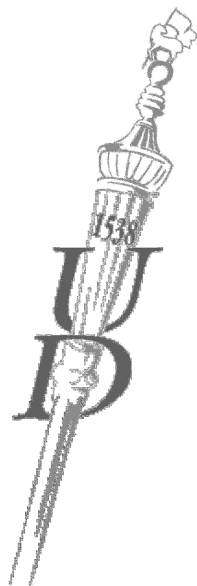


**OXIDATÍV STRESSZ TOLERÁNS *CANDIDA ALBICANS* MUTÁNSOK
MORFOLÓGIAI ÉS ÉLETTANI VIZSGÁLATA**

Fekete Andrea

Témavezetők: Dr. Pócsi István, Prof. Dr. Gergely Lajos



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2009

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**OXIDATÍV STRESSZ TOLERÁNS *CANDIDA ALBICANS* MUTÁNSOK
MORFOLÓGIAI ÉS ÉLETTANI VIZSGÁLATA**

Fekete Andrea

Témavezetők: Dr. Pócsi István, Prof. Dr. Gergely Lajos

DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2009

Az értekezés címe: Oxidatív stressz toleráns *Candida albicans* mutánsok morfológiai és élettani vizsgálata

Doktori Iskola: DEOEC Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezetők: Dr. Pócsi István, kandidátus; Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora

A Bíráló Bizottság

elnöke:	Prof. Dr. Nemes Zoltán, az MTA doktora
Opponensek:	Dr. Miklós Ida, Ph.D., Dr. Manczinger László, Ph.D
Tagok:	Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba, az MTA doktora Dr. Szabó Béla, kandidátus

Az értekezés védésének

helyszíne:	DE OEC I. sz. Belklinika tanterem
időpontja:	2009. június 12., 13 óra

Bevezetés

A kommenzalistaként élő *Candida albicans* rezisztensebb az oxidatív stresszre, mint a *Saccharomyces cerevisiae* és *Schizosaccharomyces pombe* élesztők, és képes *in vitro* adaptálódni a különböző oxidánsok által előidézett oxidatív stresszhez. A *C. albicans* által termelt erőteljes antioxidánsok képesek megbirkózni a polimorfonukleáris leukociták (PMNL) és a makrofágok által termelt reaktív oxigén részecskékkel (ROS)(szuperoxid, peroxid, hipoklorit) továbbá a reaktív nitrogén intermedierekkel (RNIs) (nitrogén-oxid /NO/, peroxinitrit), melyek akkor keletkeznek, amikor a gombasejtek belépnek a véráramba és megfertőzik a szöveteket. A gomba antioxidáns védelemi rendszeréhez tartoznak a nagy ROS semlegesítő potenciállal rendelkező kis molekulatömegű metabolitok pld: a D-eritroaszcorbinsav és 2,4-(hidroxil)fenil-etanol, valamint azon potenciós enzimek, amelyek neutralizálják a ROS-t (kataláz, GPx, SOD, tioredoxin, tioredoxin reduktáz és metionin-szulfoxid reduktáz) és az RNIs-t (NO-responsive flavohemoglobin). Ezen enzimszisztéma fokozott működését mutatták be a *C. albicans* sejtekben, amikor az élesztősejteket a teljes vér vagy a szeparált PMNL-k, valamint a makrofágok hatásainak tették ki. A fertőzés korai szakaszában a gombaellenes védekezésben a veszélyes immunrendszer, főként a PMNL-k szerepe a döntő, míg a monocitáknak és makrofágoknak inkább a szepszisek későbbi fázisaiban van kulcsfontosságú feladata.

