

Received: 2010.03.19  
Accepted: 2010.06.23  
Published: 2010.08.04

## Mechanizmy regulacji odpowiedzi immunologicznej w modelu zwierzęcym reumatoidalnego zapalenia stawów u myszy (CIA)\*

Mechanisms involved in the regulation of immune response in animal model of rheumatoid arthritis in mice (CIA)

Katarzyna Marcińska, Marian Szczepanik

Zakład Biologii Rozwoju Człowieka, Instytut Pielęgniarstwa i Położnictwa, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

### Streszczenie

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest jednym z przykładów schorzeń autoimmunizacyjnych. Mimo że to schorzenie nie należy do rzadkich i obejmuje około 1% populacji świata, to jego patogenezę nadal pozostaje niewyjaśniona. Uważa się, że u podstaw patogenezы RZS leży reakcja zapalna mediowana przez limfocyty Th1 rozpoznające niezidentyfikowane antygeny obecne w stawie. Istnieje coraz więcej dowodów świadczących o tym, że limfocyty Th17 odgrywają rolę w schorzeniach autoimmunizacyjnych, w tym również RZS i wspomniana populacja komórek pomocniczych może być bardziej istotna w patogenezы RZS, aniżeli komórki Th1. Dotychczas brakuje w pełni skutecznych oraz pozbawionych działań niepożądanych metod leczenia RZS. W związku z tym istnieje ogromna potrzeba opracowania terapii RZS, która pozwoliłaby w sposób swoisty kontrolować przebieg choroby. Bogatym źródłem informacji na temat roli układu immunologicznego w patogenezы RZS są badania prowadzone na zwierzętach. Kolagenowe zapalenie stawów (CIA) indukowane u genetycznie predysponowanych szczepów myszy, szczurów, królików oraz u reżusów jest uznane jako model doświadczalny RZS ze względu na podobieństwo zmian histologicznych oraz immunologicznych obserwowanych w RZS. Wiedza uzyskana dzięki badaniom prowadzonym na modelu CIA, bezpośrednia ocena zmian w stawie z udziałem nowoczesnych metod badawczych pozwala na lepsze zrozumienie natury zaburzeń odpowiedzi immunologicznej w RZS, a tym samym na możliwość manipulacji poszczególnymi komponentami tejże odpowiedzi.

**Słowa kluczowe:** reumatoidalne zapalenie stawów • kolagenowe zapalenie stawów • terapia • tolerancja • komórki regulacyjne

### Summary

Rheumatoid arthritis (RA) represents an example of the autoimmune disease. With a prevalence of 1% worldwide, the pathogenesis of RA is not clear yet. At present it is thought that the pathogenesis of RA results from an inflammatory response mediated by CD4+ Th1 cells that

\* Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu ze środków MNiSW nr N N401 000936 dla MM-S, N N401 355333, N N401 355433 oraz N N401 006939 dla MS, a także ze środków na badania statutowe K/ZDS//001434 dla MS.

recognize unidentified antigens present in bone joints. Recently, there is a growing evidence for a role for Th17 lymphocytes in autoimmunity, including RA, suggesting that this population of helper cells may be more important in the pathogenesis of RA than Th1 cells. Thus far, treatment modalities for RA are limited, with the prevailing one acting nonspecifically on the immune system. However, such an approach results in a general immunosuppression and is accompanied by severe side-effects. There is a large demand for developing RA therapy that particularly targets pathogenic antigen-specific T cells. Research on pathogenesis of the autoimmune diseases, and development of new drugs is now possible thanks to experimental animal models that mimic human diseases. Collagen-induced arthritis (CIA) in genetically susceptible strains of mice, rats, rabbits or rhesus monkeys has been used as an experimental model of RA, as it shares many histological and immunological features. The knowledge gained using this model allows to better understand the pathogenesis of RA and, consequently, to manipulate particular components of the immune system to develop efficient therapies.

**Key words:** rheumatoid arthritis • collagen-induced arthritis • therapy • tolerance • T regulatory cell

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=916123>

**Word count:** 4962

**Tables:** 2

**Figures:** 3

**References:** 142

**Adres autora:** prof. dr hab. n. med. Marian Szczepanik, Zakład Biologii Rozwoju Człowieka, UJ CM, ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków; e-mail: mmszczep@cyf-kr.edu.pl lub marian.szczepanik@uj.edu.pl

**Wykaz skrótów:** **Ab** – przeciwciało (antibody); **Ag** – antygen (antigen); **AP-1** – czynnik transkrypcyjny AP-1 (activator protein 1); **APC** – komórka prezentująca antygen (antigen presenting cell); **April** – czynnik indukujący proliferację (proliferation-inducing ligand); **BAFF** – czynnik aktywujący limfocyt B (B cell activating factor); **Bcl-2** – białko antyapoptyczne (B-cell lymphoma 2); **BCR** – receptor limfocyta B (B-cell receptor); **Blys** – stymulator limfocyta B (B lymphocyte stimulator); **CCL** – ligand chemokiny typu CC (CC chemokine ligand); **CCP** – cykliczny peptyd cytrulinowany (cyclic citrullinated peptide); **CD** – czynnik różnicowania (cluster of differentiation); **CDR** – region determinujący dopasowanie (complementarity-determining region); **CFA** – kompletny adiuwant Freund'a (complete Freund's adjuvant); **CIA** – kolagenowe zapalenie stawów (collagen induced arthritis); **COLL II** – kolagen typu II (collagen II); **COX** – cyklooksygenaza (cyclooxygenase); **CS** – nadwrażliwość kontaktowa (contact sensitivity); **CTLA4** – antygen-4 związany z limfocytym T cytotoksycznym (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4); **CXCL** – ligand chemokiny typu CXC (CXC chemokine ligand); **DMARDs** – leki przeciwreumatyczne modyfikujące przebieg choroby (disease-modifying antirheumatic drugs); **EAE** – doświadczalne autoimmunizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (experimental autoimmune encephalomyelitis); **EC** – naskórne (epicutaneous); **ERK** – kinaza regulowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe (extracellular signal regulated kinase); **FasL** – ligand receptora Fas (Fas ligand); **Fc** – fragment krystalizujący (fragment crystallizable); **FcR** – receptor fragmentu Fc przeciwciała (Fc receptor); **GALT** – tkanka limfatyczna przewodu pokarmowego (gut-associated lymphoid tissue); **HLA** – antygeny ludzkich leukocytów (human leukocyte antigens); **IFA** – niekompletny adiuwant Freund'a (incomplete Freund's adjuvant); **IFN** – interferon (interferon); **Ig** – immunoglobulina (immunoglobulin); **IKK** – kinaza IκB (I kappa B kinase); **IL** – interleukina (interleukin); **JAK** – kinaza tyrozynowa Janus (Janus tyrosine kinase); **JNK** – kinaza wiążąca c-Jun (Jun N-terminal kinase); **KP** – komórka plazmatyczna, plazmocyta (plasmocyte); **LPS** – lipopolisacharyd (lipopolysaccharide); **LT** – limfotoksyna (lymphotoxin); **mAb** – przeciwciało monoklonalne (monoclonal antibody); **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana przez mitogen (mitogen-activated protein kinase); **Mast** – mastocyt (mastocyte); **MBP** – zasadowe białko mielin (myelin basic protein); **MEKK** – kinaza MEK=MAPKK, kinaza kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny (mitogen-activated protein kinase kinase); **Mf** – makrofag (macrophage); **MHC** – główny układ zgodności tkankowej (major histocompatibility complex); **MMPs** – metaloproteinazy macierzy (matrix metalloproteinases); **MPO** – mieloperoksydaza (myeloperoxidase); **Neu** – neutrofil (neutrophil); **NF-κB** – czynnik jądrowy κB (nuclear factor κB);

