

Received: 2011.03.09  
Accepted: 2011.05.18  
Published: 2011.06.29

## Białka szoku termicznego w reumatoidalnym zapaleniu stawów: przyjaciel czy wróg?

### Heat shock proteins in rheumatoid arthritis: friend or foe?

Stefan Tukaj<sup>1</sup>, Barbara Lipińska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Uniwersytet Gdański

<sup>2</sup> Katedra Biochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet Gdański

#### Streszczenie

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest jedną z najczęściej występujących chorób reumatycznych na świecie. RZS to uciążliwa, progresywna oraz wciąż nieuleczalna układowa choroba tkanki łącznej o podłożu autoimmunizacyjnym. Liczne doniesienia wskazują, iż silnie zachowane w ewolucji białka szoku termicznego (HSP) oddziałują z układem immunologicznym. Ostatnie prace badawcze dowodzą, że białka HSP pełnią istotną rolę w regulacji chronicznej reakcji zapalnej w RZS, przy czym najwięcej informacji dotyczy roli białek opiekuńczych należących do klasy HSP70, HSP60 i HSP40. Praca omawia doniesienia naukowe z ostatnich lat dotyczące roli białek HSP w rozwoju chorób reumatycznych oraz potencjalne możliwości zastosowania HSP w immunoterapii pacjentów cierpiących na RZS.

**Słowa kluczowe:**

**białka szoku termicznego • HSP40 • HSP60 • HSP70 • reumatoidalne zapalenie stawów • immunoterapia • immunoregulacja**

#### Summary

Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most common rheumatic diseases in the world. RA is a progressive and incurable systemic connective tissue disease with autoimmune background. Numerous reports indicate that the highly evolutionarily conserved heat shock proteins (HSP) are able to interact with the immune system. Recent research has shown that HSP play an important role in the regulation of chronic inflammation in RA, with the majority of information concerning the role of proteins belonging to the HSP70, HSP60 and HSP40 classes. This paper presents recent views on the role of HSP in the development of rheumatic diseases, as well as the potential for application of HSP in immunotherapy of patients suffering from RA.

**Key words:**

**heat shock proteins • HSP40 • HSP60 • HSP70 • rheumatoid arthritis • immunotherapy • immunoregulation**

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=950501>

**Word count:** 3952

**Tables:** –

**Figures:** 2

**References:** 103

**Adres autora:**

dr Stefan Tukaj, Katedra Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Uniwersytet Gdański, Al. Piłsudskiego 46, 81-378 Gdynia; e-mail: stefantukaj@gmail.com

## WPROWADZENIE

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) należy do grupy układowych chorób tkanki łącznej o podłożu autoimmunizacyjnym. Według najnowszych doniesień, wyróżnia się 171 chorób reumatycznych [<http://www.arthritisinsight.com>], natomiast RZS należy do jednego z najczęściej występujących schorzeń w tej grupie [46]. Szacuje się, że RZS dotyka prawie 1% populacji ludzkiej i występuje 2,5-krotnie częściej u kobiet niż u mężczyzn. RZS może się rozwinąć u ludzi w każdym wieku, głównie dotyka jednak osób między 4 a 7 dekadą życia [46]. Choroba obejmuje głównie stawy drobne, międzypaliczkowe bliższe dłoni oraz stóp, powodując ich obrzęk, ograniczenie ruchomości, deformację i dotkliwy ból [25]. Początkowa faza choroby objawia się przede wszystkim chronicznym stanem zapalnym błony maziowej stawów (synovium), do której przenikają liczne elementy układu immunologicznego (neutrofile, komórki plazmatyczne, limfocyty T i B, komórki dendrytyczne) o cechach komórek zaktywowanych, co sugeruje bezpośredni udział pierwotnej oraz nabytej odpowiedzi immunologicznej w patogenezie RZS.

RZS jest chorobą progresywną i nieuleczalną, dlatego opracowanie skutecznych metod jej leczenia ma trudne do przecenienia znaczenie. Głównym celem terapii RZS jest zahamowanie procesu zapalnego prowadzące do zmniejszenia dolegliwości bólowych i obrzęków stawów oraz zapobieganie zmianom destrukcyjnym w obrębie stawów [6,73,74]. Do opanowania objawów choroby stosowane są głównie niesteroidowe leki przeciwzapalne (NSLPZ). W celu zahamowania procesu zapalno-immunologicznego u większości chorych, a zwłaszcza z tzw. „wczesnym RZS” zaleca się stosowanie leków modyfikujących przebieg choroby (LMPCh), do których należy m.in. metotreksat [6,73,74].

Od dziesięciu lat do leczenia szczególnie agresywnych i opornych na standardową terapię postaci RZS stosuje się terapie biologiczne polegające na neutralizacji cytokin (mediatorów odpowiedzi immunologicznej) prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) lub blokadzie aktywności komórek układu immunologicznego (limfocyty B), które odpowiedzialne są za propagację oraz utrzymanie chronicznego procesu zapalnego [6,73,74].

Niezwykle skuteczna metoda interwencji z wykorzystaniem leków biologicznych polega na selektywnym blokowaniu TNF- $\alpha$ , jednego z głównych mediatorów odpowiedzi prozapalnej, nadrzędnej cytokiny biorącej udział w wielu szlakach odpowiedzi immunologicznej, prowadzącej w sposób pośredni do destrukcji chrząstki oraz ubytku tkanki kostnej [23,48]. Terapia z wykorzystaniem inhibitorów TNF- $\alpha$  w skojarzeniu z LMPCh, głównie z metotreksatem (MTX), pozwala na niemal pełną kontrolę przebiegu choroby i stanowi niewątpliwie przełom w leczeniu RZS [24,27]. Niestety, stosowanie NLPZ, LMPCh oraz glikokortykosteroidów (GKS), może prowadzić do występowania licznych objawów niepożądanych [47,56]. Mimo nielicznych danych dotyczących poważnych działań niepożądanych leków biologicznych, to wciąż istnieją pewne ograniczenia oraz obawy w stosowaniu tego typu terapii [15,24,56]. Dlatego największym wyzwaniem dla immunologów, biologów molekularnych oraz lekarzy jest opracowanie takich metod leczenia, które będą się opierały na

interwencji immunologicznej polegającej na „przekierowaniu” reakcji immunologicznej chorych wobec danego antygen(ów) z reakcji prozapalnej na antyzapalną, bez jej supresji. Innymi słowy, ten typ immunoterapii ma za zadanie bezpiecznie doprowadzić do stanu tolerancji immunologicznej wobec tych antygenów, które przyczyniają się do rozwoju autoimmunizacyjnej reakcji immunologicznej charakterystycznej dla chorych na RZS. Obecnie prowadzone są zaawansowane badania kliniczne u tych chorych z wykorzystaniem lizatu bakteryjnego OM-89 [77] oraz peptydu dnajP1[37], których mechanizm działania zostanie opisany w dalszej części pracy.

Metoda immunoterapii swoistej jest od wielu lat stosowana u chorych z pewnymi postaciami alergii. O ile w wielu przypadkach alergii typu I za pomocą specyficznych testów skórnych można z dużą dokładnością zidentyfikować antygen, który jest bezpośrednią przyczyną reakcji alergicznej [28], to w przypadku chorób autoimmunizacyjnych sprawa się komplikuje. Niestety, do dziś nie udało się jednoznacznie określić antygen(ów), który byłby odpowiedzialny za rozwój RZS. Za podtrzymanie choroby, a nawet jej rozwój podejrzewane są liczne antygeny pochodzenia endogennego. Do najczęściej wymienianych należą: kolagen typu II, glikoproteina 39 z chondrocytów, proteoglikany oraz białka szoku termicznego – HSP (heat shock proteins) [17,29,36,90]. W literaturze światowej coraz częściej ukazują się doniesienia dotyczące udziału *Porphyrromonas gingivalis*, bakterii będącej częścią, lecz nie jedyną przyczyną parodontoz, w rozwoju RZS [49]. W surowicy krwi, a także w płynie maziowym chorych z RZS obserwuje się DNA *P. gingivalis* oraz przeciwciała swoście rozpoznające patogen [20]. Od wielu lat postuluje się, że autoprzeciwciałem zaangażowanym w patomechanizm RZS jest przeciwciałem antycytrulinowe, które stanowi również wartościowy marker w diagnostyce, zwłaszcza „wczesnego” RZS. Przeciwciała antycytrulinowe (ACPA) pojawiają się bardzo szybko u chorych na RZS (40–90% przypadków) i wykazują większą swoistość (około 98%) od czynnika reumatoidalnego (RF) [87]. U pacjentów ACPA-pozytywnych rozwój zmian radiologicznych następuje z dużo większym nasileniem niż jest to obserwowane u pacjentów ACPA-negatywnych. Pojawienie się autoprzeciwciał antycytrulinowych jest wynikiem nadmiernego procesu cytrulinacji (potranslacyjna modyfikacja) w zmienionym stanie zapalnym tkankach, który polega na deaminacji reszty argininy w wyniku działania enzymu deaminazy peptydyloargininowej (PAD). Cytrulinacja dotyczy białek, które są elementami tkanki stawów (np. fibryna, wimentyna, fibronektyna oraz kolagen typu II) [14]. Sądzi się, że zakażenie *P. gingivalis* może być jednym z czynników inicjujących reakcję autoimmunizacyjną u chorych z RZS. Okazało się bowiem, że jest to jedyna znana bakteria zdolna do przekształcenia argininy w cytrulinę dzięki obecności enzymu PAD [39]. Przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiej cytrulinowanej  $\alpha$ -enolazie reagują krzyżowo (molekularna mimikra) z cytrulinowaną  $\alpha$ -enolazą bakterii. Cytrulinacja białek przez *P. gingivalis* i w konsekwencji wytworzenie autoantygenów będących przyczyną rozwoju reakcji autoimmunizacyjnej u chorych na RZS może być elementem wspólnym łączącym oba schorzenia [10,49].

