, zawdzięczające swoją nazwę pierwszym literom nazwiska pacjenta, u którego je wykryto [32]. Bardzo długo antygen Sa pozostawał nieznanym białkiem o masie 48–50 kDa, które izolowano z ludzkiej śledziony, łożyska lub tuszczki reumatoidalnej. Dopiero w 2004 r. Vossenaar i wsp. opublikowali artykuł dowodzący, że enigmatyczny antygen Sa to cytrulinowana wimentyna [33]. Badania wykazały, że przeciwciała anty-Sa nie reagują z rekombinowaną wimentyną, jednak *in vivo* wimentyna poddawana jest licznym posttranslacyjnym modyfikacjom, w tym także cytrulinacji. W ten sposób przeciwciała anty-Sa dotęczyły do grupy przeciwciał dla cytrulinowanych białek.

Do grona antygenów cytrulinowanych na przestrzeni ostatnich lat zaliczono: fibrinogen, fibronektynę, anty-

trombinę III, kolagen typu II,  $\alpha$ -enolazę, znaną też jako antygen-CEP1 [34–37].

W latach 2000–2002 w Zakładzie Mikrobiologii i Seroologii IR podjęto próbę wyizolowania cytokeratyn ze skóry ludzkiej, będącej materiałem pooperacyjnym, oraz antygeny Sa z proszku acetonowego wątroby cielęcej i wołowej, które później mogłyby posłużyć jako antygen w teście ELISA. Udało się wyizolować białko o masie cząsteczkowej 40 kDa ze skóry ludzkiej. Częściowo oczyszczonym roztworem tego białka opłaszczono następnie mikropłytkę, na której przebadano 26 surowic osób chorych na RZS, 6 na niezróżnicowane zapalenie stawów (NZS), 5 na osteoartrozę, 2 na wirusowe zapalenie wątroby typu C (WZW C) oraz po 1 surowicy osób z chorobą Hashimoto, gammapatią, rakiem piersi i reaktywnym zapaleniem stawów. W celu ustalenia norm dla testu przebadano także 22 surowice osób zdrowych. Jednocześnie te same surowice przebadano immunofluorescencyjnym testem na obecność przeciwciał AKA. Pozytywny wynik uzyskano dla 50% surowic RZS w teście ELISA i 54% w teście immunofluorescencyjnym. Niestety obecność przeciwciał cytokeratynowych badanych testem ELISA wykryto także u pojedynczych pacjentów z NZS, rakiem piersi i WZW C. W teście AKA wynik dla tych surowic był ujemny, co świadczyło o konieczności dalszego oczyszczania antygeny użytego w teście ELISA. Pojawienie się na rynku gotowych testów oraz uciążliwa metoda ekstrakcji antygenów białkowych przy użyciu  $\beta$ -merkaptotetanolu zniechęciły nas do dalszych badań w tym kierunku.

Początkowo badano obecność przeciwciał anti-CCP tylko w celach naukowych, od 2004 r. badanie to jest wykonywane także w celach diagnostycznych. Gotowe zestawy ELISA do oznaczania przeciwciał anti-CCP wykrywają przeciwciała klasy IgG, niekiedy w połączeniu z przeciwciałami IgA.

Aby sprawdzić różnice w częstości występowania przeciwciał anti-CCP w klasie IgG, IgA i IgM, przebadano w Instytucie Reumatologii 100 surowic pobranych od pacjentów z RZS, 50 surowic od osób z innymi chorobami tkanki łącznej i 50 surowic zdrowych dawców. Do badania użyto standardowej płytki opłaszczonej antygenem CCP. Najczęściej wykrywano przeciwciała w klasie IgG, 5–10% częściej niż w klasie IgA i IgM [dane niepublikowane]. Wydaje się więc, iż oznaczanie przeciwciał w klasie IgG jest w pełni satysfakcjonujące.

Obecnie przeciwciała anti-CCP oznaczane są w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej metodą elektrochemiluminescencji. Zarówno w testach ELISA, jak i w testach immunochemicznych czy opartych na zasadzie chemiluminescencji podstawową reakcją jest wiązanie antygeny CCP ze swoistymi przeciwciałami.

