

# Przeciwciała dla cytrulinowanych białek – nowe kierunki badań

## *Antibodies to citrullinated proteins – a new research directions*

Elwira Biernacka, Jakub Ząbek

Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie, kierownik Zakładu dr hab. biol. Jakub Ząbek, dyrektor Instytutu prof. dr hab. med. Sławomir Maśliński

**Słowa kluczowe:** reumatoidalne zapalenie stawów, przeciwciała dla cytrulinowanych białek, wspólny epitop.

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

### Streszczenie

Reumatoidalne zapalenie stawów jest najczęściej występującą, przewlekłą chorobą zapalną stawów, której etiologia ciągle nie została poznana. Rozpoznanie tej choroby, mimo ustalonych kryteriów diagnostycznych, wciąż jest problematyczne, zwłaszcza we wczesnym stadium.

Obiecującym parametrem laboratoryjnym, który obok wysokiej swoistości i specyficzności ma duże znaczenie prognostyczne, są przeciwciała przeciwko białkom cytrulinowanym. Mogą one występować wiele lat wcześniej przed pojawieniem się pierwszych objawów choroby, ponadto są powiązane z obecnością tzw. wspólnego epitopu predysponującego do zachorowania na RZS.

Pojawienie się antycytrulinowych przeciwciał jest wynikiem nadmiernej ekspresji cytrulinowanych białek w zmienionych zapalnie tkankach. Dlatego też identyfikacja deiminowanych antygenów i ich lokalizacja oraz zbadanie zmian funkcjonalnych wywołanych cytrulinacją stało się ostatnio przedmiotem intensywnych badań. Wysoka homologia między wywołującą produkcję przeciwciał ludzką cytrulinowaną  $\alpha$ -enolazą a enolazą bakteryjną zwróciła uwagę na infekcyjny aspekt etiologii RZS. Na szczególne zainteresowanie zasługują *Porphyromonas gingivalis*, jedyny drobnoustroj wytwarzający deiminazę peptydylargininową, enzym odpowiedzialny za cytrulinację u eukariota.

Przedstawione wyniki badań pozwalają na lepsze zrozumienie zmian zachodzących w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów, co daje nadzieję na wcześniejsze jej zdiagnozowanie i wdrożenie leczenia.

### Wstęp

Historia badań nad odpowiedzią antycytrulinową u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest prawie tak długa, jak historia badań nad czynnikiem reumatoidalnym (*rheumatoid factor* – RF).

### Summary

Rheumatoid arthritis is the most common, chronic inflammatory joint disease, which etiology still remains unknown. The diagnosis of this disease, despite the set diagnostic criteria, is still problematic, especially in the early stage.

Promising laboratory parameter, which beside high specificity and peculiarity, has also huge prognostic value, are antibodies against citrullinated proteins ACPA. They can occur many years before the first symptoms of the disease onset, moreover are related with the presence of a shared epitope – SE, which predisposes to development of rheumatoid arthritis.

The appearance of anticitrullin antibodies results from excessive expression of citrullinated proteins in inflammatory tissues. Therefore, the identification of deiminated antigens, their localization and examination of functional changes induced by citrullination recently became an object of intensive research.

High homology between human citrullinated  $\alpha$ -enolase, which induces the production of antibodies, and bacterial enolase has drawn attention to the infectious aspect of the RA etiology. *Porphyromonas gingivalis* deserves special interest, the only microbe, which produces peptidylarginin deiminase – the enzyme responsible for citrullination in eucariot.

The data shown in reviewed studies allow us better understanding of changes in the course of the disease and promise earlier diagnosis and implementation of treatment in the future.

Docelowy antygen dla przeciwciał wywołujących tę odpowiedź przez wiele lat pozostawał nieznan, co zaowocowało różnorodnością nazw nadawanych badanym przeciwciałom.

Dziś już wiadomo, że zarówno odkryty w 1964 r. przez Nienhuisa i Mandemę czynnik antypery nuklearny

---

### Adres do korespondencji:

mgr biol. 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 42 41, wew. 541, e-mail: elwira.biernacka@gmail.com

**Praca wpłynęła:** 23.06.2010 r.

(*antiperinuclear factor* – APF) [1], jak i przeciwciała antykeratynowe (AKA) [2], przeciwciała antyfilagrynowe [3], anty-Sa [4] czy przeciwciała anty-CEP-1 [5, 6] należą do jednej grupy przeciwciał, określanych jako przeciwciała przeciwko białkom cytrulinowanym (*anticitrillinated protein antibodies* – ACPA).

Są to przeciwciała odznaczające się wysoką swoistością i specyficznością dla RZS, mają ponadto wartość prognostyczną, gdyż mogą się pojawić nawet 9 lat przed wystąpieniem objawów klinicznych [7]. Rutynowo przeciwciała te oznacza się za pomocą testów ELISA, w których antygenem opłaszczającą płytkę jest syntetyczny, cykliczny, cytrulinowany oktapeptyd – CCP. Ogólna dostępność oraz łatwość wykonania tego testu sprawiły, że obecnie jest on równie popularny jak oznaczanie RF. Dzięki dużej liczbie wyników badań można dokładnie przyjrzeć się występowaniu tych przeciwciał w różnych populacjach oraz zbadać genetyczne powiązania z zachorowalnością na RZS i jego objawami.

Przyczyną rozwinięcia odpowiedzi antycytrulinowej jest nadmierna ekspresja cytrulinowanych białek w tkankach. Białka te powstają na skutek posttranslacyjnej modyfikacji, w wyniku której dodatnie reszty argininy przekształcane są w obojętne reszty cytrulinowe. Przekształcenia tego dokonuje enzym deiminaza peptydyloargininowa (*peptidylarginine deiminase* – PAD) EC 3.5.3.15 w obecności jonów wapnia [8]. Okoliczności przebiegu tego procesu są ciągle wnikliwie badane.