**NK** – naturalny zabójca (natural killer); **NKT** – limfocyt T naturalny zabójca (natural killer T cell); **NO** – tlenek azotu (nitric oxide); **NSAIDs** – niesteroidowe leki przeciwzapalne (non-steroidal anti-inflammatory drugs); **OVA** – owalbumina (ovalbumin); **PAD4** – deaminaza 4 peptydylo argininy (peptidylarginine deiminase 4); **per os** – doustnie; **PGE<sub>2</sub>** – prostaglandyna E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>); **PTPN22** – fosfataza tyrozyny białkowej N22 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22); **RANK** – aktywator receptora NF-κB (receptor aktywator of NF-κB); **RANKL** – ligand aktywujący receptor dla NF-κB (receptor activator of NF-κB ligand); **RZS** – reumatoidalne zapalenie stawów (rheumatoid arthritis); **SE** – epitop w pozycji 70–74 (shared epitope); **SFN** – sulforafan (sulforaphane); **STAT** – transduktory sygnału i aktywatory transkrypcji (signal transducers and activators of transcription); **Syk** – śledzionowa kinaza tyrozynowa (spleen tyrosine kinase); **TCR** – receptor limfocytu T (T cell receptor); **TGF** – transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor); **Th** – limfocyt T pomocniczy (T helper); **TLR** – receptor Toll-podobny (Toll-like receptor); **TNF** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor); **Tr1** – limfocyt T regulacyjny typu 1 (type 1 regulatory T cell); **TRAF1** – czynnik 1 związany z receptorem TNF (TNF receptor-associated factor 1); **Treg** – limfocyt T-regulacyjny (T regulatory cell); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor).

## REUMATOIDALNE ZAPALENIE STAWÓW

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest przewlekłą chorobą zapalną dotykającą około 1% populacji dorosłych, która występuje dwukrotnie częściej u kobiet niż u mężczyzn [2]. Pojawia się w każdym wieku, lecz szczyt zachorowań przypada na okres między 25 a 55 rokiem życia [19].

Etiopatogeneza RZS nie jest do końca poznana. Przez wiele lat dopatrywano się udziału różnych drobnoustrojów w rozwoju RZS. Jednak ze względu na brak dowodów na to, że określony drobnoustrój może być odpowiedzialny za rozwój RZS, tę atrakcyjną hipotezę uznano za kontrowersyjną. Obecnie większość autorów przychyliła się do stanowiska, że RZS jest chorobą autoimmunizacyjną [12,31].

Spośród czynników predysponujących do rozwoju RZS najistotniejszą rolę odgrywa czynnik genetyczny. Innymi czynnikami odgrywającymi znaczącą rolę w rozwoju RZS są czynniki środowiskowe oraz immunologiczne.

Głównym genetycznym czynnikiem zwiększającym ryzyko zachorowania na RZS są allele głównego układu zgodności tkankowej HLA, takie jak HLA-DR1 i HLA-DR4 mające tzw. shared epitope (SE) w α-helisie regionu 3CDR [45, 128]. Nie poznano jeszcze przyczyny korelacji między HLA, a częstością rozwoju RZS, jednak przypuszcza się, że określone antygeny zgodności tkankowej mogą preferencyjnie prezentować autoantygeny limfocytom T. Obecnie uważa się, że geny HLA odpowiadają jedynie częściowo za podatność na RZS, czynnikami predysponującymi do rozwoju choroby są również geny spoza układu HLA. Jednym z takich czynników genetycznych jest polimorfizm genu *PTPN22* kodującego limfoidalną fosfatazę tyrozynową, która odgrywa główną rolę w negatywnej regulacji limfocytów T [67]. Ponadto należy wspomnieć o polimorfizmie genu *PADI4* kodującego enzym *PAD4*, który jest odpowiedzialny za potranslacyjną modyfikację białka polegającą na zamianie argininy w citrulinę [105,106]. Rozpatrując predyspozycje genetyczne w rozwoju RZS należy również pamiętać o polimorfizmie genów kodujących białka biorące udział w signalingu komórkowym STAT4 (białko zaangażowane w odpowiedzi na cytokiny prozapalne, m.in. IL-12, IL-23) oraz TRAF1 (białko zaangażowane

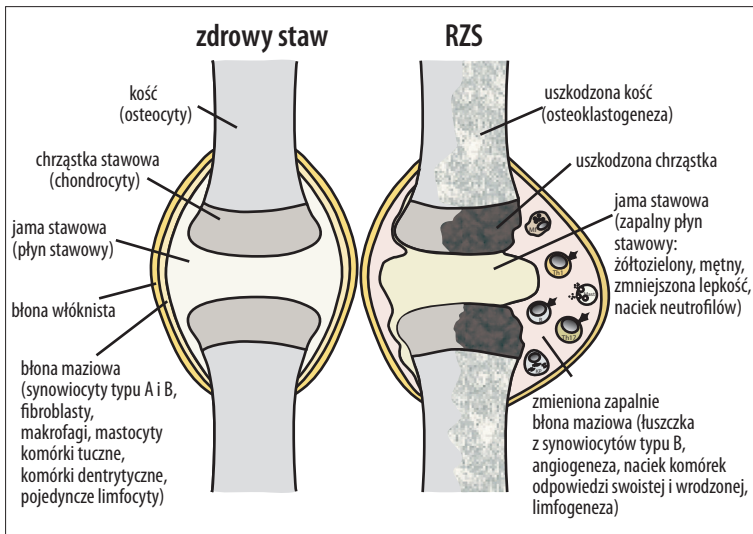
w negatywnej regulacji sygnałów mediowanych przez receptory TNF) [45].