Oprócz teorii infekcyjnej, do najczęściej wymienianych przyczyn RZS należą: mechaniczne uszkodzenie stawów,

palenie tytoniu czy predyspozycja genetyczna związana z receptorami głównego kompleksu zgodności tkankowej – HLA (human leukocyte antigen) i dotycząca głównie alleli *HLA-DRB1* [3,4]; nie wyklucza się udziału również innych genów: *PTPN2*, *PADI4*, *CTLA4*, *TRAF1* (locus C5) oraz *STAT4* [40,43,45,69,75].

Rozwój RZS połączony jest z licznymi anomaliami (m.in. nadwrażliwością) odpowiedzi immunologicznej, zarówno pierwotnej jak komórkowej, związanej z autoreaktywnymi limfocytami T (zwłaszcza CD4<sup>+</sup>) i limfocytami B [14,21,26]. Liczne badania skupiają się obecnie m.in. na poznaniu funkcji oraz określeniu fenotypu autoreaktywnych (patogennych) limfocytów. Wśród limfocytów CD4<sup>+</sup> wyróżnia się przynajmniej cztery subpopulacje, które różnią się przede wszystkim profilem wydzielanych cytokin, rodzajem czynników regulacji transkrypcji pewnych genów i obecnością receptorów powierzchniowych. Populację limfocytów CD4<sup>+</sup> dzielimy na subpopulacje: Th1, Th2, Th17 oraz populację komórek regulatorowych Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) [13,57,72]. Populacja komórek Th17 (*RORγt/Stat3*), zidentyfikowana stosunkowo niedawno, której fizjologiczna funkcja polega na ochronie organizmu przed inwazją zewnątrzkomórkowych patogenów, jest ostatnio w kręgu zainteresowań naukowców w kontekście etiopatogenezy RZS. Podstawową cechą komórek Th17 jest wydzielanie cytokiny IL-17, która promuje wiele reakcji zapalnych objawiających się wzmożonym wydzielaniem cytokin prozapalnych oraz chemokin. Wraz z IL-17, cytokiny takie jak IL-1, IL-2, IL-6, TNF-α oraz IFN-γ zdolne są do aktywacji komórek występujących w okolicy stawów: osteoklastów, synowocytów oraz chondrocytów. Aktywacja tych komórek prowadzi do uwolnienia wielu enzymów proteolitycznych (głównie metaloproteinaz) przyczyniających się do degradacji chrząstki i formowania się łuszczyki reumatoidalnej [25,57].

Liczne doniesienia wskazują, iż HSP zdolne są do oddziaływania z układem immunologicznym wywołując reakcje charakterystyczne zarówno dla odpowiedzi pro-, jak również antyzapalnej [3,4,5,55,78]. Dualizm tej odpowiedzi wydaje się uzależniony od pochodzenia białek HSP (bakterie infekcyjne, komensale oraz HSP endogenne) [3,4,5,55,63,78,96] oraz miejsca ekspozycji (płyny ustrojowe – krew lub limfa, skóra lub błona śluzowa), a także rodzaju komponentów immunologicznych (komórki prezentujące antygen – APC lub limfocyty T), narażonych na działanie białek HSP [12,19,37,58,65,66,67]. Niektórzy autorzy uważają, że wiele wyników wskazujących na prozapalne działanie HSP mogło być związanych z obecnością prozapalnie działającego LPSu, obecnego w preparatach białek HSP produkowanych w komórkach bakteryjnych [58,61].

Większość opracowań naukowych ostatniej dekady dotyczących zarówno zwierzęcego modelu RZS (adjuvant arthritis) [65,80,95], jak i RZS u ludzi [18,52,55,64,78,86] sugeruje, iż HSP pełnią istotną funkcję naturalnych immunoregulatorów chronicznej reakcji zapalnej. Najwięcej informacji w kontekście immunoregulacji dotyczy roli białek szoku termicznego należących do klas HSP70 i HSP60. W ostatnich latach pojawiły się także prace dotyczące klasy HSP40, najliczniej reprezentowanej klasy białek HSP u człowieka (około 50 homologów). Z tego względu dalsze omówienie będzie dotyczyło klas HSP60, HSP70 oraz HSP40.

## OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK HSP

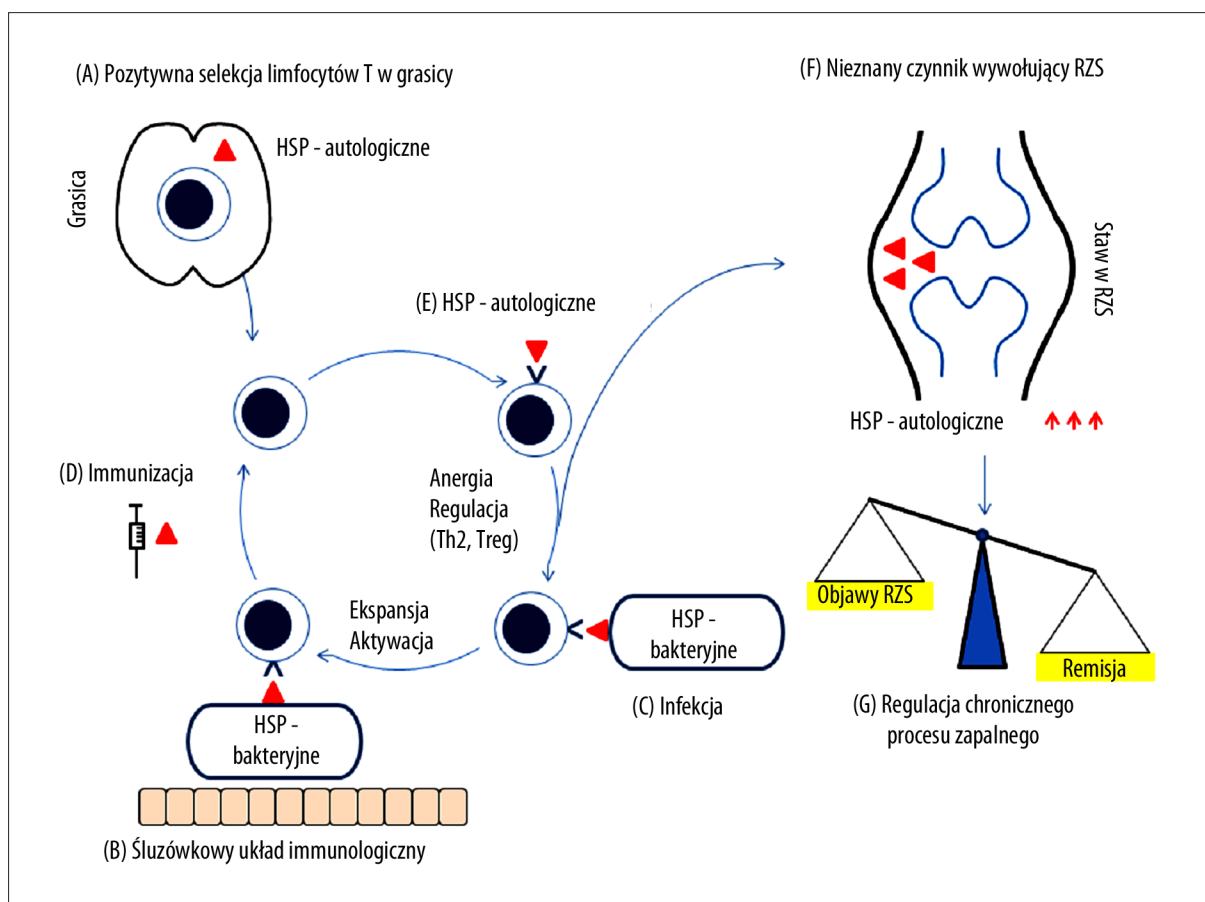
Białka szoku termicznego są wysoce zachowanymi w ewolucji białkami, których obecność stwierdzono we wszystkich dotychczas poznanych organizmach pro- oraz eukariotycznych. HSP są zlokalizowane w cytoplazmie oraz różnych strukturach wewnątrzkomórkowych (retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego, mitochondria, jądro), gdzie pełnią funkcję białek opiekuńczych (molecular chaperones) lub proteaz [35]. HSP stanowią wysoki odsetek (5–10%) białek komórkowych, a dodatkowo ich wewnątrzkomórkowe stężenie może kilkakrotnie wzrosnąć w wyniku stresów powodujących wytworzenie białek nieprawidłowo sfałdowanych lub zagregowanych. Takie czynniki stresowe, jak np.: szok termiczny, szok oksydacyjny, zakażenia wirusowe, NO, UV, etanol, jony metali ciężkich, czynniki prozapalne (TNF-α, IFN-γ) czy niesteroidowe leki przeciwzapalne (ibuprofen) powodują stymulację biosyntezy różnych HSP [84]. Ze względu na różnice w masie cząsteczkowej oraz różnice w strukturze pierwszorzędowej polipeptydów, białka HSP podzielono na przynajmniej sześć klas, do których należą: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 oraz małe białka szoku termicznego, sHSP (small heat shock proteins) [32,103].