W tkankach osób chorych na RZS poszukuje się zarówno cytrulinowanych białek, jak i enzymu katalizującego ich powstawanie. Do listy deiminowanych białek, obok wimentyny, fibronektyny, fibrynogenu i antytrombiny III, dołączono ostatnio kolagen typu II i  $\alpha$ -enolazę [4–6, 9–11].

Biorąc pod uwagę możliwość infekcyjnej etiologii RZS, ciekawe wydaje się odkrycie 100-procentowej homologii między złożoną z 9 aminokwasów sekwencją epitopu CEP-1 a sekwencją występującą w enolazie kodowanej przez *Porphyromonas gingivalis* [5], co może skutkować pojawieniem się krzyżowej reaktywności przeciwciał.

Celem pracy jest przedstawienie najbardziej istotnych zagadnień dotyczących obecności cytrulinowanych białek i przeciwciał antycytrulinowych w płynach ustrojowych chorych na RZS.

### **Genetyczne uwarunkowania przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów a produkcja przeciwciał antycytrulinowych**

O tym, że istnieje rodzinna skłonność do zachorowania na RZS, wiadano już od dawna, świadczyły o tym przeprowadzane przez lekarzy wywiady oraz obserwacje

rodzin chorych. Fakt ten znajduje także potwierdzenie na poziomie badań laboratoryjnych i genetycznych.

Z badań Gregersena i wsp. wynika, że genetyczna skłonność do zachorowań na RZS jest związana z antygenami HLA klasy II, które zawierają aminokwasowy motyw zlokalizowany w pozycjach 70–74 na łańcuchu  $\beta$ , zwany wspólnym epitopem (*shared epitope* – SE) [12]. Wspólny epitop ma dodatni ładunek i oddziałuje z kieszonką P4 kotwiczącą białka na cząsteczce MHC klasy II. Antygeny zgodności tkankowej mające P4 o ładunku ujemnym mogą chronić przed zachorowaniem na RZS [13]. Antygeny MHC zawierające SE wykazują duże powinowactwo do polarnych aminokwasów o ujemnym lub obojętnym ładunku, natomiast aminokwasy naładowane dodatnio, np. arginina, mogą ten proces ograniczać [14].

W wyniku posttranslacyjnej modyfikacji arginina ulega przekształceniu w obojętną cytrulinę, co zwiększa powinowactwo do cząsteczki MHC z SE nawet 100-krotnie. To z kolei może prowadzić do zwiększenia ekspresji cząsteczek MHC na komórkach prezentujących antygen, a w konsekwencji do przekroczenia marginesu tolerancji i aktywacji komórek T [15].

Oddziaływanie pomiędzy poszczególnymi aminokwasami na łańcuchu antygenowym a miejscami wiązania na cząsteczkach MHC klasy II mogą być kluczowe dla inicjacji odpowiedzi immunologicznej.

W latach 90. XX w. Weyand i wsp. opublikowali prace, w których donosili o zależności między posiadaniem określonych alleli SE, głównie DRB1\*04, a szybkością rozwoju RZS oraz pojawianiem się zmian narządowych i guzków reumatoidalnych [16]. Polskie badania przeprowadzone w 2001 r. przez zespół Kowalskiego wykazały, że posiadanie alleli DRB1\*04 predysponuje do pierwotnie przewlekłego początku choroby, bardziej agresywnego jej przebiegu z zajęciem większości stawów, koreluje z obecnością RF, a ponadto ma związek z rodzinnym występowaniem RZS [17].

Ostatnio pojawiły się dwie prace dotyczące badań nad populacją rdzenną ludności centralnej Kanady [18, 19]. Indianie zamieszkujący te tereny chorują na RZS 2-krotnie częściej niż osoby rasy kaukaskiej. Choroba częściej atakuje osoby młode, jej przebieg jest cięższy, częściej występują allele SE i RF. W obrębie tej grupy przeprowadzono badania na obecność przeciwciał dla cytrulinowanych białek, RF oraz alleli SE u osób chorych, ich zdrowych krewnych i zdrowych osób niespokrewnionych.

W badaniach Ioan-Facsinay i wsp. [18] stwierdzono obecność przeciwciał ACPA (badano przeciwciała dla cytrulinowanej wimentyny, cytrulinowanego fibrynogenu i cytrulinowanej enolazy) u 91,4% chorych na RZS, u 37,5% krewnych z niezróżnicowanym zapaleniem stawów, u 19% zdrowych krewnych i 8,8% zdrowych osób

niespokrewnionych, co znacznie przekracza częstość występowania tych przeciwciał u zdrowych osób rasy kaukaskiej. Odpowiedź przeciwciałowa u chorych obejmowała 5–6 izotypów immunoglobulin, głównie IgG1 i IgA, a u zdrowych krewnych odpowiedź ograniczyła się tylko do 1–2 izotypów. Przeciwciała ACPA u osób chorych rozpoznawały wszystkie badane cytrulinowane białka, u zdrowych nie odnotowano odpowiedzi na cytrulinowaną wimentynę i peptydy pochodzące z cytrulinowanej wimentyny i fibrynogenu. Stwierdzono ponadto związek obecności ACPA z rozwojem choroby niezależnie od RF, natomiast RF był powiązany z RZS tylko przy współwystępowaniu z ACPA.

El-Gabalawy i wsp. [19], badając tę samą populację, wykazali obecność przeciwciał anty-CCP u 82% chorych na RZS, u 17% zdrowych krewnych I stopnia, 11% zdrowych krewnych II stopnia i 3% zdrowych osób niespokrewnionych. Częstość występowania alleli SE w grupie kontrolnej wynosiła 66%, znacznie ponad przeciętną w innych populacjach. Najczęściej występującymi allelami były HLA-DRB1\*0404 i DRB1\*1402. W omawianym artykule wykazano także powiązanie między obecnością antygeny DRB1\*0901 nienależącego do alleli SE z zachorowalnością na RZS. Współwystępowanie SE i DRB1\*0901 zwiększało ryzyko wystąpienia choroby, zwłaszcza u osób poniżej 16. roku życia.