Z innych czynników predysponujących do zachorowania na RZS wymienia się czynniki środowiskowe. Uważa się, że palenie tytoniu zwiększa ryzyko zachorowania na RZS, co wiąże się z wytwarzaniem przeciwciał przeciwko cyklicznym peptydom cytrulinowanym (anty-CCP) [17,50,51]. Jednak w świetle obecnych badań rola przeciwciał anty-CCP w rozwoju RZS nie jest pewna, natomiast przeciwciała te mają nieocenione znaczenie prognostyczne [85,122,123]. Do innych czynników środowiskowych zwiększających ryzyko zachorowania na RZS należą pył krzemowy oraz różnego typu oleje mineralne [52]. Czynniki hormonalne wydaje się elementem predysponującym do RZS, ponieważ schorzenie to występuje 2–4 razy częściej u kobiet niż u mężczyzn, a ponadto obserwowano zwiększone ryzyko pojawienia się objawów RZS w okresie poporodowym oraz laktacji [141]. Istnieją również doniesienia, w których nie zaobserwowano korelacji pomiędzy karmieniem piersią a zapadalnością na RZS [59]. Z kolei stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych może chronić przed RZS [69].

## UDZIAŁ MECHANIZMÓW IMMUNOLOGICZNYCH W PATOGENEZIE RZS

Reumatoidalne zapalenie stawów jest schorzeniem przewlekłym, które charakteryzuje się zmienioną zapalnie błoną maziową stawu prowadzącą do uszkodzeń chrząstki i tworzenia nadżerek kostnych. Następstwem tych zmian jest zniszczenie integralności i deformacja stawu ograniczająca sprawność fizyczną.

Charakter odpowiedzi immunologicznej toczącej się w stawie ma charakter złożony, a antygen przeciwko któremu wywołana jest odpowiedź, nie jest znany. W obrębie błony maziowej obserwuje się naciek komórkowy złożony z limfocytów T oraz B, plazmacytów, makrofagów, neutrofilów, mastocytów oraz komórek NK (naturalny zabójca) (ryc. 1). Płyn stawowy zawiera więcej granulocytów wielojądrazstych niż komórek jednojądrzastych. W czasie trwania procesu zapalnego w stawie napływające komórki układu odpornościowego występują w postaci dyfuzyjnej (50%) lub tworzą agregaty (20%). W zaawansowanym stadium choroby mogą



Ryc. 1. Porównanie stawu prawidłowego ze stawem objętym procesem zapalnym w RZS (schemat); B – limfocyt B, Th – limfocyt T pomocniczy, Mast – mastocyt, Mf – makrofag, Neu – neutrofil, KP – komórka plazmatyczna

się pojawiać grudki chłonne z ośrodkami namnażania przypominające węzły chłonne w fazie pobudzenia (25%) oraz ziarniniakowe zmiany (5%). W prawidłowym stawie błona maziowa i płyn stawowy są pozbawione komórek wydzielających się z układu odpornościowego [16,24,39]. Ponadto w RZS obserwuje się proliferację synowioocytów i powstanie łuszczy. Dodatkowo występują uszkodzenia mikrokrążenia i indukcja angiogenezy. Wykazano, że angiogeneza jest zależna od trombospondyny 2 (TSP2) wytwarzanej przez fibroblasty i endotelium [39,125]. W miarę postępu choroby błona maziowa ulega obrzękowi i wypukła się do jamy stawu w postaci kosmkowych wypustek. Dodatkowo dochodzi do osteoklastogenezy i degradacji składników macierzy chrząstki stawowej [40,84]. Mimo występowania destrukcyjnego procesu, przebieg choroby może być dość zróżnicowany. Zazwyczaj po 3 latach dochodzi do uszkodzenia stawu u 80% pacjentów, a po 10 latach może prowadzić do kalectwa u około 50% chorych [23].

Ponadto można zaobserwować zmiany pozastawowe, które są konsekwencją tworzenia guzków reumatoidalnych, zapalenia naczyń i strukturalnych zmian mechanicznych zajętych stawów. Do objawów pozastawowych zaliczamy zmiany neurologiczne, płucne, kostne oraz kardiologiczne [23,69,82,136].

Dokładny mechanizm immunologiczny leżący u podstaw RZS nie jest znany. Przez wiele lat wielu badaczy opierając się na paradygmacie stworzonym przez Mosmanna twierdziło, że u podstaw swoistych narządowo chorób autoimmunizacyjnych, w tym również RZS, leży reakcja zapalna z udziałem limfocytów Th1 uwalniających  $IFN-\gamma$  [37]. W chwili odkrycia kolejnej populacji limfocytów pomocniczych Th17 wytwarzających m.in. IL-17, liczne rzesze naukowców przez nadinterpretację wyników oraz w pogoni za modą starało się wykluczyć udział komórek Th1 w patomechanizmie RZS twierdząc, że w reakcji zapalnej biorą udział wyłącznie limfocyty Th17 [117]. Obecnie zarówno klinicyści, jak i naukowcy zajmują bardziej liberalne stanowisko twierdząc, iż zarówno limfocyty Th1, jak i Th17 biorą udział w reakcji zapalnej w RZS [3,67,74]. Dotychczas stwierdzono, że w wyniku uwalniania chemokin (m.in. CCL20) do stawu są przyciągane limfocyty

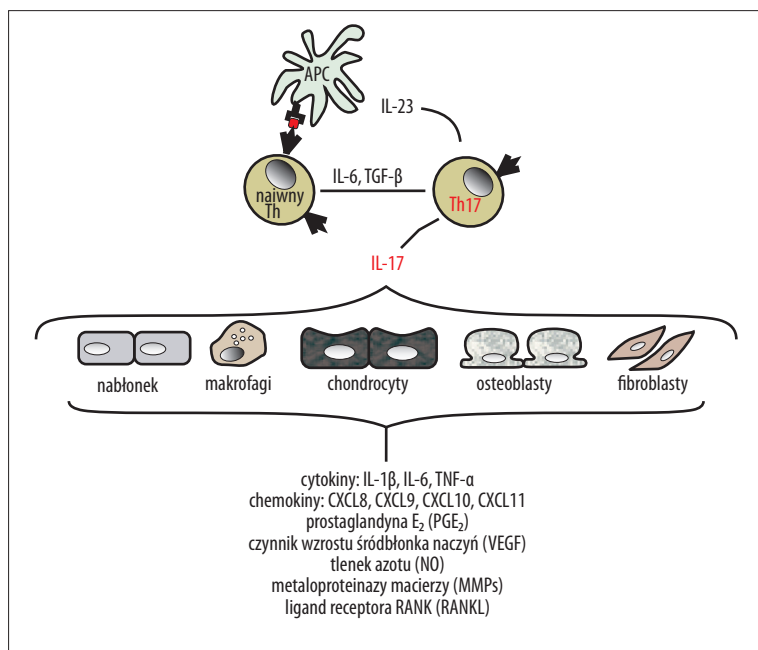
Th17, które poprzez uwalnianą IL-17 stymulują makrofagi, fibroblasty, osteoblasty i chondrocyty [35]. Wspomniane komórki pod wpływem IL-17 wydzielają m.in. cytokiny prozapalne (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), chemokiny, prostaglandynę E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), tlenek azotu (NO) oraz metaloproteiny macierzy (MMPs) (ryc. 2) [34,54,65,88,91]. Ponadto IL-17 zwiększa ekspresję RANKL (ligand aktywujący receptor NF- $\kappa$ B) na synowioocytach, chondrocytach i osteoblastach, przez co promuje rozwój osteoklastów, które są odpowiedzialne za destrukcję kości [1,98].