Białka opiekuńcze uczestniczą w procesie prawidłowego zwijania nowo powstałych polipeptydów, modulowania konformacji białek oraz w przywracaniu konformacji zdenaturowanych białek. Nowo zsyntetyzowane polipeptydy oraz zdenaturowane białka, dzięki obecności ekspozowanych części hydrofobowych, skłonne są do interakcji z innymi cząsteczkami białkowymi, czego konsekwencją może być tworzenie się niefunkcjonalnych i toksycznych dla komórki agregatów. HSPs o aktywności opiekuńczej (np. HSP70, HSP60, HSP40) dzięki swojemu powinowactwu do regionów hydrofobowych w cząsteczce polipeptydu lub częściowo rozwiniętego białka, umożliwiają ich stabilizację oraz nabycie lub przywrócenie konformacji natywnej [99]. Pojawienie się nierozpuszczalnych agregatów białkowych w komórce, powstałych w wyniku niedoskonałości systemu opiekuńczego, angażuje białka opiekuńcze stymulujące hydrolizę białek oraz HSP o aktywności proteolitycznej (np. rodzina białek HtrA), które mają za zadanie usunięcie niefunkcjonalnych oraz toksycznych dla komórki agregatów [35,102]. Białka opiekuńcze uczestniczą także w transporcie białek w komórce, w sygnalizacji komórkowej i w regulacji genów. Wadliwe funkcjonowanie tych białek może prowadzić do ciężkich schorzeń, takich jak choroby nowotworowe czy neurodegeneracyjne, np. choroba Parkinsona czy Alzheimer [99].

## HSP – BIAŁKA SILNIE IMMUNOGENNE

Obecność białek HSP w przestrzeni pozakomórkowej, a także obecność uczulonych na HSP elementów układu immunologicznego oraz przeciwciał anti-HSP obserwuje się u chorych na RZS [4,54,78,79,100] i u ludzi zdrowych [63].

Przeważa pogląd, iż białka szoku termicznego należące do głównych klas są wewnątrzkomórkowymi składnikami, a ich obecność w środowisku zewnętrznym (międzykomórkowym) jest wynikiem uszkodzenia komórek lub tkanek, co może się stać niefizjologicznym czynnikiem zdolnym do aktywacji prozapalnych mechanizmów immunologicznych.



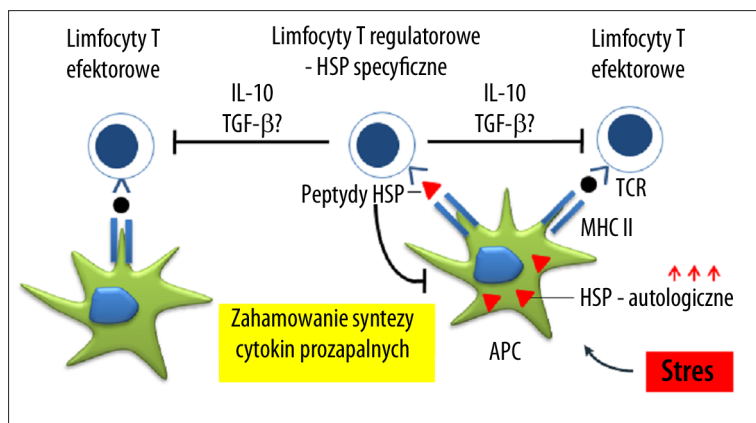
Ryc. 1. Mechanizm regulacji chronicznej reakcji zapalnej, w której pośredniczą białka HSP oraz limfocyty T; (A) Pozytywna selekcja w grasicy prowadzi do wytworzenia limfocytów T zdolnych do rozpoznania autologicznych białek HSP, (B) Silnie zachowane w ewolucji epitopy (wspólne dla HSP bakterii i HSP człowieka) pochodzące z HSP bakterii komensalnych, (C) infekcyjnych oraz (D) HSP wprowadzonych do organizmu (D) HSP wprowadzonych do organizmu immunizacji aktywują uprzednio wytworzone w trakcie selekcji pozytywnej limfocyty T uczulone na HSP, (E) ekspresja na stałym oraz niskim poziomie autologicznych białek HSP przez nieprofesjonalne komórki prezentujące antygen, wprowadza limfocyty T-HSP uczulone w stan anergii lub nadaje im regulatorowy charakter. Tak wytworzone oraz podtrzymywane limfocyty T-HSP uczulone o cechach komórek regulatorowych mogą rozpoznawać HSP nadmiernie wytwarzane w tkankach zmienionych procesem zapalnym u chorych na RZS (F), przyczyniając się do regulacji chronicznego procesu zapalnego w stawach (G) (na podstawie [83,84,85] zmodyfikowano)

Jednocześnie istnieje wiele prac wykazujących, że białka HSP mogą być w sposób aktywny wydzielane z komórki [19]. Niewyjaśniony pozostaje mechanizm dotyczący aktywnej sekrecji białek HSP, gdyż żadne z klasycznych HSP nie ma sekwencji sygnałowej charakterystycznej dla białek wydzielanych z komórki *via* retikulum endoplazmatyczne i aparat Golgiego. Dlatego uważa się, że sekrecja HSP odbywa się drogą alternatywną lub tzw. niekonwencjonalną. Jednym z zaproponowanych mechanizmów sekrecji białek HSP jest udział systemu lizosomalno-endosomowego, przy czym transport HSP70 do lizosomów odbywa się prawdopodobnie z udziałem transportujących białek ABC zawierających kasetę wiążącą ATP (ATP binding cassette) [53,60]. Sugeruje się również, że HSP (HSP70) w wyniku stresu ulegają translokacji do błony komórkowej i w postaci błonowych pęcherzyków transportujących są uwalniane na zewnątrz komórki [88].

Wiadomo, że poziom autologicznych białek systemu HSP40, HSP60 oraz HSP70 ulega wzmożonej ekspresji w tkankach zmienionych procesem zapalnym u pacjentów chorych na RZS [41,44,71]. Rola HSP w tkankach objętych procesem zapalnym pozostaje nadal nie do końca

wyjaśniona. W przeszłości istniał pogląd, że HSP pochodzenia bakteryjnego są silnie immunogennymi białkami, które są zdolne do aktywacji prozapalnych mechanizmów immunologicznych. Dalej, ze względu na strukturalne podobieństwo między bakteryjnymi białkami HSP a HSP autologicznymi, układ immunologiczny gospodarza mógłby w wyniku „molekularnej mimikry” kierować swoją „agresję” w kierunku autologicznych HSP [2,3,4]. Najnowsze badania coraz częściej potwierdzają hipotezę o udziale autologicznych HSP w regulacji (wygaszaniu) chronicznego stadium stanu zapalnego. Sugeruje się, że regulacja procesu zapalnego odbywa się dzięki zdolności interakcji HSP z komponentami układu immunologicznego, do których zaliczamy m.in. komórki prezentujące antygen APC (antigen presenting cells) (komórki dendrytyczne, limfocyty B i makrofagi/monocyty) oraz limfocyty T CD4<sup>+</sup> biorące udział w odbiorze sygnału z APC [9,41].

Zaproponowano model współdziałania białek HSP z limfocytami T oraz proces wydarzeń odpowiedzi immunologicznej – komórkowej, który prowadzi do powstania uczulonych na HSP limfocytów T regulatorowych CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, zdolnych do regulacji prozapalnej reakcji immunologicznej,



Ryc. 2. Mechanizm regulacji odpowiedzi immunologicznej, w której zaangażowane są swoiste limfocyty T regulatorowe (Treg) uczulone na HSP. Treg rozpoznające autologiczne HSP mogą regulować odpowiedź immunologiczną w reakcji (i) bezpośredniej, w której zaangażowana jest IL-10 i prawdopodobnie TGF- $\beta$  lub (ii) w reakcji pośredniej, polegającej na modulacji komórek prezentujących antygen (APC) (na podstawie [83], zmodyfikowano)

w której pośredniczy między innymi antyzapalna interleukina 10 (IL-10) [82,84,96] (ryc. 1). Model ten częściowo opiera się na znanym mechanizmie „molekularnej mimi-kry”, zjawiska związanego z występowaniem podobieństw między molekułami pochodzenia egzo- oraz endogennego. W modelu wykorzystano także informacje dotyczące śluzówkowego układu immunologicznego, zlokalizowanego m.in. w błonie śluzowej ścian jelita – GALT (gut associated lymphoid tissue). Układ ten, w odpowiedzi na antygen polaryzowany jest często w kierunku aktywacji mechanizmów regulatorowych związanych z populacją komórek Th2 oraz limfocytów T regulatorowych indukowanych antygenem (Ag-Treg) [37,67,84,85].