Częstość występowania ACPA u zdrowych kuzynów chorych na RZS skłania do dalszych obserwacji tych osób pod kątem wystąpienia objawów chorobowych. Sama obecność ACPA może być niewystarczająca do rozwoju choroby, dodatkowymi czynnikami ryzyka są niewątpliwie allele SE i HLA-DRB1\*0901.

U pacjentów z RZS stała ekspozycja cytrulinowanych białek w stawie może prowadzić do aktywacji antygenowo swoistych limfocytów B i zmiany izotypu produkowanych przeciwciał. Tylko u 10% zdrowych krewnych stwierdza się obecność przeciwciał ACPA klasy IgM, które są indukowane przez toczący się aktualnie proces zapalny [18].

Dodatkowym czynnikiem ryzyka wystąpienia RZS jest palenie tytoniu. Palacze nie tylko częściej chorują, mają podwyższony poziom RF, ale także przebieg choroby jest u nich znacznie cięższy [20]. Przeprowadzone na szeroką skalę badania populacyjne w Europie i Stanach Zjednoczonych wykazały, że allele HLA-DRB1 są czynnikiem ryzyka tylko u chorych wytwarzających przeciwciała anty-CCP [21].

Linn-Rasker i wsp. donoszą o istnieniu powiązania między paleniem tytoniu, występowaniem RF, przeciwciał anty-CCP i obecnością wspólnego epitopu [20]. U pacjentów, u których nie stwierdzono alleli SE, oraz u chorych z niezróżnicowanym zapaleniem stawów nie stwierdzono takiej zależności.

Obecnie nie wiadomo, czy cytrulinacji ulegają konkretne białka pod wpływem palenia tytoniu, jak również, czy istnieje związek między liczbą wypalanych papierosów a ryzykiem rozwoju RZS. Przypuszcza się, że w płucach palaczy dochodzi do nasilenia ekspresji cytrulinowanych białek, co może pozytywnie wpływać na antycytrulinową odpowiedź [22].

Jako ciekawostkę należy dodać, że w świetle opublikowanych w 2009 r. badań Källberga i wsp. [23] picie alkoholu powoduje zależne od dawki zmniejszenie prawdopodobieństwa zachorowania na RZS, a także łagodzi efekty działania czynników ryzyka, takich jak palenie papierosów czy posiadanie SE w powiązaniu z wytwarzaniem przeciwciał antycytrulinowych. Badania te były przeprowadzone w krajach skandynawskich: Szwecji i Danii, z zaznaczeniem, że Duńczycy spożywają więcej alkoholu.

### Lokalizacja i rola deiminazy peptydylo-argininowej w tkance synowialnej

Chang i wsp. podjęli próbę zlokalizowania ekspresji PADI4 i cytrulinowanych białek w tkance synowialnej chorych na RZS [24]. W tym celu przebadali 26 tkanek synowialnych pobranych od chorych na RZS, 17 od osób z chorobą zwyrodnieniową stawów (ChZS) oraz 4 zdrowe tkanki. Lokalizację enzymu w tkance badali metodą immunofluorescencji pośredniej przy użyciu monoklonalnych króliczych przeciwciał dla ludzkiej PADI4.

Najsilniejszą ekspresję PADI4 stwierdzono w komórkach T, B, makrofagach, neutrofilach, komórkach przypominających fibroblasty i w komórkach endotelialnych wyściółki oraz w rejonie podwyściółkowym błony maziowej chorych na RZS. Odnotowano także wewnątrz- i zewnątrzkomórkową ekspresję enzymu w złogach włókniaka występujących w luźnej strukturze tkankowej, w czasie nasilonej apoptozy. Ekspresja PADI4 w tkankach pochodzących od pacjentów z ChZS i osób zdrowych była zdecydowanie niższa. Cytrulinowane białka wykryto tylko w złogach włókniaka w reumatoidalnej błonie maziowej. Reagowały one wyłącznie z przeciwciałami klasy IgA i IgM.

Ekspresję PADI4 wykrywa się wyłącznie w tkance hematopoetycznej, włączając w to grasnicę, śledzionę, szpik kostny, wątrobę płodową i leukocyty krwi obwodowej, dlatego powzięto przypuszczenie, że enzym wykrywany w tkance synowialnej pochodzi z komórek hematopoetycznych lub ich pochodnych [25].

Ciekawe, że nie stwierdzono różnicy między ekspresją PADI4 w leukocytach pacjentów z RZS i osób zdrowych, nie wykryto też obecności cytruliny w ich komórkach krwi. Można więc przypuszczać, że cytrulinacyjna aktywność PAD w błonie maziowej jest w szczególności sposobem związana z patogenezą RZS [24].

Potencjalny model cytrulinacji białek w obrębie reumatoidalnego stawu przedstawili Vossenaar i wsp. [26]. Do objętej stanem zapalnym błony maziowej, pod wpływem działania różnych czynników chemotaktycznych, napływają monocyty, po przekształceniu w makrofagi dochodzi do ograniczenia transkrypcji jądrowej PADI4, zwiększa się natomiast poziom cytozolowej PADI2. Mimo że zmniejsza się poziom mRNA PADI4, stężenie białek tego enzymu pozostaje niezmiennione. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być fakt, że transkrypty mRNA PADI4 z usposabiającymi do RZS haplotypami mają dłuższy okres półtrwania, są gromadzone i dają więcej białkowych produktów w zapalnej błonie maziowej.