W późniejszej fazie reakcji zapalnej mogą być również zaangażowane limfocyty Th1, które są rekrutowane z krążenia do chorej tkanki poprzez chemokiny CXCL9, CXCL10 oraz CXCL11 [3]. W tkance stawowej limfocyty Th1 poprzez uwalnianie  $IFN-\gamma$  aktywują makrofagi, które z kolei wydzielają enzymy proteolityczne rozkładające macierz, wolne rodniki oraz cytokiny prozapalne w tym m.in. TNF- $\alpha$ , który odgrywa główną rolę w patologii RZS. Uwolniony TNF- $\alpha$  wpływa na wytwarzanie cytokin prozapalnych, chemokin, PGE<sub>2</sub>, MMPs oraz ekspresję molekuł adhezyjnych i RANKL (ryc. 3) [14,15,113].

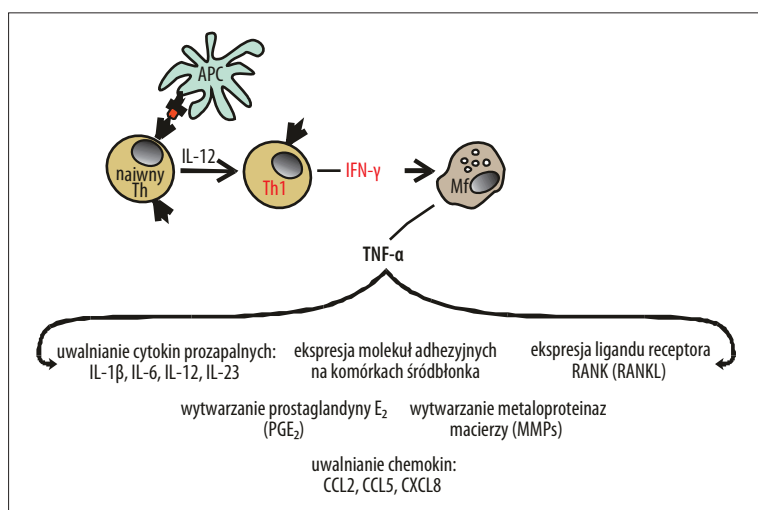
Omawiając udział limfocytów T w patomechanizmie RZS należy również wspomnieć o populacji komórek T-regulatorowych (Treg) o fenotypie CD4+ CD25+ FoxP3+. Liczne badania kliniczne wykazały obecność limfocytów Treg zarówno w błonie maziowej, jak i w płynie maziowym [6]. Nie jest pewne, dlaczego mimo obecności komórek Treg w ognisku choroby nie dochodzi do jej wygaszenia. Dotychczas wykazano, że limfocyty Treg obecne w stawach nie są zdolne do hamowania funkcji limfocytów T-efektorowych. Przypuszcza się, że ta niewydolność funkcjonalna limfocytów Treg jest wynikiem działania na nie TNF- $\alpha$  występującego w dużych stężeniach w zapalnie zmienionej tkance stawowej. Ponadto stwierdzono, że w zmienionym zapalnie stawie komórki efektorowe są mniej wrażliwe na supresyjne działanie komórek regulacyjnych w porównaniu z limfocytami efektorowymi obecnymi w krążeniu [10,30].

Rola limfocytów B oraz wytwarzanych przeciwciał w przebiegu RZS nie jest znana. Przypuszcza się, że w aktywacji





Ryc. 2. Rola limfocytów Th17 w patomechanizmie RZS; APC – komórka prezentująca antygen, IL – interleukina, TGF – transformujący czynnik wzrostu, Th – limfocyt T pomocniczy



Ryc. 3. Udział limfocytów Th1 w patogenezie RZS; APC – komórka prezentująca antygen, IL – interleukina, IFN-γ – interferon gamma, Mf – makrofag, TNF-α - czynnik martwicy nowotworu α, Th – limfocyt T pomocniczy

limfocytów B poza antygenem ważną rolę odgrywają także ligandy receptorów Toll-podobnych (TLR) [18]. Badania kliniczne wykazały, że eliminacja części limfocytów B w organizmie chorego prowadziła do złagodzenia przebiegu RZS [11]. Obecnie przypuszcza się, że jednym z mechanizmów procesu zapalnego występującego w RZS może być odkładanie się kompleksów immunologicznych w stawie i klasyczna aktywacja układu dopełniacza. Warto również pamiętać, że limfocyty B mogą pełnić rolę komórek prezentujących antygen limfocytom T autoreaktywnym [101].

### REUMATOIDALNE ZAPALENIE STAWÓW U ZWIERZĄT

Cennym źródłem informacji na temat roli układu odpornościowego w patogenezie RZS są badania prowadzone na zwierzętach. Postęp wiedzy o funkcjonowaniu układu immunologicznego, możliwość manipulacji jego komponentami, charakterystyka składników immunologicznych w stawie z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych

pozwała na lepsze zrozumienie natury odpowiedzi immunologicznej w RZS. Pokłada się wielkie nadzieje w tym, że uzyskana wiedza ułatwi opracowanie skutecznej metody leczenia RZS. Model zwierzęcy RZS wywołuje się u genetycznie predysponowanych szczepów myszy, szczurów, małp, a także u królików [4]. Najczęściej wybierany jest model myszy ze względu na niskie koszty, łatwość modyfikacji genetycznej oraz możliwość samodzielnej pracy eksperymentalnej z gryzoniem [7,48]. Wadą są różnice genetyczne między zwierzęciem a człowiekiem, w związku z czym niejednokrotnie trudno jest odnieść uzyskane wyniki badań na zwierzętach do stanu istniejącego u ludzi [47]. Chorobę można wywołać u myszy m.in. poprzez dootrzewnowe iniekcje proteoglikanu (proteoglycan induced arthritis), dostawową immunizację OVA lub BSA (antigen induced arthritis), dożylnie podanie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus induced septic arthritis*), podskórne wstrzyknięcie *Borrelia burgdorferi* (*Borrelia burgdorferi induced arthritis*). Dodatkowo istnieje możliwość spontanicznego

rozwoju choroby u myszy genetycznie zmodyfikowanych np. defektywnych myszy IL-1Ra<sup>-/-</sup> lub myszy z ekspresją ludzkiego genu TNF- $\alpha$  [28,60].