Bár a patogén gombák antioxidatív enzimeit a "túlélés faktorainak" tekintjük, azáltal azonban, hogy elősegítik ezen mikroorganizmusok életben maradását a telepképzés és szövetek fertőzése közben, szűkebb értelemben véve mégis a virulencia faktorok közé sorolhatjuk és jelentőségük a gombák -különösen a mélyebb szövetek és a véredények irányába történő- elterjedésében és a folyamatosan változó környezethez való alkalmazkodásában felbecsülhetetlen. Mindezek ismeretében érthető, hogy ha ezen kulcsfontosságú antioxidatív enzimek génjeinek a kódolásában valamilyen hiba keletkezik, akkor lelassulhat a növekedés. mérséklődhet a virulencia és csökkenhet a kórokozó életképessége a teljes vér vagy a PMNL-k jelenlétében. A *C. albicans* bizonyos jellemző tulajdonságait virulencia faktoroknak tekintik. Az egyik ilyen virulencia tulajdonság a fenotípusos variabilitás (élesztő-hifa átalakulás lehetősége), hiszen mindkét morfológiai forma szerepet játszik a gomba életben maradásában, illetve a gazdaszervezet kolonizációjában. A morfogenezis létfontosságú a makrofágokban a *C. albicans* túlélése szempontjából, ugyanis

fagocitózis után a gombasejtek csíratömlőt képeznek, amely a gazdasejt repedését idézheti elő és ezáltal a gomba ismételten kijuthat a véráramba. A gombák által termelt extracelluláris proteázokat [például az aszpartát proteázok (Sap)] szintén lehetséges virulencia faktorokként tartják számon, amelyek különböző módon járulnak hozzá a kórokozó patogenitásához, és legalább részleges szerepet játszanak a hámréteg károsításában, hogy a gomba beléphessen a véráramba. A foszfolipázok megkönnyítik a gazdaszervezet fertőzését azáltal, hogy szerepet játszanak a sejtmembrán-komponensek degradációjában.

Korábbi kutatások igazolták, hogy ha a *C. albicans* sejteket az immunrendszer hatásainak tesszük ki, akkor oxidatív stresszválaszt váltunk ki és ez gátló hatással van a gomba hífázó képességére, amely -mint már korábban említettem- egy rendkívül fontos virulencia faktor, ugyanis segíti a kórokozót abban, hogy kilépjen a véredényekből és a megtámadja a mélyebb szöveteket. Munkánk során megvizsgáltuk azt a feltételezést, hogy a krónikus oxidatív stresszhez való adaptálódás csökkenti a hífázó képességet és ezáltal csökken a patogenitás. Ennek érdekében a *C. albicans* sejteket növekvő koncentrációjú *t*-butil-hidroperoxiddal (*t*BOOH) kezeltük, amely egy oxidatív stresszt kiváltó vegyület és gyorsítja a lipidek peroxidációját a biológiai membránokban. A biológiai membránokon a *t*BOOH által keletkezett oxidatív sérülések nagyon hasonlóak lehetnek a fagociták NADPH-oxidáz-mieloperoxidáz (MPO) rendszer okozta károsodásokhoz. A fagocita sejtek az MPO-t használják a kórokozók elpusztításához. A NADPH-oxidáz-MPO rendszer sokféle ROS-t, OCl⁻-t, tirozil-gyököt és nitrát intermediereket termel, amelyek a *t*BOOH-hoz hasonlóan eredményesen változtatják és oxidálják a lipideket a lipidperoxidációs útvonalakon keresztül. Fontos megjegyeznünk, hogy a *t*BOOH és H₂O₂ (a fagocita sejtek NADPH-oxidáza általi szuperoxid termelés egyik toxikus bomlásterméke) élettani és transzkripciós hatásai nagyon hasonlóan tűntek a korábban megfigyelt oxidatív stressz válaszokkal és érzékenységgel *C. albicans*ban..

Célkitűzések

Mint ahogy a bevezetőben már említettem, az egészséges egyének bőr és nyálkahártyáinak felszínén (szájüreg, bélrendszer, hüvely) bizonyos *Candida* fajok (például *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*) a normál mikrobiális flóra tagjaiként gyakran megtalálhatóak. A humán szervezet gombákkal szembeni

immunválaszában a fagocita sejtek jelentős szerepet játszanak, mivel peroxidok termelésével pusztítják el a behatoló mikroorganizmusokat. Azonban a *C. albicans* laboratóriumi körülmények között képes adaptálódni a különböző oxidánsok által kiváltott oxidatív stresszhez.

Annak érdekében, hogy a krónikus oxidatív stressz által előidézett változásokat tanulmányozhassuk a *C. albicans*ban, *t*BOOH toleráns *C. albicans* mutánsokat hoztunk létre.