Dziś wśród testów badających obecność przeciwciał dla cytrulinowanych białek, oprócz testów anti-CCP zawie-

rających syntetyczne cykliczne cytrulinowane peptydy, pojawiają się także próby użycia jako antygeny konkretnych, rekombinowanych, cytrulinowanych białek. Dostępne są testy, w których jako antygen zastosowano cytrulinowaną rekombinowaną filagrynę, ludzką cytrulinowaną wimentynę, cytrulinowany syntetyczny peptyd pochodzący z IgG lub cytrulinowany syntetyczny peptyd z antygeny jądrowego EBV. Testy te różnią się między sobą zarówno czułością, jak i swoistością. Często wysoka czułość testu jest osiągnięta kosztem swoistości, należy się liczyć wtedy z możliwością uzyskania fałszywie dodatnich wyników. Według badań przeprowadzonych w 2007 r. przez dwa niezależne ośrodki [38, 39] użycie jako antygeny syntetycznych cytrulinowanych peptydów daje najbardziej swoiste i powtarzalne wyniki.

Z diagnostycznego punktu widzenia główną zaletą przeciwciał ACPA jest ich występowanie w bardzo wczesnej fazie choroby, niekiedy nawet kilka lat przed pierwszymi objawami [40], niestety nie ma jednoznacznych wyników badań co do wpływu tych przeciwciał na przebieg RZS, trudno jest też na podstawie ich poziomu monitorować postępy w leczeniu. Jako marker zmian pozastawowych oraz przeciwciało, którego poziom (do pewnego stopnia) odpowiada postępowi w leczeniu, znacznie przydatniejszy wydaje się czynnik reumatoidalny. Jak dowiodły liczne badania, występowanie przeciwciał anti-CCP i RF IgM nie ogranicza się wyłącznie do reumatoidalnego zapalenia stawów, ponieważ pojawiają się one także w innych chorobach, choć z mniejszą częstotliwością. Wszystko wskazuje na to, że wprowadzenie do kryteriów choroby oceny poziomu przeciwciał anti-CCP obok obecności czynnika reumatoidalnego ułatwi diagnozowanie osób z podejrzeniem RZS, zwłaszcza w bardzo wczesnych stadiach choroby.

W badaniach naukowych większą uwagę poświęca się obecnie samemu procesowi cytrulinacji czy, jak ostatnio, karbamylacji [41], zmianom struktury i funkcji białek, zachodzącym w wyniku tych procesów, szczególnie w kontekście wpływu na patogenezę.

## Piśmiennictwo

1. Mackiewicz S, Hrycaj P. Reumatoidalne zapalenie stawów. W: Reumatologia, Mackiewicz S, Zimmerman-Górska I (red.). Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 1995; 87-101.
2. Firestein GS. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. Kelley's Textbook of Rheumatology. Kelly WN, et al. (red.). WB Saunders, Philadelphia 1981; 921-966.
3. Fleming A, Grown JM, Corbett M. Early rheumatoid disease. Ann Rheum Dis 1976; 35: 357-360.
4. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988; 31: 315-324.
5. Ropes MW, Bennet GA, Cobb S, et al. 1958 revision of diagnostic criteria of rheumatoid arthritis. Bull Rheum Dis 1958; 9: 175-176.

6. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/Eurorean League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 2569-2581.
7. Palster B. Rheumatoid disease and their management. Medical Tribune, Wisbaden 1999.
8. Matsuda Y, Yamanaka H, Higamiki K, et al. The lag between active joint inflammation and radiologic progression in patients with early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1998; 25: 427-432.
9. Fuchs HA, Kaye JJ, Callahan LF, et al. Evidence of significant radiographic damage in rheumatoid arthritis within the first 2 years of disease. *J Rheumatol* 1989; 16: 585-591.
10. Wilke WS, Clough JD. Therapy for rheumatoid arthritis: combinations of disease-modifying drugs and new paradigms of treatment. *Semin Arthritis Rheum* 1991; 21 (2 Suppl): 21-34.
11. Harris ED Jr. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for Therapy. *N Engl J Med* 1990; 322: 1277-1289.
12. Waaler E: On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1940; 17: 172-188.
13. Rose HM, Ragan C, Pearce E, et al. Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1948; 68: 1-6.
14. Gioud-Paquet M, Auvinet M, Raffin T. IgM rheumatoid factor (RF), IgA RF, IgE RF and IgG RF detected by ELISA in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 65-71.
15. Masi AT, Medsger TA. Epidemiology of the rheumatic diseases. *Arthritis and Allied Conditions*. McCarty DJ (ed.). Lea & Febiger, Philadelphia 1979.
16. Bennett PH, Wood PHN (eds). *Population Studies of the Rheumatic Diseases*. Excerpta Medica, Amsterdam 1968.
17. Carson DA. Rheumatoid factor. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Kelly WN, et al. (ed.). WB Saunders, Philadelphia 1981; 677-690.
18. Williams RC Jr. Rheumatoid factor: historical perspective, origins and possible role in diseases. *J Rheumatol* 1992; Suppl 33: 42-45.
19. Biernacka E. Oznaczenie czynników reumatoidalnych klasy IgG i IgA metodą ELISA. W: *Metody diagnostyki serologicznej w reumatologii*. Luft S (red.). PWN, Warszawa 1996; 63-67.
20. Williams RC Jr. Rheumatoid factors and other serum components associated with rheumatoid arthritis. *Rheumatoid Arthritis as a systemic Diseases*. WB Saunders, Philadelphia 1974; 162.
21. Nienhuis RL, Mandema EA. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis, the antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis* 1964; 23: 302-305.
22. Hoet RM, Van Venrooij WJ. The antiperinuclear factor antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. In: *Rheumatoid Arthritis*. Smolen J, Kalden J, Maini RN (eds). Springer – Verlag, Berlin 1992; 299-318.
23. Young B, Mallya R, Leslie R, et al. Antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 1979; 2: 97-99.
24. Hoet RM, Boerbooms AM, Arends M, et al. Antiperinuclear factor, a marker autoantibody for rheumatoid arthritis: colocalisation of the perinuclear factor and profilaggrin. *Ann Rheum Dis* 1991; 50: 611-618.
25. Simon M, Girbal E, Sebbag M, et al. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of so-called "antikeratin antibodies" specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1993; 92: 1387-1393.
26. Aho K, Palosuo T, Lukka M. Antifilaggrin antibodies in recent-onset arthritis. *Scand J Rheumatol* 1999; 28: 113-116.
27. Harding CR, Scott IR. Histidine-rich proteins (filaggrins): structural and functional heterogeneity during epidermal differentiation. *J Mol Biol* 1983; 170: 651-673.
28. Schellekens GA, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, et al. Citrulline is an Essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998; 101: 273-281.
29. Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, et al. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 1999; 162: 585-594.
30. Sebbag M, Simon M, Vincent C, et al. The antiperinuclear factor and the so-called anti-keratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1995; 95: 2672-2679.
31. Kroot EJ, De Jong BA, Van Leeuwen MA, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1831-1835.
32. Despres N, Boire G, Lopez-Longo FJ, et al. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1994; 21: 1027-1033.
33. Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: 142-150.
34. Chang X, Yamada R, Suzuki A, et al. Citrullination of fibronectin in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Rheumatology* 2005; 44: 1374-1382.
35. Chang X, Yamada R, Sawada T, et al. The inhibition of antithrombin by peptidylarginine deiminase 4 may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2005; 44: 293-298.
36. Takizawa T, Suzuki A, Sawada T, et al. Citrullinated fibrinogen detected as a soluble citrullinated autoantigen in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 1013-1020.
37. Lundberg K, Kinloch A, Fisher BA. Antibodies to citrullinated  $\alpha$ -enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 3009-3019.
38. Coenen D, Verschuere P, Westhovens R, et al. Technical and diagnostic performance of 6 assays for the measurement of citrullinated protein/peptide antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clinical Chemistry* 2007; 53: 498-504.
39. Bizzaro N, Tonutti E, Tozzoli R, et al. Analytical and diagnostic characteristics of II 2nd- and 3rd- generation immunoenzymatic methods for the detection of antibodies to citrullinated proteins. *Clinical Chemistry* 2007; 53: 1527-1533.
40. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 380-386.
41. Mydel P, Wang Z, Brisslert M, et al. Carbamylation-dependent activation of T cells: a novel mechanism in the pathogenesis of autoimmune arthritis. *J Immunol* 2010; 184: 6882-6890.