Jednak najpowszechniej stosowanym modelem imitującym RZS jest kolagenowe zapalenie stawów [collagen induced arthritis (CIA)]. CIA przypomina RZS pod względem występowania obrzęku, napływu komórek, tworzenia łuszczyki, niszczenia chrząstki i kości, udziału MHC II (u myszy H-2<sup>a</sup> i H-2<sup>b</sup>; u człowieka HLA-DR1 i HLA-DR4). Ponadto zarówno przeciwciała, jak i limfocyty T przeciwko kolagenowi typu drugiego (COLL II) występują we wczesnej fazie RZS i CIA. Różnicą między CIA a RZS może być występowanie zapalenia okostnej u zwierząt z wywołanym CIA [21,42].

Metoda wywołania CIA polega na podaniu antygeny, jakim jest COLL II wraz z kompletnym adiuwantem Freund'a (CFA) genetycznie predysponowanym szczepom myszy (DBA1) [80]. Kolagen typu II występujący w chrząstce stawowej jest homotrimerem zbudowanym z  $\alpha 1$  łańcuchów polipeptydowych zawierających 1018 aminokwasów. Kolagen stosowany do immunizacji może być własny (auto COLL II) lub obcy (hetero COLL II) pochodzący od innego gatunku zwierząt np. bydłęcy lub kurzy. Różnicą między wspomnianymi białkami jest m.in. występowanie innych aminokwasów w pozycji 266, tzn. Asp w mysim COLL II a Glu w bydłęcym oraz kurzym. Ponadto w budowie kolagenu typu II ważną jest pozycja 264, która ulega modyfikacji, tj. hydroksylowana i glikozylowana z udziałem chondrocytów. W zależności od typu zastosowanego antygeny można indukować różne postacie CIA. Zastosowanie auto COLL II indukuje chroniczną postać choroby, tak jak to się dzieje w RZS, ale z opóźnionym początkiem i zredukowanym natężeniem choroby. Po immunizacji hetero COLL II wykazano, że w ciągu kilku dni od podania antygeny indukowana jest odpowiedź immunologiczna w węzłach chłonnych, a po upływie 2 tygodni reakcja zapalna pojawia się w stawie. Następnie po 2 kolejnych tygodniach występuje makroskopowe zapalenie stawu, które ustępuje po 4 tygodniach. Nawrót choroby następuje po miesiącu. Ponadto CIA indukowane hetero COLL II może przebiegać niechronicznie z szybkim początkiem choroby [44,68,81].

W reakcji zapalnej leżącej u podstaw CIA są zaangażowane m.in. różne subpopulacje limfocytów Th pomocniczych, limfocyty B, makrofagi, neutrofile, mastocyty, synowioocyty, fibroblasty, chondrocyty i osteocyty.

Jedną z populacji limfocytów T zaangażowanych w reakcji zapalnej CIA są limfocyty Th1, które powstają z komórek T naiwnych rozpoznających antygen w środowisku IFN- $\gamma$  oraz IL-12. Charakterystycznym markerem limfocytów Th1 jest czynnik transkrypcyjny T-bet. Komórki tej populacji wytwarzają m.in. IFN- $\gamma$  oraz IL-2 [26]. W badaniach nad rolą IFN- $\gamma$  w CIA wykazano, że zastosowanie przeciwciał przeciwko IL-12 niezbędnej do powstania komórek Th1 powoduje zmniejszenie objawów chorobowych [99]. Obserwacja ta została potwierdzona w badaniach, w których podanie IL-12 oraz IFN- $\gamma$  podczas indukcji CIA prowadziło do nasilenia objawów chorobowych. Powyższe wyniki sugerują, że IFN- $\gamma$  wraz z IL-12 odgrywają ważną rolę w indukcji CIA. Mimo przeprowadzenia licznych badań nad rolą IFN- $\gamma$  w CIA jego działanie nie

jest do końca poznane, ponieważ istnieją również doniesienia na temat supresyjnego działania IFN- $\gamma$  w omawianym modelu. Dowodem na to są badania wykazujące, że podanie kombinacji IFN- $\gamma$ /IL-12 po indukcji CIA powoduje zmniejszenie natężenia choroby [90]. Z kolei badania z wykorzystaniem defektywnych szczepów myszy IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>, IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>, IL-12p35<sup>-/-</sup>, IL-12R<sup>-/-</sup> wykazały możliwość wywołania CIA w sytuacji braku IFN- $\gamma$  lub IL-12, bądź receptorów wspomnianych cytokin [46]. Obecnie w oparciu o przedstawione wyniki badań trudno jest jednoznacznie zdefiniować rolę IFN- $\gamma$  w CIA. Można jedynie sądzić, że IFN- $\gamma$  może pozytywnie lub negatywnie regulować proces zapalny towarzyszący CIA [49,91].

Wraz z odkryciem kolejnej populacji limfocytów T pomocniczych, tzw. limfocytów Th17 wiele ośrodków naukowych podjęło próbę wyjaśnienia ich roli w przebiegu CIA. Charakterystycznym markerem komórek Th17 jest czynnik transkrypcyjny ROR $\gamma$ t. Komórki tej populacji powstają z limfocytów T naiwnych rozpoznających antygen w środowisku IL-6 oraz TGF- $\beta$ . Dodatkowo w podtrzymaniu funkcji komórek Th17 biorą udział IL-21 oraz IL-23 [8,73]. Limfocyty Th17 swoją funkcję efektorową pełnią za pośrednictwem uwalnianych cytokin, do których należą IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNF- $\alpha$  oraz LT- $\beta$  [32].