A doktori munkámban a következőket vizsgáltam meg:

- (1) Változik-e a létrehozott *t*BOOH toleráns *C. albicans* mutánsok (AF01-10) kialakult oxidatív stressz toleranciája a tárolás, az átoltások vagy passzálások hatására? (MIC_{*t*BOOH} érték és a GR enzimaktivitás vizsgálata alapján)
- (2) A krónikus oxidatív stresszhez történő adaptálódás *C. albicans* esetében gátolja-e az élesztő→hifa morfológiai átalakulást?
- (3) A *t*BOOH tolerancia kialakulása okozott-e változást az *in vitro* virulencia faktorokban (csírázási képesség, aszpartát proteáz aktivitás, foszfolipáz aktivitás, pszeudohifa és klamidospóra képzés) és hatással van-e az antigenicitásra?
- (4) Hogyan változik a *t*BOOH toleráns AF06 mutáns patogenitása egérben a *C. albicans* ATCC 14053 szülői törzshöz viszonyítva?
- (5) A *t*BOOH tolerancia hatással volt-e a sejtméretre és az élesztősejtek morfológiájára az AF06 mutánsban?
- (6) A *t*BOOH tolerancia mellett az egyéb oxidálószerekkel és az antifungális szerekkel szembeni ellenállóképesség változott-e az AF06 mutánsban?
- (7) Milyen változásokat tapasztalunk a GSH metabolizmusában a krónikus oxidatív stressznek kitett ATCC14053 *C. albicans*ban, illetve a stressztoleráns AF06 mutánsban?
- (8) Mivel a *t*BOOH a biológiai membránokban gyorsítja a lipidperoxidációs láncreakciókat, ezért megnéztük, hogy milyen hatással van a lipidösszetételre szülői (ATCC14053 *C. albicans*) és mutáns (AF06) törzsekben?
- (9) A *t*BOOH tolerancia hatással van-e a sejtlélegzésre az AF06 *C. albicans*ban?
- (10) Klinikai izolátum *C. albicans* minták felhasználásával új *t*BOOH toleráns *C. albicans* mutánsok létrehozása, majd azok morfológiai és fiziológiai jellemzése annak érdekében, hogy megnézzük, hogy az AF06 törzs fenotípusa mennyire tekinthető

általánosnak illetve könnyen kialakulnak-e az AF06 mutánsához hasonló oxidatív stressz toleráns törzsek.

(11) Végül klinikai izolátumok vizsgálatával igyekeztünk megválaszolni azt a kérdést, hogy milyen valószínűséggel jelenhet meg a természetben oxidatív stressz toleráns *C. albicans* mutáns?

Anyagok és módszerek

Felhasznált törzsek

Kísérleteinkben a *C. albicans* ATCC 14053 törzset használtuk a *t*-BOOH toleráns *C. albicans* (AF 01-10) törzsek létrehozásához. majd klinikai törzsek felhasználásával újabb *t*-BOOH toleráns mutánsokat izoláltunk (4774T, 8387T, 10934T, 19890T, 20072T). A *t*BOOH toleráns mutánsokat a szülői törzsek egyre növekvő *t*BOOH koncentrációjú tápoldatban történő folyamatos tenyésztésével hoztuk létre

A *C. albicans* ATCC 14053 szülői törzs és *C. albicans* AF06 mutáns törzs illetve a klinikai izolátumok és a belőlük létrehozott mutánsok morfológiai és élettani összehasonlítása

A törzsek *t*BOOH, H₂O₂, menadion nátrium biszulfid (MSB) és NaOCl MIC értékeit mikrodilúciós módszerrel határoztuk meg.

A *C. albicans* telepek formáját és méretét Sabouraud dextróz agaron (SDA), míg a törzsek növekedését Sabouraud tápoldatban (SDB) történő tenyésztéssel követtük nyomon.

Az törzsek LD₅₀ értékét egér fark vérébe történő oltásával határoztuk meg.

Az in vitro virulencia faktorok közül az élesztő sejtek csírázási képességet birka szérumban jelenlétében vizsgáltuk. Meghatároztuk az extracelluláris aszpartát proteáz aktivitást Remold módszere szerint, extracelluláris foszflipáz aktivitást tojássárgája-agar felszínén és a pszeudohifa és hifa képzést kukoricaliszt agaron és Spider agar felszínén.