Kolejną charakterystyczną cechą reumatoidalnej błony maziowej jest nadmierne odkładanie się włóknika, zarówno w wyściółce, jak i w głębszych warstwach błony maziowej [24].

Zagregowany włóknik może występować w formie zwartych bloków lub luźnych gąbczastych struktur tkankowych. Mimo że ekspresję PADI4 obserwowano tylko w luźnych strukturach, to obie formy są wyraźnie cytrulinowane.

Komórki zawierające PADI4 zlokalizowane są w pobliżu cytrulinowanych białek i komórek apoptotycznych [24]. Podlegające działaniu kaspaz komórki apoptotyczne tracą swoją integralność, dochodzi do niekontrolowanego napływu jonów wapnia i aktywacji deiminazy – początkowo w cytozolu – PADI2, a następnie, w miarę postępowania procesu obumierania komórki, kiedy dochodzi do fragmentaryzacji jądra, także PADI4 [26]. Ze zniszczonych komórek enzymy wydostają się na zewnątrz, gdzie dochodzi do dalszej pozakomórkowej deiminacji. Po cytrulinacji złogi o gąbczastej, luźnej strukturze przekształcają się w zwarte bloki, a deiminaza ulega degradacji, dlatego też brak ekspresji badanego enzymu w tych strukturach [24].

Aby zrozumieć, dlaczego do takich procesów dochodzi w zmienionym zapalnie stawie, należy pamiętać, że podczas gdy u osób zdrowych makrofagi stawowe stanowią 20–30%, w reumatoidalnej błonie maziowej dochodzi do nadmiernego nagromadzenia makrofagów, które mogą stanowić nawet 80–100% komórek [28]. Długotrwała aktywacja (> 24 h), a z taką spotykamy się w zapalnej, reumatoidalnej błonie maziowej, sprawia, że stają się one podatne na apoptozę [29]. W ten sposób może dochodzić do apoptozy komórek synowialnych, aktywacji i uwalniania na zewnątrz deiminazy peptydyloargininowej, cytrulinacji nagromadzonych białek, a w konsekwencji aktywacji specyficznych dla cytruliny limfocytów B i produkcji antycytrulinowych przeciwciał w obrębie stawu objętego procesem reumatoidalnym.

Pojawia się coraz więcej doniesień, w których cytrulinacja przypisywana jest raczej do stanu zapalnego nie-

koniecznie związanego z RZS. Chapuy-Regaud i wsp. [30] podczas artroskopii stawu kolanowego pobierali tkankę synowialną od pacjentów chorych na RZS i inne choroby reumatyczne. Pobrane skrawki oceniano pod względem histopatologicznym i immunologicznym na obecność cytrulinowanych białek przy użyciu króliczych przeciwciał dla L-cytruliny. Okazało się, że obecność cytrulinowanego włóknika nie ogranicza się tylko do błony maziowej chorych na RZS. Deiminowane białka występowały w jądrach i cytoplazmie makrofagów i fibroblastów w dwóch przypadkach zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa (ZZSK), w jednym przypadku tłuszczowego zapalenia stawów (ŁZS), niesklasyfikowanej spondyloartropatii i w przypadku ChZS. Artroskopowo i histologicznie wykazano, że u wszystkich pacjentów występowało zapalenie błony maziowej.

Dane te wskazują, że obecność cytrulinowanych białek wiąże się ze stanem zapalnym, natomiast cechą charakterystyczną RZS jest odpowiedź immunologiczna z produkcją przeciwciał antycytrulinowych.

Deiminaza peptydyloargininowa jest obecna w wielu różnych tkankach – dotąd nie znamy jej wszystkich funkcji ani biochemicznej struktury wszystkich substratów.

Prawdopodobnie odgrywa ona ważną rolę w procesach końcowego różnicowania naskórka, rozwoju skóry i mózgu [31]. Jest też wyraźnie powiązana z apoptozą, być może jej wydzielanie jest częścią fizjologicznego procesu mającego na celu przyspieszenie rozpadu, a następnie likwidacji obumierających komórek i dopiero w specyficznych warunkach proces ten staje się patologiczny.

## Wpływ cytrulinacji na właściwości białek

Pojawienie się przeciwciał ACPA jest nie tylko jednym z ogniw patogenezy RZS, ale przede wszystkim elementem odpowiedzi organizmu na nadmierną ekspresję cytrulinowanych antygenów.

Wszystkie z dotychczas opisanych deiminowanych białek pełnią określoną funkcję, której zaburzenie może nie tylko przyspieszać śmierć komórki, ale także (w wyniku nadmiernej lub przewlekłej cytrulinacji) prowadzić do nasilenia zmian patologicznych w rozwoju RZS.

Opisany w latach 90. ubiegłego wieku antygen Sa, reagujący z przeciwciałami występującymi w surowicy chorych na RZS, został zidentyfikowany jako cytrulinowana wimentyna [4].

**Wimentyna** jest białkiem cytoskieletowym tworzącym filamenty pośrednie typu III, dość obficie występującym w synowialnych fibroblastach [32]. To również dynamiczne białko podlegające regulacji poprzez fosforylację, którego rola nie ogranicza się tylko do stabilizowania architektury cytoplazmy [33]. W stanie zapalnym

jest wydzielana przez aktywowane makrofagi indukowane przez czynnik martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor*  $\alpha$  – TNF- $\alpha$ ), co prawdopodobnie ma wpływ na efektywne zabijanie bakterii [34]. Obecność cytrulinowanej wimentyny stwierdzono w tkance synowialnej chorych na RZS [36].