Konsekwencją tego jest wytworzenie immunotolerancji przeciwko składnikom treści jelitowej, a także przeciwko bakteriom komensalnym, będącym naturalnym oraz niezbędnym elementem obronnym naszego organizmu. Objawia się to m.in. wytworzeniem działających lokalnie oraz obwodowo komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> zdolnych do wydzielania antyzapalnych cytokin IL-10 oraz TGF- $\beta$  i hamowania prozapalnej odpowiedzi immunologicznej [37,67,84] (ryc. 2).

Model (ryc. 1) oparto także na hipotezie, że w związku ze stałym wytwarzaniem białek HSP przez komórki naszego organizmu, w sposób ciągły dochodzi do prezentacji limfocytom T epitopów własnych HSP. Taka prezentacja odbywa się w dużej mierze przez komórki prezentujące (APC), tzw. nieprofesjonalne. Komórki APC nieprofesjonalne niemające receptora CD28, nie są zdolne do aktywacji naiwnych komórek T, lecz jedynie komórek pamięci immunologicznej. Dodatkowo, brak kostymulatora CD28 w aktywacji komórek T w zasadzie wprowadza je w stan anergii. Limfocyty T będące w stanie anergii nie są zdolne do proliferacji w odpowiedzi na antygen, lecz wykazują właściwości regulatorowe (Treg) [16,30]. Dlatego lokalna nadekspresja białek HSP (błona maziowa stawów u chorych na RZS) może stanowić sygnał dla układu immunologicznego, przyczyniający się do aktywacji mechanizmów regulatorowych zapobiegających chronicznemu stanowi zapalnemu. Aktywacja komórek regulatorowych przez HSP może się również odbywać poprzez aktywną immunizację, tzn. podanie antygenów pochodzących z HSP chorym na RZS (ryc. 1) [37,67,84]. Niezwykle obiecujące badania z wykorzystaniem zwierzęcego modelu RZS wskazują na jednoznaczłą poprawę kondycji chorych zwierząt immunizowanych białkami HSP, zarówno HSP60, jak i HSP70 *M. tuberculosis* [84,95].

## BIĄŁKA HSP60, HSP70 ORAZ HSP40 W ROZWOJU RZS: SPRZYMIERZENCY CZY WROGOWIE?

### HSP60

Pierwsze doniesienie dotyczące roli białek HSP60 jako egzogennych komponentów zdolnych do aktywacji odpowiedzi immunologicznej ukazało się w latach 80 ub.w. [76]. Modelem badawczym wykorzystanym podczas owych doświadczeń były szczury z chorobą reumatyczną indukowaną przez iniekcję termicznie inaktywowanych prątków gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis*. Model ten (adjuwant – induced arthritis) jest do dziś szeroko wykorzystywany do badań nad fizjopatologią RZS. Wykazano, że komórki T (10–20% całej populacji) wyizolowane od chorego szczura rozpoznawały białko o masie około 60 kDa, które zidentyfikowano jako białko szoku termicznego HSP60 (GroEL) *M. tuberculosis* [34].

Uważa się, że reakcja na HSP60 dotyczy zarówno pierwotnej, jak i nabytej odpowiedzi immunologicznej. Oddziaływanie białek HSP60 (w tym bakteryjnego białka GroEL) na komórki wskazuje, iż są zdolne do rozpoznawania swoistych receptorów. Zaobserwowano, że receptor powierzchniowy CD14 znajdujący się na jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i na monocytach jest rozpoznawany przez białka HSP60 w hodowli *in vitro*. Interakcja białka HSP60 dotyczy również receptorów sygnałowych TLR2, TLR4 (Toll-like receptor) oraz CD40 [8,11,31,38]. Wykazano także, że podczas stresu komórkowego białka HSP60 są prezentowane komórkom CD8<sup>+</sup> oraz komórkom CD4<sup>+</sup> w połączeniu odpowiednio z receptorami MHC klasy I i MHC II [101].

U ludzi zdrowych, którzy nie byli ekspozycyjni na zakażenia *M. tuberculosis* również obserwuje się przeciwciała oraz limfocyty T, swoiste wobec HSP60. Okazało się, że epitopy białka HSP60 rozpoznawane przez układ immunologiczny ludzi zdrowych należą do najsilniej zachowanych w ewolucji [59]. Przypuszcza się, że odpowiedź immunologiczna anty-HSP60 może wynikać z infekcji bakteryjnych, które w przeszłości przechodzili ludzie badani lub w wyniku kontaktu układu immunologicznego z bakteriami komensalnymi egzystującymi w jelicie. Ze względu na silnie zachowaną w ewolucji strukturę HSP, za każdym razem kiedy dochodzi do infekcji bakteryjnej, układ immunologiczny gospodarza mógłby skierować swoją odpowiedź, dzięki obecności komórek pamięci immunologicznej

CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>RA-RO<sup>+</sup> uczulonych na HSP, w kierunku immunodominującego antygeny, jakim są białka z rodziny HSP60 [68].

W badaniach na zdrowych szczurach dokonano niezwykle interesującego odkrycia wykazując, że ich immunizacja zrekombinowanym białkiem HSP60 uniemożliwiała indukcję choroby reumatycznej [83]. Badania poświęcone charakterystyce limfocytów T, wyizolowanych od szczurów uprzednio immunizowanych białkiem HSP60 (GroEL *M. tuberculosis*), wskazują na ochronną rolę populacji komórek T uczulonych na HSP60. Limfocyty T o właściwościach regulacyjnych rozpoznawały głównie epitopy silnie zachowanej w ewolucji domeny białka HSP60. Przeniesienie takich limfocytów na inne osobniki wywoływało u nich odporność na indukowaną chorobę reumatyczną. Zdolne do indukcji odporności były tylko te limfocyty T uczulone na HSP60, które reagowały krzyżowo z GroEL (HSP60) *M. tuberculosis* oraz HSP60 endogennym szczura [62]. Immunizacja szczura (donosowo) białkiem HSP60 *M. tuberculosis* indukowała limfocyty T do wydzielania IL-10, natomiast wzrost stężenia IL-10 kojarzony był z remisją choroby [66].

W zwierzęcych modelach badawczych, a także u ludzi chorych na RZS i młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów – JIA (juvenile idiopathic arthritis) odnotowano istotnie podniesiony poziom przeciwciał anti-HSP60, zarówno w płynie maziowym zmienionych procesem zapalnym stawów, jak i w surowicy krwi [81,100]. Sugeruje się, że odpowiedź humoralna skierowana przeciwko białkom HSP może być jednym z mechanizmów uczestniczących w rozwoju oraz podtrzymania choroby [4,100]. Natomiast obecność przeciwciał anti-HSP65 *M. tuberculosis* w surowicy krwi szczura uniemożliwiała indukcję choroby przez podanie adiuwantu [80], a w hodowli PBMC (peripheral blood mononuclear cells) człowieka oraz szczura obecność przeciwciał anti-HSP65 indukowała komórki jedonajdrzaste do sekrecji antyzapalnej cytokiny IL-10 [80].

Wskazuje się, że wykorzystanie autologicznych HSP60 lub wybranych epitopów pochodzących z HSP60 stanowi obiecującą immunoterapię w hamowaniu chronicznego stanu zapalnego u ludzi chorych na RZS; nie wyklucza się również ich wykorzystania u chorych na cukrzycę typu 1 [33,65,66].

## HSP70

Białka systemu HSP70 są zdolne do aktywacji komórek układu immunologicznego, takich jak: makrofagi, monocyty, komórki dendrytyczne, NK (natural killer) oraz limfocyty T. Aktywacja komórek może się odbywać dzięki bezpośredniej interakcji białek HSP70 z powierzchniowymi receptorami TLR2, TLR4, CD14, CD40 oraz CD91 [19]. Podobnie jak w przypadku HSP60, białka HSP70 (prezentowane przez białka MHC) mogą być także rozpoznawane przez receptory TCR limfocytów T CD8 oraz CD4 [22].