A polimorfonukleáris leukociták (PMNL) szuperoxid termelésének mérésével az antigenicitásra következtettünk.

Az antifungális anyagok (flukonazol, vorikonazol, 5-fluorocitozin, amphotericin B) MIC értékeinek meghatározása mikrdilúciós módszerrel történt.

A törzsek sejt méretét scanning elektronmikroszkóppal, míg sejtjeinek szerkezeti felépítését transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével határoztuk meg.

A specifikus glutation reduktáz (GR) aktivitás, a glutation peroxidáz (GPx), a glutation S-transzferáz (GST), kataláz, glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PD) és a γ -glutamiltranszpeptidáz (γ GT) eredményeit $\text{mkat}(\text{kg protein})^{-1}$ mértékegységben adtuk meg. A szuperoxid dizmutáz (SOD) $\text{unit}(\text{mg protein})^{-1}$ mértékegységben lett megadva.

A GSH metabolizmusában végbemenő változásokat a GSH, GSSG mennyiségével és a GSH/GSSG arány meghatározásával figyeltük meg.

A lipidek mennyiségi és minőségi vizsgálata mellett a lipidperoxidációs folyamatok során keletkezett lipidhidroxid, konjugált dién és malondialdehid mennyiségét is megmértük.

Eredmények összefoglalása

Oxidatív stressz toleráns *C. albicans* mutánsokat hoztunk létre az ATCC 14053 szülői törzs sejtjeinek egyre növekvő *t*BOOH koncentrációjú tápoldatban történő tenyésztésével. Az AF01-10 oxidatív stressz toleráns mutánsok jelentősen csökkent hifa képző képességgel rendelkeztek és az AF06 mutáns szignifikánsan csökkent csíratömlő- és pszeudohifa képző képességét is igazoltuk.

Az egyéb virulencia tényezők vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy az AF06 mutáns csökkent extracelluláris foszfolipáz B aktivitással rendelkezett a szülői törzshöz viszonyítva. Ugyanakkor az AF06 mutáns törzs az extracelluláris aszpartát proteáz termelésében – ami a szövetekben való elterjedéshez szükséges – jelentősen felülmúlta az ATCC 14053 szülői törzset.

A PMNL sejtek hasonló mértékben ismerték fel mind a mutáns, mind a szülői törzset, amelyből arra következtettünk, hogy az oxidatív stressz tolerancia kialakulásakor az AF06 törzs sejt felülete nem változott, ezáltal a mutáció nincs hatással az antigenicitásra. Mivel a mutáns törzsünk nehezebben alakul fonalassá és a foszfolipáz B aktivitása is csökkent, a mutáció egy kevésbé patogén törzset eredményezett, amely a mutáns szülői törzshöz viszonyítva ötször nagyobb LD_{50} értékében nyilvánult meg (egérben: 40×10^4 vs. 8×10^4 db sejt) (4. ábra). Ennek következtében az oxidatív stresszel szembeni tolerancia, amelyről azt

feltételezték, hogy előnyös a *C. albicans* gombának, amikor az immunrendszer sejtjeivel találkozik, úgy tűnik, hogy hátrányos helyzetbe hozza a gombát, amikor az a véredényekből a mélyebb szövetekbe hatol be.

A sejtéletteni vizsgálatokban az AF06 mutáns törzsünkben jelentősen megnövekedett a GR, G6PD, GPx, kataláz és SOD enzimek specifikus aktivitása a szülői törzshöz viszonyítva. A stresszmentes körülmények között is megnövekedett antioxidáns enzimaktivitások összefüggést mutattak mind a nagy endogén oxidáns tartalommal (peroxid, GSSG, lipid hidroperoxid), mind a GSH/GSSG redox egyensúlyban bekövetkezett változásokkal.