Dyskusja nad udziałem limfocytów Th17 w CIA pojawiła się, gdy zauważono, że u defektywnych myszy IL-12p35<sup>-/-</sup> można wywołać CIA, mimo małego stężenia IFN- $\gamma$ , któremu towarzyszył wysoki poziom IL-17A [41]. Potwierdzeniem tej obserwacji były wyniki badań, w których podanie genu IL-17 w wirusowym wektorze w trakcie indukcji CIA powodowało zwiększenie natężenia choroby. Opisany manewr nie wpływał na poziom przeciwciał anty-COLL II klasy IgG1 i IgG2a [64]. Ponadto podanie przeciwciał neutralizujących IL-17 zarówno przed, jak i w trakcie wystąpienia objawów chorobowych łagodziło CIA [54,66]. Dodatkowo eksperymenty z użyciem defektywnych szczepów myszy IL-12/IL-23p40<sup>-/-</sup> oraz IL-23p19<sup>-/-</sup> dowiodły roli Th17 w patomechanizmie CIA [41].

W literaturze znajdują się również doniesienia na temat występowania subpopulacji limfocytów Th17 wytwarzających jednocześnie IL-17A i IFN- $\gamma$  w przebiegu CIA, jednak ich rola do tej pory nie jest znana [63,79,102].

Podsumowując rolę limfocytów T w reakcji zapalnej towarzyszącej CIA należy zaznaczyć, że rola poszczególnych subpopulacji komórek T nie jest poznana. Wielu autorów uważa, że zarówno limfocyty Th1 jak i Th17 są zaangażowane w proces zapalny toczący się w stawie [26]. W świetle dotychczas przeprowadzonych badań trudno jest zdecydować, która z wymienionych populacji limfocytów T pełni dominującą rolę w CIA.

W reakcji zapalnej obserwowanej w trakcie CIA są zaangażowane także limfocyty B. Świadczą o tym m.in. doświadczenia wykazujące, że transfer samych limfocytów T w minimalnym stopniu przenosi chorobę, natomiast podanie przeciwciał anty-COLL II powoduje niepełnoobjawowe zmiany zapalne w tkance stawowej [12,121]. Jak dotąd słabo są poznane mechanizmy, poprzez które limfocyty B są zaangażowane w przebieg CIA. Uważa się, że przeciwciała anty-COLL II łączą się z kolagenem typu II

w chrząstce stawowej i tak utworzone kompleksy antygen-przeciwciała prowadzą do klasycznej aktywacji dopełniacza. Uwolnione komponenty dopełniacza C3a i C5a, jako chemoatraktanty przyczyniają się do napływu leukocytów do tkanki stawowej. Dodatkowo kompleksy antygen-przeciwciała, poprzez wiązanie z receptorem FcR makrofagów, mogą prowadzić do ich aktywacji, co przejawia się m.in. uwalnianiem IL-1 i TNF- $\alpha$ . Wspomniane cytokiny stymulują synowioocyty, fibroblasty, chondrocyty m.in. do uwalniania enzymów niszczących chrząstkę [21,68]. Udział receptorów FcR w indukcji CIA potwierdzono u defektywnego szczepu myszy FcR $\gamma^{-/-}$ , u których nie udało się pomysłnie wywołać choroby [29,53,83].

W ciągu ostatnich lat pojawiła się nowa hipoteza na temat roli przeciwciał przeciwko cyklicznemu peptydowi cytrulinowemu (przeciwciała anty-CCP). Według niektórych autorów przeciwciała anty-CCP łącząc się ze zmodyfikowanym COLL II w stawie zapoczątkowują reakcję zapalną [96,120,134]. Warto jednak pamiętać, że wyniki badań nad rolą przeciwciał anty-CCP w CIA uzyskane przez pewne grupy badaczy nie zostały potwierdzone w innych ośrodkach naukowych [127]. Zatem rola wspomnianych przeciwciał w patomechanizmie CIA jest niepewna, natomiast mają one duże znaczenie diagnostyczne i prognostyczne.

Podsumowując należy zaznaczyć, iż mechanizmy zaangażowane w reakcję zapalną leżącą u podstaw CIA są złożone i obejmują wzajemne interakcje komórek odpowiedzi swoistej, tj. limfocytów Th1, Th17, limfocytów B z komórkami odpowiedzi nieswoistej w tym m.in. makrofagami, neutrofilami, mastocytami oraz komórkami tkanki łącznej, do których zaliczamy synowioocyty, fibroblasty, chondrocyty i osteocyty.

## METODY TERAPII RZS

Terapia RZS zmierza głównie do ograniczenia bólu, hamowania postępu choroby i wynikającej z niej niesprawności oraz poprawy utraconych funkcji. Leczenie powinno być kompleksowe, tzn. stosowanie środków farmakologicznych z terapią uzupełniającą.

We wczesnych stadiach choroby leczenie rozpoczyna się od niesteroidowych leków przeciwzapalnych (non-steroidal anti-inflammatory drugs – NSAIDs), np. diklofenak, indometacyna, ibuprofen, naproksen, ketoprofen, piroksydam, meloksykam, nabumeton. Cechą wymienionych leków jest to, że oprócz supresji aktywności enzymu COX-2 mogą hamować również aktywność enzymu COX-1, odgrywającego główną rolę w syntezie PGE<sub>2</sub> o działaniu protekcyjnym w stosunku do błony śluzowej żołądka. Warto podkreślić, że przy stosowaniu tej grupy leków poza uzyskaniem oczekiwanego efektu terapeutycznego, bardzo często dochodzi do zaburzeń żołądkowo-jelitowych (owrzodzenie żołądka, krwawienie, niestrawność, nudności) oraz powikłań ze strony nerek (zespół nerczycowy, śródmiąższowe zapalenie nerek). Zastosowanie leków będących selektywnymi inhibitorami izoenzymu cyklooksygenazy COX-2 lub NSAIDs z inhibitorami pompy protonowej powoduje zmniejszenie komplikacji żołądkowo-jelitowych, ale pociąga za sobą zwiększenie problemów sercowo-naczyniowych. Rozwiązaniem występowania ww. niepożądanych objawów może być użycie leków nowej generacji np. NO-NSAIDs

(NO-releasing NSAIDs) oraz H<sub>2</sub>S-NSAIDs (H<sub>2</sub>S-releasing NSAIDs), które zmniejszą komplikacje żołądkowo-jelitowe i sercowo-naczyniowe [33,94,95].

NSAIDs poprzez swoje działanie przeciwzapalne oraz przeciwbólowe głównie łagodzą objawy RZS, natomiast wywierają nieznaczny wpływ na przebieg choroby. Dlatego do terapii włącza się leki modyfikujące przebieg choroby DMARDs (disease-modifying antirheumatic drugs), do których należą m.in. sulfasalazyna, metotreksat, leflunomid, cyklosporyna A, związki złota, hydroksychlorochina, chlorochina, d-penicylamina, azatopiryna oraz cyklofosfamid. Niestety te leki mogą też wywoływać wiele działań niepożądanych, np. nadciśnienie tętnicze, zaburzenia czynności wątroby, zmiany skórne, uszkodzenie nerek, zanik szpiku kostnego oraz spadek odporności [92,97,114,124].