W zwierzęcym modelu RZS oraz u chorych na RZS obserwuje się zwiększone stężenie przeciwciał anti-HSP70 w surowicy krwi i w płynie maziowym stawów objętych procesem zapalnym [50]. Wiele badań sugeruje udział autologicznych białek HSP70 w supresji procesu zapalnego. Luo i wsp. [51] zaobserwowali, że obecność HSP70

w hodowli synowocytów prowadzi do obniżenia wydzielanych cytokin IL-6, IL-8 oraz MCP-1, kojarzonych z rozwojem choroby. Regulacja wydzielania tych cytokin związana była z hamującym wpływem HSP70 na translokację czynnika transkrypcyjnego NF-κB (nuclear factor κB), odpowiedzialnego m.in. za regulację wydzielania prozapalnych mediatorów odpowiedzi immunologicznej. W traktowanej przez TNF-α hodowli komórek synowocytarnych dochodziło do wzrostu wydzielania HSP70, które dalej autokrynnie i parakrynnie stymulowały komórki do wydzielania antyzapalnej IL-10. Inni autorzy wykazali, że donosowa immunizacja zachowanym w ewolucji fragmentem białka HSP70 *M. tuberculosis* chroniła przed rozwojem choroby reumatycznej w modelu zwierzęcym; w proces ten zaangażowane były limfocyty T oraz IL-10 [93,95]. Podobnie jak w przypadku HSP60, białka HSP70 wykazują więc właściwości regulatorowe, które w przyszłości mogą być wykorzystane w immunoterapii.

## HSP40

W połowie lat 90 ub.w. zaproponowano teorię „mimikry molekularnej”, w której autorzy sugerowali udział bakteryjnego białka DnaJ (HSP40) w patogenezie RZS. Teoria ta jest ściśle powiązana z występowaniem określonych alleli MHC II (HLA-DR4), kodujących sekwencję QKRAA w hiperzmiennym łańcuchu β1, które predysponują ludzi do rozwoju RZS [2]. Podczas rozwoju układu immunologicznego „edukacja” limfocytów T odbywa się w grasicy poprzez interakcje tymocytów z peptydami własnymi. Te limfocyty, które mają małe powinowactwo do własnych peptydów ulegają pozytywnej selekcji i zdolne są do rozpoznawania antygenów obcych, przypominających, lecz nieidentycznych z antygenami własnymi. Wiadomo, że peptydami własnymi uczestniczącymi w selekcji pozytywnej często są peptydy receptorów MHC II. Teoria mimikry molekularnej zaproponowana przez Albaniego i Carsona [2] zakładała, że obecna w określonych białkach MHC II sekwencja QKRAA może odgrywać istotną rolę w „edukacji” limfocytów T i przypuszcza się, że ma to związek z rozwojem RZS u ludzi. Limfocyty rozpoznające epitopy zawierające sekwencję QKRAA, które przeszły pozytywną selekcję, mogłyby rozpoznawać antygen bakteryjny DnaJ (Hsp40) zawierający sekwencję QKRAA w konserwowanej ewolucyjnie domenie N-terminalnej. Następnie zaktywowane przez DnaJ limfocyty, ze względu na podobieństwo strukturalne („molekularna mimikra”), mogłyby rozpoznawać epitopy ludzkich HSP40, homologów białka DnaJ, które na skutek uszkodzeń stawów oraz chronicznego stanu zapalnego ulegają wzmożonej ekspresji [2,3,4].

Wyniki zespołu Albaniego [4] wykazały, że przeciwciała anti-DnaJ obecne w surowicy chorych na RZS reagowały z DnaJ z podobną wydajnością, jak u osób zdrowych. Jednak zaobserwowano także, że syntetyczny peptyd 15-aminokwasowy (dnaJp1), homologiczny z częścią N-terminalną bakteryjnego białka DnaJ i zawierający sekwencję „wspólnego epitopu” (QKRAA), hamował z trzykrotnie większą wydajnością reakcję surowicy osób chorych na RZS z białkiem DnaJ w porównaniu z reakcją surowicy osób zdrowych. Wyniki te sugerują, że cała populacja ludzi jest ekspozycja na immunogenne działanie białka DnaJ, ale u chorych z RZS, w porównaniu z ludźmi zdrowymi, układ immunologiczny wytwarza przeciwciała

skierowane wobec innych epitopów białka DnaJ. Stężenie przeciwciał skierowanych przeciwko peptydowi dnajP1 u pacjentów z RZS było znacznie podwyższone w porównaniu do ludzi zdrowych. Z naszych obserwacji [42,78,79] wynika, że stężenie przeciwciał anti-DnaJ (*E. coli*) jest również istotnie podniesione u chorych na RZS w porównaniu z osobami zdrowymi, natomiast odpowiedź ta dotyczy głównie silnie zachowanej w ewolucji N-terminalnej domeny białka DnaJ.

Z badań Albaniego i wsp. [4] wynika, że tylko limfocyty T pochodzące od pacjentów z RZS proliferowały w odpowiedzi na peptyd dnajP1 oraz białko DnaJ, podczas gdy limfocyty T z grupy kontrolnej nie ulegały takiej stymulacji. Nasze z kolei obserwacje [78] wykazały, że obecność bakterijskiego białka DnaJ oraz trzech ludzkich HSP40 (Hdj1, Hdj2 i Hdj3) w sposób istotny hamuje proliferację limfocytów T (CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>) w hodowli komórek jednojądrzastych pacjentów chorych na RZS w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Jednocześnie obserwowano inhibicję wydzielania TNF- $\alpha$  oraz stymulację wydzielania IL-10 przez komórki jednojądrzaste.

Niedawno opublikowane badania wykazały, że hodowla komórek jednojądrzastych wyizolowanych z płynu maziowego (SFMcs – synovial fluid mononuclear cells) cierpiących na młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, JIA, w obecności peptydów homologicznych do N-terminalnej części białka DnaJ *E. coli* aktywowała mechanizmy prozapalne, objawiające się wzmożonym wytwarzaniem IFN- $\gamma$ . Co niezwykle istotne, peptydy pochodzące z ludzkich HSP40 indukowały wydzielanie głównej cytokiny antyzapalnej – IL-10. Zaobserwowano też pozytywną korelację między JIA o dobrym prognozowaniu a reakcją limfocytów T z peptydami pochodzącymi z HSP40 człowieka [55]. Powyższe obserwacje oraz wyniki uzyskane przez nasz zespół badawczy zgodne są co do tego, że ludzkie białka HSP40 (podobnie jak HSP60 oraz HSP70) mogą działać antyzapalnie i być celem w terapii JIA i RZS [55,78].

#### IMMUNOTERAPIA CHORYCH NA RZS Z ZASTOSOWANIEM HSP

Doustna immunoterapia antygenowa może wywołać wiele korzystnych zmian, do których zaliczamy:

- indukcję limfocytów T regulatorowych (Treg),
- delecję komórek autoreaktywnych oraz
- wywołanie tolerancji immunologicznej wobec tych antygenów, które biorą udział w rozwoju choroby [1].

Od kilku lat prowadzone są badania mające na celu opracowanie bezpiecznej immunoterapii z wykorzystaniem (pośrednio lub bezpośrednio) właściwości białek HSP. Terapia dotyczy dwóch substancji podawanych doustnie chorym na RZS, tj. OM-89 (lizat bakteryjny z *E. coli*)

oraz peptydu dnajP1 zawierającego sekwencję „wspólne-go epitopu” – QKRAA.

Doustnie podawany lek (OM-89), składający się z wyselekcjonowanych szczepów *E. coli*, istotnie wpływał na poprawę kondycji chorych na RZS, przyczyniając się do częściowej remisji choroby [70,89]. Toussiro i wsp. [77] odnotowali istotnie zwiększone wydzielanie IL-10 przez komórki PBMC pacjentów traktowanych OM-89. Najistotniejszą funkcję w antyreumatycznym działaniu OM-89 przypisuje się silnie immunogennym białkom HSP60 oraz HSP70 [7,12]. Z kolei doustne podanie szczurom ekstraktu OM-89 chroniło zwierzęta przed indukcją reumatyzmu (adjuwant arthritis) [92]. Zaobserwowano ponadto wzrost wydzielania antyzapalnych cytokin TGF- $\beta$  oraz IL-10 i IL-4 związanych z populacją Th2 oraz Ag-Treg w odpowiedzi na HSP60 oraz HSP70 szczura w hodowli komórkowej [91,93].

Doustne podawanie przez 6 miesięcy peptydu dnajP1 (25 mg/dziennie) pacjentom z aktywną postacią choroby objawiało się istotnie obniżonym odsetkiem komórek T wydzielających TNF- $\alpha$ , IL-2 oraz IFN- $\gamma$ , a zarazem skojarzone było ze wzrostem odsetka komórek T wydzielających regulatorową IL-10 oraz wzrostem regulatora transkrypcji FoxP3 w komórkach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [37,67]. Według autorów immunoterapia z wykorzystaniem dnajP1 jest bezpieczna i istotnie wpływa na poprawę parametrów chorych na RZS [37].

Uzupełniającą metodą, mającą na celu wyciszenie prozapalnej odpowiedzi immunologicznej u pacjentów chorych na RZS, może się okazać stymulacja ekspresji endogennych białek HSP70 dzięki zastosowaniu odpowiedniej diety. W modelu zwierzęcym zaobserwowano, że carvacrol (fenol) – główny składnik olejków z oregano lub tymianku, jest substancją stymulującą syntezę wewnątrzkomórkowego białka HSP70 [97,98]. Następstwem tej „terapii” była wyraźna stymulacja limfocytów T-HSP70 swoistych. Dodatkowo podawanie carvacrolu szczurom z chorobą reumatyczną powoduje wzrost liczby limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> w śledzionie oraz w stawach, przyczyniając się do niemal całkowitej remisji choroby [97,98].