A mutáns törzsnél a lipid peroxidációs termékek (konjugált dién, TBARS) mennyiségének növekedését mutattuk ki, miközben nőtt a SFA-, továbbá csökkent a MUFA- és PUFA-tartalom. A mutánsban csökkent citokróm c-függő, cianid-érzékeny és megnövekedett alternatív oxidáz-függő, cianid-rezisztens légzést figyeltünk meg. Ebből arra következtettünk, hogy a mutáció valószínűleg a mitokondriumokban a légzési láncot érintette és öröklődő mtDNS károsodásnak lehet az eredménye a GSSG, peroxid és lipidperoxidációs termékek fokozott termelése. Az AF06 mutáns mitokondriumainak szerkezeti felépítése és működése nem változott a mutáció hatására.

Az AF06 mutáns törzs fokozott toleranciával rendelkezett a fagociták által termelt ROS-kal szemben, ami például a H_2O_2 , szuperoxid- és OCl^- származékok esetében, a kétszeresen megnövekedett $MIC_{H_2O_2}$, MIC_{MSB} és MIC_{NaOCl} értékekben nyilvánult meg.). Az oxidálószerrel szemben 2-4-szeresére növekedett toleranciát mutatott a gyakran használt antimikotikumokkal szemben is (flukonazol, vorikonazol, amphotericin B, 5-fluoro-citozin).

Az AF06 *C. albicans* mutánsban bekövetkezett fiziológiai változások (folyamatos redox egyensúly változás, nagy peroxid koncentráció, fokozott lipidperoxidáció) képesek az antioxidáns védelmi rendszer működésének folyamatos indukciójára és fenntartására, ezáltal a mutáns fokozott oxidatív stressz-toleranciáját eredményezik.

A *C. albicans* klinikai izolátumokból (4774, 8387, 10934, 19890, 20072) az AF06 mutánsához hasonló módon *tBOOH* toleráns mutánsokat (4774T, 8387T, 10934T, 19890T, 20072T) hoztunk létre. Az új mutánsok fiziológiai és morfológiai vizsgálatok megnövekedett *tBOOH* és H_2O_2 toleranciát, antioxidáns enzimaktivitásokat (GR, GPx, G6PD), cianid-rezisztens, alternatív oxidáz-függő légzést, sejten belüli GSSG és GSH koncentrációt (kivéve a 19890T mutánsnál) tapasztaltunk. A GSH/GSSG redoxegyensúly kedvezőtlen irányban változott (a 4774T mutáns kivételével). A virulencia faktorok tekintetében minden mutánsban csökkent az extracelluláris foszfolipáz B termelés és csökkent a pseudohifa- és hifaképző képességük. A mutánsok növekedése jelentős mértékben késleltetett volt mind a

SDA felszínén, mind a SDB folyékony tápoldatban való tenyésztéskor. Fontos azonban megjegyeznünk, hogy nem veszítették el teljesen hifázó képességüket és a sejtek SDB tápoldatban növekedésben utolérték a szülői törzseiket.

Másrészről az antifungális szerekkel szembeni tolerancia (flukonazol, voriconazol, amphotericin B, 5-fluorocitozin) nagyon változatos képet mutatott, és a sejten belüli peroxidkoncentrációra, a teljes légzésre és a cianid-érzékeny citokróm-c függő légzésre a mutáció csak néhány mutáns esetében volt hatással. Ezen eredmények alapján határozottabban kijelenthetjük, hogy ha a *C. albicans* sejteket hosszú ideig folyamatosan lipidperoxidációt kiváltó *t*BOOH-val kezeljük, akkor *t*BOOH toleráns mutánsok jönnek létre, amelyekben az antioxidáns védelmi rendszer folyamatosan indukálódik és az élesztő-hifa morfológiai váltás gátolt.

A véletlenszerűen kiválasztott 46 *C. albicans* klinikai izolátum antioxidáns védelmi rendszerének vizsgálata során (MIC_{tBOOH} , $MIC_{H_2O_2}$, GR, G6PD, GPx) nem találtuk olyan törzset, amely oxidatív stressz-toleránsnak bizonyult volna.