Na powierzchni neutrofilów podlegających apoptozie zaobserwowano ekspresję wimentyny [35]. Dwie godziny po zainicjowaniu apoptozy pojawiają się fragmenty wimentyny o ciężarze cząsteczkowym 48 kDa, jako wynik działania kaspazy 3. Możliwe, że cytrulinacja wimentyny prowadzi jedynie do rozdzielenia jej filamentów, destrukcji cytoszkieletu i skurczenia komórki w procesie apoptozy [37]. Specyficzne podwyższenie ilości cytrulinowanej wimentyny może być natomiast wynikiem nieefektywnego usuwania martwych komórek [36].

**Fibronektyna** jest glikoproteiną adhezyjną, powszechnie występującą na powierzchni komórek (fibroblastów i mioblastów), w macierzy wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej tkanki łącznej oraz płynach organicznych. Białko to jest kodowane przez jeden gen, ale alternatywne łączenie egzonów na etapie składania mRNA (*splicing*) pozwala na tworzenie wielu izoform, odgrywających ważną rolę w różnych procesach fizjologicznych, włączając w to: adhezję komórkową, migrację, proliferację i różnicowanie komórek.

Fibronektyna może reagować z różnymi ligandami na powierzchni komórki oraz poza nią, takimi jak: fibryna, heparyna, kolagen, żelatyna, IgG czy CD44 [9]. Domeny znajdujące się na C-końcowym fragmencie fibronektyny indukują powstawanie tlenku azotu (NO) i metaloproteaz w macierzy reumatoidalnej chrząstki, poprzez oddziaływanie z powierzchniową glikoproteiną CD44 [38]. Zarówno NO, jak i metaloproteazy mają właściwości prozapalne pogłębiające destrukcję otaczających tkanek. Ponadto fibronektyna indukuje degradację kolagenu typu II przy współdziałaniu interleukiny 1, stymuluje TNF- $\alpha$  i kwas hialuronowy do zwiększania ekspresji GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) w celu zahamowania apoptozy eozynofiliów we krwi obwodowej i w drogach oddechowych [39].

Zarówno fibronektyna, jak i ACPA są dość obficie reprezentowane w tkankach chorego na RZS, dlatego może dochodzić do deiminacji, a przez to także do modyfikacji tych funkcji fibronektyny. U chorych na RZS w płynie stawowym oraz surowicy wykryto zwiększone stężenie cytrulinowanej fibronektyny, znaleziono również pozakomórkowe złogi włóknika i cytrulinowanej fibronektyny [9].

Jednym z pierwszych przejawów zmian zachodzących w reumatoidalnej błonie maziowej jest nadmierna angiogeneza, której głównym mediatorem jest naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (*vascular endothelial*

*growth factor* – VEGF) [40]. Działa on poprzez swoje receptory na komórkach endotelialnych lub ich pochodnych. Stężenie VEGF jest zwiększone u chorych na RZS i powiązane z aktywnością choroby [41].

Pomiędzy VEGF, receptorem VEGF i receptorem fibronektyny, przy współdziałaniu integryny  $\alpha 5\beta 1$  tworzy się wiązanie, które indukuje migrację i proliferację komórek endotelialnych [42].

Po deiminacji znacznie wzrasta wiązanie fibronektyny w porównaniu z formą natywną [9].

Prawdopodobnie przekształcenie argininy w cytrulinę w miejscu wiążącym VEGF wywołuje zmianę konformacji molekularnej fibronektyny i zwiększa jej powinowactwo do VEGF, co powoduje nasilenie jego „neowaskularyzacyjnej” aktywności.

**Antytrombina III** jest następnym białkiem, którego cytrulinacja może przyczyniać się do nasilenia angiogenezy. Trombina jest proteazą występującą w osoczu, wytwarzaną z protrombiny pod wpływem działania tromboplastyny osoczowej. Może ona aktywować układ krzepnięcia poprzez przekształcenie rozpuszczalnego fibrynogenu w nierozpuszczalną fibrynę. Trombina jest także stymulatorem angiogenezy poprzez zwiększanie ekspresji receptorów dla VEGF [43], a – jak wiadomo – nadmierne odkładanie włóknika oraz wzmożona angiogeneza są charakterystyczne dla RZS.

Wraz z aktywowanym czynnikiem Xa, trombina nasila produkcję prozapalnych prostacyklin [44]. Antytrombina jest regulatorem aktywności trombiny. Po związaniu z heparyną może tworzyć kompleks z trombiną, ograniczając jej proteazową aktywność.

W osoczu chorych na RZS stwierdzono zwiększone stężenie cytrulinowanej antytrombiny [10]. Ponieważ *in vitro* cytrulinacja ogranicza aktywność antytrombiny, dlatego przypuszcza się, że taki sam efekt może zachodzić w organizmie, co pośrednio wpływa na nasilenie procesów prozapalnych.

**Fibrynogen** jest kolejnym cytrulinowanym białkiem często wykrywanym w reumatoidalnym płynie stawowym. W błonie maziowej chorych na RZS wykryto cytrulinowane formy łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  fibrynogenu [27]. Przeciwciała dla cytrulinowanego fibrynogenu wykryto u 75% pacjentów CCP+, a kompleksy zawierające fibrynogen u 50% osób [45]. Ciekawe jest, że deiminowanego fibrynogenu nie wykryto w surowicy chorych na RZS, co świadczy o miejscowej cytrulinacji [11].

Zarówno fibrynogen, jak i fibryna odgrywają ważną rolę w zapalnych procesach immunologicznych; integryny i inne receptory tych białek występują na powierzchni wielu komórek, w tym neutrofilów i makrofagów [46].

Przypuszcza się, że fibrynogen stanowi strukturalne rusztowanie dla podtrzymania i rozwoju tkanki reumatoidalnej [47], jest też czynnikiem chemotaktycznym dla



komórek endotelialnych zaangażowanych w proces angiogenezy. Poprzez receptory TLR-4 fibrynogen może stymulować sekrecję chemokin przez makrofagi [48]. Wykazano, że obecne w RZS kompleksy zawierające cytrulinowany fibrynogen stymulują makrofagi do produkcji TNF- $\alpha$  [49].