#### PODSUMOWANIE

Terapia z wykorzystaniem białek szoku termicznego jest obiecującą immunointerwencją, która w sposób istotny, bezpieczny oraz względnie tani, może się przyczynić do poprawy kondycji oraz częściowej remisji choroby u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Wskazują na to wyniki badań z wykorzystaniem zwierzęcego modelu RZS oraz badań znajdujących się w stadium klinicznym. Przeciwwzpalne działanie HSP zgodne jest ze znaną od wielu lat funkcją komórkową tych białek, polegającą na usuwaniu i łagodzeniu skutków różnego rodzaju stresów.

#### PIŚMIENNICTWO

- [1] Adorini L.: Antigen-based immunointervention in human autoimmune diseases. *Trends Biotechnol.*, 2004; 22: 547–549
- [2] Albani S., Carson D.A.: A multistep molecular mimicry hypothesis for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunol. Today*, 1996; 17: 466–470
- [3] Albani S., Carson D.A., Roudier J.: Genetic and environmental factors in the immune pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 1992; 18: 729–740

- [4] Albani S., Keystone E.C., Nelson J.L., Ollier W.E., La Cava A., Montemayor A.C., Weber D.A., Montecucco C., Martini A., Carson D.A.: Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nat. Med.*, 1995; 1: 448–452

- [5] Albani S., Ravelli A., Massa M., De Benedetti F., Andree G., Roudier J., Martini A., Carson D.A.: Immune responses to the *Escherichia coli* dnaJ heat shock protein in juvenile rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity. *J. Pediatr.*, 1994; 124: 561–565
- [6] Aletaha D., Neogi T., Silman A.J., Funovits J., Felson D.T., Bingham C.O. III, Birnbaum N.S., Burmester G.R., Bykerk V.P., Cohen M.D., Combe B., Costenbader K.H., Dougados M., Emery P., Ferraccioli G., Hazes J.M., Hobbs K., Huizinga T.W., Kavanaugh A., Kay J., Kvien T.K., Laing T., Mease P., Ménard H.A., Moreland L.W., Naden R.L., Pincus T., Smolen J.S., Stanislaswska-Biernat E., Symmons D., Tak P.P., Upchurch K.S., Vencovsky J., Wolfe F., Hawker G.: 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010; 69: 1580–1588
- [7] Arend W.P.: The innate immune system in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2001; 44: 2224–2234
- [8] Asea A., Kraeft S.K., Kurt-Jones E.A., Stevenson M.A., Chen L.B., Finberg R.W., Koo G.C., Calderwood S.K.: HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.*, 2000; 6: 435–442
- [9] Bethke K., Staib F., Distler M., Schmitt U., Jonuleit H., Enk A.H., Galle P.R., Heike M.: Different efficiency of heat shock proteins (HSP) to activate human monocytes and dendritic cells: superiority of HSP60. *J. Immunol.*, 2002; 169: 6141–6148
- [10] Biernacka E., Zabek J.: Przeciwciała dla cytrulinowanych białek – nowe kierunki badań. *Reumatologia*, 2010; 48: 262–270
- [11] Binder R.J., Han D.K., Srivastava P.K.: CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat. Immunol.*, 2000; 1: 151–155
- [12] Bloemendal A., Van der Zee R., Rutten V.P., van Kooten P.J., Farine J.C., van Eden W.: Experimental immunization with anti-rheumatic bacterial extract OM-89 induces T cell responses to heat shock protein (hsp)60 and hsp70; modulation of peripheral immunological tolerance as its possible mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.*, 1997; 110: 72–78
- [13] Bryl E., Daca A., Józwick A., Witkowski J.M.: Human CD4low CD25high regulatory T cells indiscriminately kill autologous activated T cells. *Immunology*, 2009; 128(Suppl.1): e287–e295
- [14] Bugatti S., Codullo V., Caporali R., Montecucco C.: B cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.*, 2007; 7: 137–142
- [15] Carmona L., Abasolo L., Descalzo M.A., Pérez-Zafra B., Sellas A., de Abajo F., Gomez-Reino J.J., BIOBADASER Study Group; EMECAR Study Group: Cancer in patients with rheumatic diseases exposed to TNF antagonists. *Semin. Arthritis Rheum.*, 2010 (w druku)
- [16] Chen J., Xie L., Toyama S., Hünig T., Takahara S., Li X.K., Zhong L.: The effects of Foxp3-expressing regulatory T cells expanded with CD28 superagonist antibody in DSS-induced mice colitis. *Int. Immunopharmacol.*, 2011; 11: 610–617
- [17] Corrigan V.M., Panayi G.S.: Autoantigens and immune pathways in rheumatoid arthritis. *Crit. Rev. Immunol.*, 2002; 22: 281–293
- [18] de Kleer I.M., Wedderburn L.R., Taams L.S., Patel A., Varsani H., Klein M., de Jager W., Pugayung G., Giannoni F., Rijkers G., Albani S., Kuis W., Prakken B.: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J. Immunol.*, 2004; 172: 6435–6443
- [19] De Maio A.: Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones*, 2011; 16: 235–249
- [20] Detert J., Pischon N., Burmester G.R., Buttgerit F.: The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis Res. Ther.*, 2010; 12: 218
- [21] Falgarone G., Jaen O., Boissier M.C.: Role for innate immunity in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 2005; 72: 17–25
- [22] Faure O., Graff-Dubois S., Bretaudeau L., Derré L., Gross D.A., Alves P.M., Cornet S., Duffour M.T., Chouaib S., Miconnet I., Grégoire M., Jotereau F., Lemonnier F.A., Abastado J.P., Kosmatopoulos K.: Inducible Hsp70 as target of anticancer immunotherapy: identification of HLA-A\*0201-restricted epitopes. *Int. J. Cancer*, 2004; 108: 863–870
- [23] Feldmann M., Maini R.N.: The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 1999; 38(Suppl.2): 3–7
- [24] Filipowicz-Sosnowska A., Kwiatkowska B.: Skuteczność i bezpieczeństwo inhibitorów TNF – wyniki długotrwałych badań obserwacyjnych. *Reumatologia*, 2007; 45: 32–39
- [25] Firestein G.S.: Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 2003; 423: 356–361
- [26] Fournier C.: Where do T cells stand in rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine*, 2005; 72: 527–532
- [27] Furst D.E., Breedveld F.C., Kalden J.R., Smolen J.S., Burmester G.R., Sieper J., Emery P., Keystone E.C., Schiff M.H., Mease P., van Riel P.L., Fleischmann R., Weisman M.H., Weinblatt M.E.: Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases, 2007. *Ann. Rheum. Dis.*, 2007; 66(Suppl.3): iii2–iii22
- [28] Grad A., Jung A., Stankiewicz W., Dąbrowski M.P., Kalicki B., Bartoszewicz L., Fal A.M.: Ocena wybranych parametrów immunologicznych podczas immunoterapii swoistej podskórnej i podjęzykowej. *Alergologia*, 2009; 1: 22–29
- [29] Guerassimov A., Zhang Y., Cartman A., Rosenberg L.C., Esdaile J., Fitzcharles M.A., Poole A.R.: Immune responses to cartilage link protein and the G1 domain of proteoglycan aggrecan in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 1999; 42: 527–533
- [30] Harding F.A., McArthur J.G., Gross J.A., Raulo D.H., Allison J.P.: CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*, 1992; 356: 607–609
- [31] Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda K., Akira S.: Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.*, 1999; 162: 3749–3752
- [32] Houry W.A.: Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2001; 2: 227–244
- [33] Huurman V.A., Decochez K., Mathieu C., Cohen I.R., Roep B.O.: Therapy with the hsp60 peptide DiaPep277 in C-peptide positive type 1 diabetes patients. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2007; 23: 269–275
- [34] Kaufmann S.H., Vähä U., Thole J.E., Van Embden J.D., Emmrich F.: Enumeration of T cells reactive with Mycobacterium tuberculosis organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein. *Eur. J. Immunol.*, 1987; 17: 351–357
- [35] Kaźmierczuk A., Kiliańska Z.M.: The pleiotropic activity of heat-shock proteins. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 502–521
- [36] Kim H.Y., Kim W.U., Cho M.L., Lee S.K., Youn J., Kim S.I., Yoo W.H., Park J.H., Min J.K., Lee S.H., Park S.H., Cho C.S.: Enhanced T cell proliferative response to type II collagen and synthetic peptide CII (255–274) in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1999; 42: 2085–2093
- [37] Koffeman E.C., Genovese M., Amox D., Keogh E., Santana E., Matteson E.L., Kavanaugh A., Molitor J.A., Schiff M.H., Posever J.O., Bathon J.M., Kivitz A.J., Samodal R., Belardi F., Dennehy C., van den Broek T., van Wijk F., Zhang X., Zieseniss P., Le T., Prakken B.A., Cutter G.C., Albani S.: Epitope-specific immunotherapy of rheumatoid arthritis: clinical responsiveness occurs with immune deviation and relies on the expression of a cluster of molecules associated with T cell tolerance in a double-blind, placebo-controlled, pilot phase II trial. *Arthritis Rheum.*, 2009; 60: 3207–3216
- [38] Kol A., Lichtman A.H., Finberg R.W., Libby P., Kurt-Jones E.A.: Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J. Immunol.*, 2000; 164: 13–17
- [39] Kontny E.: Patogeneza reumatoidalnego zapalenia stawów. Część I – odpowiedź nabyta, uwarunkowania genetyczne i środowiskowe. *Reumatologia*, 2011; 49: 115–121
- [40] Kremer J.M., Westhovens R., Leon M., Di Giorgio E., Alten R., Steinfield S., Russell A., Dougados M., Emery P., Nuamah I.F., Williams G.R., Becker J.C., Hagerty D.T., Moreland L.W.: Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N. Engl. J. Med.*, 2003; 349: 1907–1915
- [41] Krenn V., Vollmers H.P., von Landenberg P., Schmausser B., Rupp M., Roggenkamp A., Müller-Hermelink H.K.: Immortalized B-lymphocytes from rheumatoid synovial tissue show specificity for bacterial HSP 60. *Virchows Arch.*, 1996; 427: 511–518
- [42] Krzewski K., Kunikowska D., Wysocki J., Kotlarz A., Thompkins P., Ashraf W., Lindsey N., Pickles J., Głównicka R., Lipińska B.: Characterization of the anti-DnaJ monoclonal antibodies and their use to compare immunological properties of DnaJ and its human homologue HDJ-1. *Cell Stress Chaperones*, 2003; 8: 8–17
- [43] Kurreeman F.A., Padyukov L., Marques R.B., Schrodri S.J., Seddighzadeh M., Stoeken-Rijsbergen G., van der Helm-van Mil A.H., Allaart C.F., Verduyn W., Houwing-Duistermaat J., Alfredsson L., Begovich A.B., Klareskog L., Huizinga T.W., Toes R.E.: A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med.*, 2007; 4: e278