Ugyanakkor, olyan *C. albicans* törzs természetes megjelenése, amely megnövekedett antioxidáns védelemmel, de emellett csökkent virulenciával rendelkezik, jelen tudásunk szerint valószínűtlen. Azonban az antimikotikumokkal való tartós kezelés hatására előfordulhat egy oxidatív stressz toleráns AF06 mutánshoz hasonló törzs szelektálódása, amelynek csökkent a légzése, de a gyakran használt antimikotikumokkal szemben (flukonazol, voriconazol, amphotericin B, 5-fluoro-citozin) ellenállóbb.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények és előadások

Közlemények:

Fekete A., Emri T., Gyetvai A., Gazdag Z., Pesti M., Varga Zs., Balla J., Cserhati Cs., Emőd L., Gergely L. & Pócsi I. (2007) Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphological transitions and decreased pathogenicity in a *tert*-butylhydroperoxide tolerant mutant of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **7(6)**: 834-47.

IF: 2,812

Fekete A., Pócsi I., Emri T., Gyetvai A., Gazdag Z., Pesti M., Karányi Zs., Majoros L., Gergely L. & Pócsi I. (2008) Physiological and morphological characterization of tert-butylhydroperoxide tolerant *Candida albicans* mutants. *J Basic Microbiol.* **48(6)**: 480-7.

IF: 0,991

Előadások, poszterek:

Fekete A., Emri T., Gazdag Z., Majoros L., Pesti M., Gergely L. & Pócsi I. Oxidative stress tolerance and pathogenicity of a lipid peroxide tolerant mutant of *Candida albicans* „A legjobb fiatal szerző” (Mikológia szekció) 13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, 2003.

Fekete A., Emri T., Gazdag Z., Blaskó A., Majoros L., Nagy E., Varga Zs., Balla J., Pesti M., Gergely L. & Pócsi I. Egy lipid-peroxid toleráns candida albicans mutáns jellemzése. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium, Keszthely, 2004.

Egyéb közlemények:

Sámi, T. Pusztahelyi, T. Emri, Z. Varecza, A. Fekete, A. Grallert, ZS. Karányi, L. Kiss and I. Pócsi : Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: chitinase production and antifungal effect of allosamidin. (2001) *J Gen Appl Microbiol.* **47(4)**: 201-211

IF: 0,512

Gyervai Á, Emri T, Takács K, Dergez T, Fekete A, Pesti M, Pócsi I & Lenkey B. (2006) Lovastatin possesses a fungistatic effect against *Candida albicans*, but does not trigger apoptosis in this opportunistic human pathogen. *FEMS Yeast Res* **6**: 1140-1148.

IF: 2,274

Gyetzvai Á, Emri T, Pusztahelyi T, Fekete A, Gyémánt Gy, Varga Z, Gazdag Z, Pesti M, Belágyi J, Emődy L, Pócsi I & Lenkey B (2007) High-dose methylprednisolone influences the physiology and virulence of *Candida albicans* ambiguously and enhances the candidacidal activity of the polyene antibiotic amphotericin B and the superoxide generating agent menadione. *FEMS Yeast Res*, **7(2)**: 265-75.

IF: 2,812

Fekete A, Soos L, Szekanecz Z, Szabo Z, Szodoray P, Barath S, Lakos G. (2007) Disturbances in B- and T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis: suggested relationships with antigen-driven immune responses. *J Autoimmun*. **29(2-3)**: 154-63.

IF: 3,391

Soós L, Szekanecz Z, Szabó Z, Fekete A, Zeher M, Horváth IF, Dankó K, Kapitány A, Végyvári A, Sipka S, Szegedi G, Lakos G. Clinical evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin by ELISA in rheumatoid arthritis. (2007) *J Rheumatol*. **34(8)**:1658-63.

IF: 3,151

Lakos G, Soós L, Fekete A, Szabó Z, Zeher M, Horváth IF, Dankó K, Kapitány A, Gyetzvai A, Szegedi G, Szekanecz Z. (2008) Anti-cyclic citrullinated peptide antibody isotypes in rheumatoid arthritis: association with disease duration, rheumatoid factor production and the presence of shared epitope. *Clin Exp Rheumatol*. **26(2)**: 253-60.

IF: 2,27

Szekanecz Z, Soós L, Szabó Z, Fekete A, Kapitány A, Végyvári A, Sipka S, Szücs G, Szántó S, Lakos G. (2008) Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Rheumatoid Arthritis: As Good as it Gets? *Clin Rev Allergy Immunol*. **34(1)**: 26-31.

IF: 2,077