Deiminacja fibrynogenu znacznie osłabia katalizowaną przez trombinę polimeryzację i tworzenie włóknika, a co za tym idzie – może wpływać na zachwianie równowagi procesów krzepnięcia i fibrylizacji [50]. Deiminacja fibryny może hamować jej degradację przez plazminę, ponieważ reszty argininowe są miejscami proteolitycznego cięcia tego enzymu.

Zaburzenie fibrylizacji prowadzi do gromadzenia i odkładania włóknika w błonie maziowej, co stanowi istotę patogenezy RZS [51].

**Cytrulinowana  $\alpha$ -enolaza** jest jeszcze jednym białkiem docelowym dla antycytrulinowych przeciwciał. Enolaza to jeden z enzymów szlaku glikolizy przekształcający 2-fosfo-glicerynian w fosfoenolopirogronian w obecności jonów magnezu. Występuje ona zarówno w cytozolu, jak i na powierzchni komórek prokariota i eukariota. Jest białkiem wielofunkcyjnym i może pełnić wiele niekatalitycznych funkcji. Wyeksponowana na powierzchni komórki, staje się receptorem dla różnego typu ligandów, w tym dla plazminogenu. Połączenie enolaza–plazminogen/plazmina ułatwia inwazyjność drobnoustrojów, a także uczestniczy w procesie biogenezy i rozrostu tkanek nowotworowych [52].

Obecność enolazy na powierzchni komórek patogenów może inicjować tworzenie przeciwciał, które w wyniku mimikry molekularnej mogą przyczynić się do rozwoju autoagresji. Wysokie miana autoprzeciwciał dla enolazy są wykrywane w chorobach tkanki łącznej, takich jak toczeń rumieniowaty układowy, choroba Behçeta czy krieglobulinemia.

W schorzeniach tych nie stwierdzono obecności przeciwciał anty CEP-1 [5]. Dotąd nie można ocenić, w jaki sposób deiminacja wpływa na właściwości enolazy – czy stymuluje, czy ogranicza jej wielorakie funkcje. Poszukiwanie tej odpowiedzi stanowi ciekawy temat dalszych badań. Wykrycie przeciwciał dla deiminowanej  $\alpha$ -enolazy przyczyniło się pośrednio do wznowienia badań nad rolą infekcji w etiologii RZS.

### ***Porphyromonas gingivalis* – bakteryjny czynnik etiologiczny w reumatoidalnym zapaleniu stawów**

Zainteresowanie *P. gingivalis* jako potencjalnym patogenem istotnym w rozwoju RZS wzrosło po wykryciu przeciwciał dla cytrulinowanej  $\alpha$ -enolazy [6]. Okazało się bowiem, że rozpoznawany epitop jest podobny do

bakteryjnej enolazy i może powodować krzyżową reaktywność przeciwciał, co może stać się pierwotnym sygnałem do antycytrulinowej odpowiedzi immunologicznej [5].

Już w 1982 r. Snyderman i McCarty opisali podobieństwa w przebiegu procesu zapalnego występującego w RZS i w chorobach zapalnych przyzębia [53]. Chorzy na RZS częściej zapadają na choroby przyzębia, takie jak krwawienie dziąseł, wypadanie zębów, tworzenie się kamienia nazębnego czy obniżenie wysokości zębodołów [54]. Leczenie przeciwzapalne stosowane w RZS poprawia także stan jamy ustnej tych pacjentów [55]. W ślinie, surowicy, dziąstach i płytce poddziąsłowej chorych na zapalenie przyzębia stwierdzono obecność RF [56]. Z jednej strony seropozytywni pacjenci z zapaleniem przyzębia wykazywali podwyższony poziom przeciwciał klasy IgG i IgM dla mikroorganizmów jamy ustnej. Z drugiej strony w surowicy i płynie stawowym chorych na RZS stwierdzono obecność DNA flory bakteryjnej jamy ustnej, jak i przeciwciał dla tych bakterii [57].

Zarówno w RZS, jak i w chorobach przyzębia miejscowy stan zapalny dotyczący błony śluzowej dziąseł czy błony maziowej stawu pogłębiany jest poprzez napływ komórek zapalnych z krążenia. Aktywowane makrofagi produkują duże ilości cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ ), co prowadzi do stymulacji wydzielania cząsteczek adhezyjnych i uwalniania kolejnych mediatorów reakcji zapalnej: cytokin, eikozanoidów, enzymów proteolitycznych oraz wydzielania aktywnych form tlenu, azotu i aktywacji składowych dopełniacza. Końcowym efektem tych procesów jest resorpcja przylegających kości [58]. Odnotowano, że u pacjentów z szybko rozwijającą się chorobą przyzębia częściej występują antygeny HLA-DR4 [59].

Zapalenie przyzębia jest chorobą wywołowaną przez patogenne drobnoustroje obecne w płytce nazębnej, wśród których *P. gingivalis* zajmuje główne miejsce.

Jest to pałeczka Gram-ujemna, fakultatywny beztlenowiec, mający wiele cech wspomagających jego inwazyjność, tj. rzęski, które ułatwiają przyleganie do komórek nabłonka, kapsuła, chroniąca przed fagocytozą, LPS, który uczestniczy w procesie niszczenia przyzębia, enzymy proteolityczne, w tym proteaza cysteinowa (gingipaina R), oraz małowcząsteczkowe substancje toksyczne [60].

*Porphyromonas gingivalis* ma jeszcze jedną bardzo ciekawą cechę – jest dotychczas jedynym poznanym drobnoustrojem wytwarzającym deiminazę peptydylo-argininową (inne prokariota produkują deiminazę argininową) [61].