- [44] Kurzik-Dumke U., Schick C., Rzepka R., Melchers I.: Overexpression of human homologs of the bacterial DnaJ chaperone in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1999; 42: 210–220
- [45] Lee A.T., Li W., Liew A., Bombardier C., Weisman M., Massarotti E.M., Kent J., Wolfe F., Begovich A.B., Gregersen P.K.: The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status. *Genes Immun.*, 2005; 6: 129–133
- [46] Lee D.M., Weinblatt M.E.: Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2001; 358: 903–911
- [47] Leszczyński P., Lacki J.K., Mackiewicz S.H.: Glucocorticosteroid induced osteoporosis in patients with rheumatoid arthritis. *Przegl. Lek.*, 2000; 57: 108–110
- [48] Lin J., Ziring D., Desai S., Kim S., Wong M., Korin Y., Braun J., Reed E., Gjertson D., Singh R.R.: TNF $\alpha$  blockade in human diseases: an overview of efficacy and safety. *Clin. Immunol.*, 2008; 126: 13–30
- [49] Lundberg K., Wegner N., Yucel-Lindberg T., Venables P.J.: Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2010; 6: 727–730
- [50] Luo X., Zuo X., Zhang B., Song L., Wei X., Zhou Y., Xiao X.: Release of heat shock protein 70 and the effects of extracellular heat shock protein 70 on the production of IL-10 in fibroblast-like synoviocytes. *Cell Stress Chaperones*, 2008; 13: 365–373
- [51] Luo X., Zuo X., Zhou Y., Zhang B., Shi Y., Liu M., Wang K., McMillan D.R., Xiao X.: Extracellular heat shock protein 70 inhibits tumour necrosis factor- $\alpha$  induced proinflammatory mediator production in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res. Ther.*, 2008; 10: R41
- [52] Macht L.M., Elson C.J., Kirwan J.R., Gaston J.S., Lamont A.G., Thompson J.M., Thompson S.J.: Relationship between disease severity and responses by blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis to human heat-shock protein 60. *Immunology*, 2000; 99: 208–214
- [53] Mambula S.S., Calderwood S.K.: Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. *J. Immunol.*, 2006; 177: 7849–7857
- [54] Martín C.A., Carsons S.E., Kowalewski R., Bernstein D., Valentino M., Santiago-Schwarz F.: Aberrant extracellular and dendritic cell (DC) surface expression of heat shock protein (hsp)70 in the rheumatoid joint: possible mechanisms of hsp/DC-mediated cross-priming. *J. Immunol.*, 2003; 171: 5736–5742
- [55] Massa M., Passalia M., Manzoni S.M., Campanelli R., Ciardelli L., Yung G.P., Kamphuis S., Pistorio A., Meli V., Sette A., Prakken B., Martini A., Albani S.: Differential recognition of heat-shock protein in dnaJ-derived epitopes by effector and Treg cells leads to modulation of inflammation in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2007; 56: 1648–1657
- [56] Mekić M., Ristić M.: Our experiences in treatment of patients suffering from rheumatoid arthritis. *Med. Arh.*, 2008; 62: 77–79
- [57] Mesquita D. Jr., Cruvinel W.M., Câmara N.O., Kállas E.G., Andrade L.E.: Autoimmune diseases in the TH17 era. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2009; 42: 476–486
- [58] Motta A., Schmitz C., Rodrigues L., Ribeiro F., Teixeira C., Detanico T., Bonan C., Zwickel H., Bonorino C.: *Mycobacterium tuberculosis* heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin-10 production and inhibits T-cell proliferation *in vitro*. *Immunology*, 2007; 121: 462–472
- [59] Munk M.E., Schoel B., Modrow S., Karr R.W., Young R.A., Kaufmann S.H.: T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self-epitopes shared by the mycobacterial and human 65-kilodalton heat shock protein. *J. Immunol.*, 1989; 143: 2844–2849
- [60] Nylandsted J., Gyrd-Hansen M., Danielewicz A., Fehrenbacher N., Lademann U., Hoyer-Hansen M., Weber E., Multhoff G., Rohde M., Jäättelä M.: Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J. Exp. Med.*, 2004; 200: 425–435
- [61] Osterloh A., Veit A., Gessner A., Fleischer B., Breloer M.: Hsp60-mediated T cell stimulation is independent of TLR4 and IL-12. *Int. Immunol.*, 2008; 20: 433–443
- [62] Paul A.G., van Kooten P.J., van Eden W., van der Zee R.: Highly autoproductive T cells specific for 60-kDa heat shock protein produce IL-4/IL-10 and IFN- $\gamma$  and are protective in adjuvant arthritis. *J. Immunol.*, 2000; 165: 7270–7277
- [63] Pockley A.G., Calderwood S.K., Multhoff G.: The atheroprotective properties of Hsp70: a role for Hsp70-endothelial interactions? *Cell Stress Chaperones*, 2009; 14: 545–553
- [64] Prakken A.B., van Eden W., Rijkers G.T., Kuis W., Toebes E.A., de Graeff-Meeder E.R., van der Zee R., Zegers B.J.: Autoreactivity to human heat-shock protein 60 predicts disease remission in oligoarticular juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1996; 39: 1826–1832
- [65] Prakken B., Kuis W., van Eden W., Albani S.: Heat shock proteins in juvenile idiopathic arthritis: keys for understanding remitting arthritis and candidate antigens for immune therapy. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2002; 4: 466–473
- [66] Prakken B.J., Roord S., van Kooten P.J., Wagenaar J.P., van Eden W., Albani S., Wauben M.H.: Inhibition of adjuvant-induced arthritis by interleukin-10-driven regulatory cells induced via nasal administration of a peptide analog of an arthritis-related heat-shock protein 60 T cell epitope. *Arthritis Rheum.*, 2002; 46: 1937–1946
- [67] Prakken B.J., Samodal R., Le T.D., Giannoni F., Yung G.P., Scavulli J., Amox D., Roord S., de Kleer I., Bonnin D., Lanza P., Berry C., Massa M., Billetta R., Albani S.: Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 4228–4233
- [68] Ramage J.M., Young J.L., Goodall J.C., Gaston J.S.: T cell responses to heat-shock protein 60: differential responses by CD4<sup>+</sup> T cell subsets according to their expression of CD45 isotypes. *J. Immunol.*, 1999; 162: 704–710
- [69] Remmers E.F., Plenge R.M., Lee A.T., Graham R.R., Hom G., Behrens T.W., de Bakker P.I., Le J.M., Lee H.S., Batliwalla F., Li W., Masters S.L., Booty M.G., Carulli J.P., Padyukov L., Alfredsson L., Klareskog L., Chen W.V., Amos C.I., Criswell L.A., Seldin M.F., Kastner D.L., Gregersen P.K.: STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.*, 2007; 357: 977–986
- [70] Rosenthal M., Bahous I., Ambrosini G.: Longterm treatment of rheumatoid arthritis with OM-8980. A retrospective study. *J. Rheumatol.*, 1991; 18: 1790–1793
- [71] Schick C., Arbogast M., Lowka K., Rzepka R., Melchers I.: Continuous enhanced expression of Hsc70 but not Hsp70 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.*, 2004; 50: 88–93
- [72] Shahrara S., Huang Q., Mandelin A.M. II, Pope R.M.: TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2008; 10: R93
- [73] Smolen J.S., Aletaha D., Bijlsma J.W., Breedveld F.C., Boumpas D., Bredemeyer G., Combe B., Cutolo M., de Wit M., Dougados M., Emery P., Gibofsky A., Gomez-Reino J.J., Haraoui B., Kalden J., Keystone E.C., Kvien T.K., McInnes I., Martin-Mola E., Montecucco C., Schoels M., van der Heijde D.: Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010; 69: 631–637
- [74] Smolen J.S., Landewé R., Breedveld F.C., Dougados M., Emery P., Gaujoux-Viala C., Gorter S., Knevel R., Nam J., Schoels M., Aletaha D., Buch M., Gossec L., Huizinga T., Bijlsma J.W., Burmester G., Combe B., Cutolo M., Gabay C., Gomez-Reino J., Kouloumas M., Kvien T.K., Martin-Mola E., McInnes I., Pavelka K., van Riel P., Scholte M., Scott D.L., Sokka T., Valesini G., van Vollenhoven R., Winthrop K.L., Wong J., Zink A., van der Heijde D.: EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010; 69: 964–975
- [75] Suzuki A., Yamada R., Chang X., Tokuhira S., Sawada T., Suzuki M., Nagasaki M., Nakayama-Hamada M., Kawaida R., Ono M., Ohtsuki M., Furukawa H., Yoshino S., Yukioka M., Tohma S., Matsubara T., Wakitani S., Teshima R., Nishioka Y., Sekine A., Iida A., Takahashi A., Tsunoda T., Nakamura Y., Yamamoto K.: Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.*, 2003; 34: 395–402
- [76] Thole J.E., Hindersson P., de Bruyn J., Cremers F., van der Zee J., de Cock H., Tommassen J., van Eden W., van Embden J.D.: Antigenic relatedness of a strongly immunogenic 65 kDa mycobacterial protein antigen with a similarly sized ubiquitous bacterial common antigen. *Microb. Pathog.*, 1988; 4: 71–83
- [77] Toussier E., Robinet E., Saas P., Chabod J., Augé B., Cozma G., Tiberghien P., Roudier J., Wendling D.: Bacterial extract (OM-89) specific and non specific immunomodulation in rheumatoid arthritis patients. *Autoimmunity*, 2006; 39: 299–306
- [78] Tukaj S., Kotlarz A., Jozwik A., Smoleńska Z., Bryl E., Witkowski J.M., Lipińska B.: Hsp40 proteins modulate humoral and cellular immune response in rheumatoid arthritis patients. *Cell Stress Chaperones*, 2010; 15: 555–566
- [79] Tukaj S., Kotlarz A., Józwick A., Smoleńska Z., Bryl E., Witkowski J.M., Lipińska B.: Cytokines of the Th1 and Th2 type in sera of rheumatoid arthritis patients; correlations with anti-Hsp40 immune response and diagnostic markers. *Acta Biochim. Pol.*, 2010; 57: 327–332