W przypadku braku odpowiedzi na leki z grupy DMARDs wprowadza się leki biologiczne, które mogą swoiście interferować z mechanizmami immunologicznymi leżącymi u podstaw patologii RZS. Ważną grupą leków są preparaty będące inhibitorami TNF- $\alpha$ , który odgrywa istotną rolę w patologii RZS. Do tej grupy leków należą TNFR połączony z IgG1 (etanercept), chimeryczne Ab przeciwko TNF (infliksymab) oraz ludzkie Ab przeciwko TNF (adalimumab). Ponadto czynnikami biologicznymi, które wiążą i neutralizują TNF- $\alpha$  są cetrolizumab pegol, pegsunercept oraz golimumab. Innymi lekami biologicznymi są ludzki antagonisty IL-1R (anakinra), humanizowane Ab przeciwko IL-6R (tocilizumab), ludzki CTLA4 połączony z IgG1 wiążący się z molekułami kostymulacyjnymi na APC (abatacept), humanizowane przeciwciała monoklonalne (mAb) anty-CD20 (rituximab) oraz ludzkie przeciwciała monoklonalne wiążące białko RANKL (denosumab) [9,18,51,57,100,124]. Inne preparaty z grupy leków biologicznych przedstawiono w tabeli 1.

Niedogodnością w stosowaniu leków biologicznych jest ich ograniczona dostępność, bardzo wysoka cena, inwazyjna metoda podania (podskórna, dożylna). Ponadto w następstwie terapii tą grupą leków mogą wystąpić działania niepożądane, np. powstanie chłoniaka, częste infekcje, miejscowe reakcje skórne, bóle głowy, nudności [87,124].

Przy omawianiu leczenia RZS należy również wspomnieć o terapii steroidowej. Leczenie z zastosowaniem steroidów budzi wiele kontrowersji wśród reumatologów, ponieważ długo stosowana w dużych dawkach powoduje wiele działań niepożądanych np. osteoporozę, niewydolność nadnerczy, zaćmę, atrofię skóry, wrzód trawienny, infekcje [94]. W celu ograniczenia efektów niepożądanych glikokortykoidy podawane są miejscowo do zmienionych zapalnie stawów [25]. Do glikokortykosteroidów stosowanych w leczeniu RZS zaliczamy hydrokortyzon, prednizon, prednizolon, metyloprednizolon, triamcinolon, deksametazon, betametazon.

Jeżeli w trakcie terapii z zastosowaniem określonego preparatu z wyżej wymienionych grup leków odpowiedź na leczenie jest niezadowalająca lub brak jej w ogóle, to stosuje się wówczas terapię łączoną, tzn. DMARDs + biologiczne czynniki + glikokortykosteroidy. Wyróżniamy różne schematy leczenia, np. metotreksat + infliksymab, metotreksat + sulfasalazyna + hydrochlorochina + prednizolon, metotreksat + sulfasalazyna + prednizon, metotreksat + leki

Tabela 1. Leki biologiczne testowane w terapii RZS w badaniach klinicznych

Cel	Nazwa preparatu	Opis	Faza badań
IL-1	canakinumab (ACZ885) [100]	humanizowane mAb przeciwko IL-1	II
	AMG 108 [15]	humanizowane mAb przeciwko IL-1 $\beta$	II
IL-6	CNTO 136 [100]	mAb przeciwko IL-6	II
IL-12/23	apilimod mesylate (STA-5326) [100]	inhibitor IL-12/23	II
IL-15	humax IL-15 [100]	humanizowane mAb przeciwko IL-15	II
	AMG 714 [100]	ludzkie mAb przeciwko IL-15	II
IL-17	AIN457 [5, 100]	mAb przeciwko IL-17	I - II
CD19 lim B	MDX-1342 [100]	ludzkie mAb przeciwko CD19	I
CD20 lim B	ocrelizumab [100]	humanizowane mAb przeciwko CD20	III
	ofatumumab [100]	ludzkie mAb przeciwko CD20	III
	TRU-015 [100]	SMIP blokuje CD20	II
CD80 APC	RhuDex [70, 100]	inhibitor CD80	I
LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2, Light (udział w limfogenezie)	baminercept [15, 39]	ludzkie LT- $\beta$ R + FcIgG1 (wiąże: LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2, Light)	II
BLys (BAFF), April (udział w powstaniu i w aktywacji lim B)	atacept [5, 15]	ludzkie TACI+FcIgG1 (wiąże BLys, April)	II
	briobacept [9]	BR3+FcIgG (wiąże BLys)	II
Blys	belimumab [15]	humanizowane mAb przeciwko Blys	II
Fas	ARG098 [100]	mAb przeciwko Fas	I
Kinaza JAK3 (udział w transdukcji sygnału z IFN- $\gamma$ R)	CP-690,550 [5, 100]	inhibitor kinazy JAK3	III
Kinaza Syk (udział w transdukcji sygnału z Fc $\gamma$ R i BCR)	tamatinib fosdium [9]	inhibitor kinazy Syk	II
Kinaza p38 MAPK (udział w transdukcji sygnału z IL-17R)	VX 702 [65, 100]	inhibitor kinazy p38 MAPK	II
Kinaza MEK (udział w powstaniu MMPs)	ARRY-438162 [5]	inhibitor kinazy MEK	II

neutralizujące TNF- $\alpha$ , metotreksat + cyklosporyna A, metotreksat + etanercept. W trakcie terapii skojarzonej łączy się leki o różnych punktach wychwytu. Ponadto lek, który wcześniej nie działał może się okazać skuteczny w połączeniu z innymi. Dodatkowo zmniejsza się także występowanie działań niepożądanych, ponieważ każdy lek jest podawany w mniejszej dawce niż w monoterapii [22,23].

Z leczenia fizycznego u chorych na RZS wykorzystuje się m.in. termoterapię, krioterapię, elektromagnetoterapię, hydroterapię, masaże, terapię laserową, ultradźwięki oraz akupunkturę. Ponadto stosuje się kąpiele solankowe i siarczkowo-siarkowodorowe. Dodatkowo wskazane jest stosowanie odpowiedniej diety, regularne ćwiczenia oraz ograniczenie palenia [22,126]. W celu zapobiegania

zniekształceniom oraz zniszczeniu stawu, a także jego rekonstrukcji stosowane jest leczenie operacyjne (np. endoprotezy) [38].