W procesie deiminacji argininy dochodzi do uwalniania amoniaku, który może neutralizować kwaśne środowisko jamy ustnej, wpływać pozytywnie na aktywację

naturalnych proteaz, inaktywować peptydazy i stymulować wytwarzanie ATP przez enzymy dostępne w cyklu deiminazy [61]. Działanie bakteryjnej deiminazy nie tylko tworzy dogodny środowisko do życia drobnoustrojów, ale także poprzez degradację włókniaka dostarcza peptydy podtrzymujące ich wzrost [58].

Pojawienie się cytrulinowanych białek u osób z zapaleniem przyzębia może narażać je na antycytrulinową odpowiedź, taką jak w RZS. Co ciekawe, wykryto przeciwciała ACPA u pacjentów z chorobami przyzębia bez objawów reumatoidalnych. U chorych na RZS poziom przeciwciał dla cytrulinowanych białek korelował z poziomem przeciwciał dla *P. gingivalis* [58].

## Podsumowanie

Obecność antycytrulinowych przeciwciał jest zaledwie wierzchołkiem góry lodowej procesów patologicznych zachodzących w tkance synowialnej i poza nią, a będących wynikiem zmian strukturalnych i funkcjonalnych deiminowanych białek.

Cytrulinacja, która prawdopodobnie odgrywa ważną rolę w apoptozie komórek, u osób mających genetyczną predyspozycję do zachorowania na RZS, pod wpływem przewlekłego, nasilonego procesu zapalnego staje się jednym z czynników patogenezы tej choroby.

Podwyższona ekspresja cytrulinowanych białek stymuluje układ immunologiczny do produkcji przeciwciał. Proces ten mogą nasilać drobnoustroje, które same mogą dokonywać deiminacji białek lub amplifikować odpowiedź gospodarza poprzez wzmaganie krzyżowej reaktywności przeciwciał.

Pojawiają się doniesienia, sugerujące konieczność wyodrębnienia różnych postaci RZS w zależności od obecności przeciwciał antycytrulinowych, ze względu na ich znaczenie prognostyczne, powiązanie z antygenami zgodności tkankowej oraz gorsze rokowania u pacjentów seropozytywnych [62]. Takie założenie implikuje konieczność zbadania różnic między ACPA obecnymi w RZS a występującymi w innych chorobach, takich jak wirusowe zapalenie wątroby czy gruźlica. Zwłaszcza że wiadomo, iż profil izotypowy przeciwciał ACPA u chorych na RZS i ich zdrowych krewnych jest różny.

Mimo że żadne z prezentowanych badań nie wyjaśnia jednoznacznie przyczyn prowadzących do rozwoju RZS, pozwalają jednak one przyjrzeć się bliżej mechanizmom patogenezы tej choroby.

Nagromadzenie wiedzy dotyczącej genetycznych uwarunkowań rozwoju RZS oraz wpływu czynników środowiskowych może przysłużyć się do wcześniejszego, profilaktycznego wdrożenia leczenia u osób szczególnie narażonych na zachorowanie, co – jak wiadomo – ma ogromny wpływ na rozwój i przebieg choroby.

## Piśmiennictwo

1. Nienhuis RL, Mandema E. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis; the antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis* 1964; 23: 302-305.
2. Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, et al. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 1979; 2: 97-99.
3. Simon M, Girbal E, Sebbag M, et al. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1993; 92: 1387-1393.
4. Vossenaar ER, Després N, Lapointe E, et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: R142-150.
5. 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.
6. Kinloch A, Lundberg K, Wait R, et al. Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 2287-2295.
7. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 380-386.
8. Vossenaar ER, Zandman AJ, Van Venrooij WJ. Citrullination, a possible functional link between susceptibility genes and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: 1-5.
9. Chang X, Yamada R, Suzuki A, et al. Citrullination of fibronectin in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 1374-1382.
10. Chang X, Yamada R, Sawada T, et al. The inhibition of antithrombin by peptidylarginine deiminase 4 may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 293-298.
11. Takizawa T, Suzuki A, Sawada T, et al. Citrullinated fibrinogen detected as a soluble citrullinated autoantigen in rheumatoid arthritis synovial fluids. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 1013-1020.
12. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1205-1213.
13. Revirion D, Perdriger A, Toussiroit E, et al. Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 535-540.
14. Hammer J, Bono E, Gallazzi F, et al. Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based on peptide side chain scanning. *J Exp Med* 1994; 180: 2353-2358.
15. Hill JA, Southwood S, Sette A, et al. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1\*0401 MHC class II molecule. *J Immunol* 2003; 171: 538-541.
16. Weyand CM, McCarthy TG, Goronzy JJ. Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1995; 95: 2120-2126.
17. Kowalski MK, Hilt J, Strańczyk J i wsp. Związek polimorfizmu genów HLA-DRB1 z występowaniem i wykładnikami ciężkości

- przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów. *Alergia Astma Immunologia* 2001; 6: 51-56.
18. Ioan-Facsinay A, Willemze A, Robinson DB, et al. Marked differences in fine specificity and isotype usage of the anti-citrullinated protein antibody in health and disease. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 3000-3008.
  19. El-Gabalawy HS, Robinson DB, Hart D, et al. Immunogenetic risks of anti-cyclical citrullinated peptide antibodies in a North American Native population with rheumatoid arthritis and their first-degree relatives. *J Rheumatol* 2009; 36: 1130-1135.
  20. Linn-Rasker SP, van der Helm-van Mil AH, van Gaalen FA, et al. Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 366-371.
  21. Huizinga TW, Amos CL, van der Helm-van Mil AH, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3433-3438.
  22. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 38-46.
  23. Källberg H, Jacobson S, Bengtsson C, et al. Alcohol consumption is associated with decreased risk of rheumatoid arthritis: results from two Scandinavian case-control studies. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 222-227.
  24. Chang X, Yamada R, Suzuki A, et al. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 40-50.
  25. Suzuki A, Yamada R, Chang X, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003; 34: 395-402.
  26. Vossenaar ER, Radstake TR, van der Heijden A, et al. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 373-381.
  27. Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhausser E, et al. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific anti-filaggrin autoantibodies are deaminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 2001; 166: 4177-4184.
  28. Cutolo M, Sulli A, Barone A, et al. Macrophages, synovial tissue and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1993; 11: 331-339.
  29. Rodenburg RJ, Ganga A, van Lent PL, et al. The anti-inflammatory drug sulfasalazine inhibits tumor necrosis factor alpha expression in macrophages by inducing apoptosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1941-1950.
  30. Chapuy-Regaud S, Sebbag M, Baeten D, et al. Fibrin deimination in synovial tissue is not specific for rheumatoid arthritis but commonly occurs during synovitides. *J Immunol* 2005; 174: 5057-5064.
  31. Senshu T, Kan S, Ogawa H, et al. Preferential deimination of keratin k1 and filaggrin during the terminal differentiation of human epidermis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225: 712-719.
  32. Osung OA, Chandra M, Holborov EJ. Intermediate filaments in synovial lining cells in rheumatoid arthritis and other arthritides are of vimentin type. *Ann Rheum Dis* 1982; 41: 74-77.
  33. Martys JL, Ho CL, Liem RK, Gundersen GG. Intermediate filaments in motion: observations of intermediate filaments in cells using green fluorescent protein-vimentin. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 1289-1295.
  34. Mor-Vaknin N, Punturieri A, Sitwala K, Markovitz DM. Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 59-63.
  35. Moisan E, Girard D. Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 489-498.
  36. Tilleman K, Van Steendam K, Cantaert T, et al. Synovial detection and autoantibody reactivity of processed citrullinated isoforms of vimentin in inflammatory arthritides. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 597-604.
  37. Byun Y, Chen F, Chang R, et al. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* 2001; 8: 443-450.
  38. Yasuda T, Kakinuma T, Julovi SM, et al. COOH-terminal heparin-binding fibronectin fragment induces nitric oxide production in rheumatoid cartilage through CD44. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43: 1116-1120.
  39. Yasuda T, Poole AR. A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1-mediated pathway. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 138-148.
  40. Clavel G, Bessis N, Boissier MC. Recent data on the role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2003; 70: 321-326.
  41. Lee SS, Joo YS, Kim WU, et al. Vascular endothelial growth factor levels in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 321-324.
  42. Wijelath ES, Murray J, Rahman S, et al. Novel vascular endothelial growth factor binding domains of fibronectin enhance vascular endothelial growth factor biological activity. *Circ Res* 2002; 91: 25-31.
  43. Maragoudakis ME, Kraniti N, Giannopoulou E, et al. Modulation of angiogenesis and proteoglycanase by a thrombin receptor mimetics and antagonists. *Endothelium* 2001; 8: 195-205.
  44. Esmon CT. Role of coagulation inhibitors in inflammation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 51-56.
  45. Zhao X, Okeke NL, Sharpe O, et al. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: R94.
  46. Wright SD, Weitz JI, Huang AJ, et al. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 7734-7738.
  47. Ishikawa H, Hirata S, Andoh Y, et al. An immunohistochemical and immunoelectron microscopic study of adhesion molecules in synovial pannus formation in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1996; 16: 53-60.
  48. Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001; 167: 2887-2894.
  49. Clavel C, Nogueira L, Laurent L, et al. Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fc gamma



- receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 678-688.
50. Nakayama-Hamada M, Suzuki A, Furukawa H, et al. Citrullinated fibrinogen inhibits thrombin-catalysed fibrin polymerization. *J Biochem* 2008; 144: 393-398.
51. Busso N, Péclat V, Van Ness K, et al. Exacerbation of antigen-induced arthritis in urokinase-deficient mice. *J Clin Invest* 1998; 102: 41-50.
52. Seweryn E, Pietkiewicz J, Szamborska A i wsp. Enolaza na powierzchni komórek eukariota i prokariota jako receptor plazminogenu ludzkiego. *Postępy Hig Med Dośw* 2007; 61: 672-682.
53. Snyderman R, McCarty GA. Analogous mechanisms of tissue destruction in rheumatoid arthritis and periodontal disease. In: *Host-Parasite Interaction in Periodontal Diseases*. Genco RJ, Mergenhagen SE (eds). American Society of Microbiology, Washington 1982; 354-362.
54. Gleissner C, Willershausen B, Kaesser U, Bolten WW. The role of risk factor for periodontal disease in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Med Res* 1998; 3: 387-392.
55. Kässer UR, Gleissner C, Dehne F, et al. Risk for periodontal disease in patients with longstanding rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 2248-2251.
56. Rosenstein ED, Greenwald RA, Kushner LJ, Weissmann G. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation* 2004; 28: 311-318.
57. Moen K, Brun JG, Valen M, et al. Synovial inflammation in active rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis facilitates trapping of a variety of oral bacterial DNAs. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: 656-663.
58. De Pablo p, Chapple ILC, Buckley CD, et al. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 218-224.
59. Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol* 2005; 32 Suppl 6: 159-179.
60. Stotwińska SM. Mikrobiologia zapaleń przyzębia na podstawie piśmiennictwa i badań własnych. Część II: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intrmedia*. *Nowa stomatologia* 2005; 3: 151-154.
61. McGraw WT, Potempa J, Farley D, Travis J. Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from *Porphyromonas gingivalis*, peptidylarginine deiminase. *Infect Immun* 1999; 67: 3248-3256.
62. Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, et al. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 651-675.