- [80] Ulmansky R., Cohen C.J., Szafer F., Moallem E., Fridlender Z.G., Kashi Y., Naparstek Y.: Resistance to adjuvant arthritis is due to protective antibodies against heat shock protein surface epitopes and the induction of IL-10 secretion. *J. Immunol.*, 2002; 168: 6463–6469
- [81] Uray K., Hudecz F., Füst G., Prohászka Z.: Comparative analysis of linear antibody epitopes on human and mycobacterial 60-kDa heat shock proteins using samples of healthy blood donors. *Int. Immunol.*, 2003; 15: 1229–1236
- [82] van Eden W.: Stress proteins as targets for anti-inflammatory therapies. *Drug Discov. Today*, 2000; 5: 115–120
- [83] van Eden W., Thole J.E., van der Zee R., Noordzij A., van Embden J.D., Hensen E.J., Cohen I.R.: Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature*, 1988; 331: 171–173
- [84] van Eden W., van der Zee R., Prakken B.: Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005; 5: 318–330
- [85] Van Eden W., Van Der Zee R., Van Kooten P., Berlo S.E., Cobelens P.M., Kavelaars A., Heijnen C.J., Prakken B., Roord S., Albani S.: Balancing the immune system: Th1 and Th2. *Ann. Rheum. Dis.*, 2002; 61(Suppl.2): ii25–ii28
- [86] van Roon J.A., van Eden W., van Roy J.L., Lafeber F.J., Bijlsma J.W.: Stimulation of suppressive T cell responses by human but not bacterial 60-kD heat-shock protein in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, 1997; 100: 459–463
- [87] van Venrooij W.J., van Beers J.J., Pruijn G.J.: Anti-CCP Antibody, a Marker for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2008; 1143: 268–285
- [88] Vega V.L., Rodríguez-Silva M., Frey T., Gehrmann M., Diaz J.C., Steinem C., Multhoff G., Arispe N., De Maio A.: Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J. Immunol.*, 2008; 180: 4299–4307
- [89] Vischer T.L.: Follow-up with OM-8980 after a double-blind study of OM-8980 and auranofin in rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.*, 1990; 9: 356–361
- [90] Vos K., Miltenburg A.M., van Meijgaarden K.E., van den Heuvel M., Elferink D.G., van Galen P.J., van Hogezaand R.A., van Vliet-Daskalopoulou E., Ottenhoff T.H., Breedveld F.C., Boots A.M., de Vries R.R.: Cellular immune response to human cartilage glycoprotein-39 (HC gp-39)-derived peptides in rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. *Rheumatology*, 2000; 39: 1326–1331
- [91] Wendling U., Bloemendal A., Van Der Zee R., Rutten V.P., Van Kooten P.J., Farine J.C., Van Eden W.: Antirheumatic E. coli extract OM-89 induces T cell responses to HSP60 and 70. *Int. J. Immunopharmacol.*, 1997; 19: 565–568
- [92] Wendling U., Farine J.C.: Oral administration of HSP-containing E. coli extract OM-89 has suppressive effects in autoimmunity. Regulation of autoimmune processes by modulating peripheral immunity towards hsp's? *Biotherapy*, 1998; 10: 223–227
- [93] Wendling U., Paul L., van der Zee R., Prakken B., Singh M., van Eden W.: A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue. *J. Immunol.*, 2000; 164: 2711–2717
- [94] Weyand C.M., Goronzy J.J.: Association of MHC and rheumatoid arthritis. HLA polymorphisms in phenotypic variants of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.*, 2000; 2: 212–216
- [95] Wieten L., Berlo S.E., Ten Brink C.B., van Kooten P.J., Singh M., van der Zee R., Glant T.T., Broere F., van Eden W.: IL-10 is critically involved in mycobacterial HSP70 induced suppression of proteoglycan-induced arthritis. *PLoS One*, 2009; 4: e4186
- [96] Wieten L., Broere F., van der Zee R., Koerkamp E.K., Wagenaar J., van Eden W.: Cell stress induced HSP are targets of regulatory T cells: a role for HSP inducing compounds as anti-inflammatory immunomodulators? *FEBS Lett.*, 2007; 581: 3716–3722
- [97] Wieten L., van der Zee R., Goedemans R., Sijtsma J., Serafini M., Lubsen N.H., van Eden W., Broere F.: Hsp70 expression and induction as a readout for detection of immune modulatory components in food. *Cell Stress Chaperones*, 2010; 15: 25–37
- [98] Wieten L., van der Zee R., Spiering R., Wagenaar-Hilbers J., van Kooten P., Broere F., van Eden W.: A novel heat-shock protein coinducer boosts stress protein Hsp70 to activate T cell regulation of inflammation in autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2010; 62: 1026–1035
- [99] Young J.C., Agashe V.R., Siegers K., Hartl F.U.: Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004; 5: 781–791
- [100] Zlacka D., Vavrincova P., Hien Nguyen T.T., Hromadnikova I.: Frequency of anti-hsp60, -65 and -70 antibodies in sera of patients with juvenile idiopathic arthritis. *J. Autoimmun.*, 2006; 27: 81–88
- [101] Zügel U., Schoel B., Yamamoto S., Hengel H., Morein B., Kaufmann S.H.: Crossrecognition by CD8 T cell receptor alpha beta cytotoxic T lymphocytes of peptides in the self and the mycobacterial hsp60 which share intermediate sequence homology. *Eur. J. Immunol.*, 1995; 25: 451–458
- [102] Zurawa-Janicka D., Narkiewicz J., Lipińska B.: Characterization of the HtrA family of proteins. *Postępy Biochem.*, 2007; 53: 27–36
- [103] Żylicz M., Wawrzynow A.: Insights into the function of Hsp70 chaperones. *IUBMB Life*, 2001; 51: 283–287

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.