#### EKSPERYMENTALNE METODY TERAPII REUMATOIDALNEGO ZAPALENIA STAWÓW

W pracach eksperymentalnych zmierzających do opracowania nowych metod terapii RZS naukowcy starają się modyfikować przebieg choroby przez neutralizację określonych cytokin oraz interferowanie z wybranymi molekułami, które biorą udział w transdukcji sygnału.

Krótką charakterystykę tego typu terapii doświadczalnych w CIA zawarto w tabeli 2.



Tabela 2. Metody terapii doświadczalnej CIA

Cel	Sposób inaktywowania	Wynik
IL-12	mAb przeciwko p40 [15]	↓CIA i ↑CIA
	IL-12p35-/- [15]	↑↑CIA
	IL-12p40-/- [15]	brak CIA
IL-17	IL-17-/-, mAb przeciwko IL-17 [15]	↓CIA
IL-18	IL-18-/- [15]	↓CIA
IL-21	IL-21R + FcIgG2a [15]	↓CIA
IL-23	IL-23p19-/- [15]	brak CIA
	mAb przeciwko IL-23 [100]	↓CIA
VEGF	mAb przeciwko VEGF [100]	↓CIA
Th17	IL-27 [15]	↓CIA
	IL-33 [15]	↑CIA
Mastocyt	IL-33R-/-, sST2 (antagonista IL-33) [15]	↓CIA
Bcl-2, p53, Bax synowocytów	sulforafan (SFN) [55]	↓CIA
Kinaza JNK (udział w transdukcji sygnału w powst. MMPs)	kurkumina [78]	↓CIA
Kinaza ERK (udział w transdukcji sygnału w powst. MMPs)	PD184352 [115]	↓CIA
c-Jun (udział w transdukcji sygnału w powst. MMPs)	inhibitor c-Jun [78, 107]	↓CIA
Kinaza IκB 2 (udział w transdukcji sygnału w powstaniu cytokin)	inhibitor IKK-2 [100, 108]	↓CIA
Czynnik transkrypcyjny AP-1/c-Fos (udział w transdukcji sygnału od RANK)	inhibitor AP-1/c-Fos (T-5224) [84, 100]	↓CIA

### MECHANIZMY ZAANGAŻOWANE W UTRZYMANIU TOLERANCJI OBWODOWEJ

W klasycznym ujęciu stan tolerancji był rozumiany, jako brak odpowiedzi immunologicznej na własne antygeny organizmu, będący wynikiem eliminacji w okresie noworodkowym „zakazanych” klonów limfocytów B i T. Obecnie wiadomo, że za stan tolerancji odpowiadają złożone mechanizmy regulacyjne związane z delecją, anergią klonalną oraz z aktywną supresją mediowaną przez wyspecjalizowane komórki regulacyjne. Jak powszechnie wiadomo autoreaktywne limfocyty zdolne do rozpoznania własnych antygenów np.: kolagenu, osłonki mielinowej, tyreoglobuliny występują u zdrowych osobników i pozostają nieszkodliwe w prawidłowych warunkach, a co więcej, mogą pełnić ważną funkcję w utrzymaniu tkankowej homeostazy [131].

W związku z tym, że proces selekcji negatywnej nie prowadzi do eliminacji wszystkich potencjalnie groźnych limfocytów, muszą istnieć mechanizmy, które nie dopuszczają do ich aktywacji na obwodzie. Jak wspomniano wyżej główną rolę w utrzymaniu stanu tolerancji na obwodzie pełnią limfocyty regulacyjne. Spośród nich najistotniejszą rolę spełniają limfocyty T regulacyjne (Treg). Zadaniem komórek regulacyjnych jest podjęcie decyzji, kiedy nie odpowiadać na antygeny, ponieważ dany antygen jest nieszkodliwym alergenem lub jest antygenem własnym (autotolerancja).

Dodatkowo, komórki regulacyjne decydują o sile oraz czasie trwania odpowiedzi immunologicznej. O roli komórek regulacyjnych w utrzymaniu homeostazy w układzie odpornościowym świadczą obserwacje poczynione u myszy, a także u ludzi. Zaobserwowano bowiem, że mutacja genu czynnika transkrypcyjnego Foxp3 niezbędnego do rozwoju komórek Treg prowadzi do zaburzeń odpowiedzi immunologicznej u myszy (tzw. scurfy mice) oraz u ludzi (zaburzenie związane z chromosomem X znane jako IPEX – immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome). U tych osobników poza ciężkimi schorzeniami autoimmunizacyjnymi obserwuje się podwyższony poziom IgE, eozynofilię oraz alergie pokarmowe [86].

Obecnie wyróżnia się dwie główne populacje Treg. Pierwsza z nich to limfocyty TCRαβ+CD4+CD25+Foxp3+ powstające w grasicy i zaprogramowane w czasie ontogenezy do hamowania odpowiedzi na autoantygeny. Komórki te są określane mianem naturalnych Treg [135]. Druga grupa komórek regulacyjnych to tzw. indukowane komórki Treg powstające na obwodzie, a które są zdolne do hamowania odpowiedzi zarówno na autoantygeny, jak również na antygeny obce. W obrębie indukowanych Treg wyróżniamy limfocyty Treg CD4+ FoxP3+ oraz populacje limfocytów regulacyjnych Foxp3-, do których zaliczamy komórki Th3 CD4+ oraz limfocyty Tr1 CD4+. Zarówno naturalne, jak i indukowane komórki Treg są swoiste antygenowo, jednak

w fazie efektorowej hamują odpowiedź w sposób nieswoisty antygenowo w wyniku bezpośredniego kontaktu z komórkami efektorowymi (naturalne Treg) lub za pośrednictwem uwalnianych cytokin TGF- $\beta$  (Th3) lub IL-10 (Tr1) [58].

Do komórek zdolnych do negatywnej regulacji odpowiedzi immunologicznej należą również limfocyty TCR $\gamma\delta$  oraz komórki NKT. Komórki obu populacji hamują odpowiedź za pośrednictwem uwalnianych cytokin. Istotną rolę w negatywnej regulacji odpowiedzi immunologicznej odgrywają także limfocyty T CD8+. Komórki regulacyjne CD8+ hamują odpowiedź immunologiczną poprzez uwalnianie cytokin, bądź też w procesie eliminacji komórek efektorowych poprzez działanie cytotosyczne [142].

Komórki regulacyjne należą do grupy komórek względnie krótko żyjących, dlatego stale poszukuje się metod pozwalających na ewentualną ich aktywację, co mogłoby w pewnych przypadkach znaleźć zastosowanie w terapii pozwalając na manipulowanie odpowiedzią immunologiczną.

### TOLERANCJA POKARMOWA

Podawanie antygeny drogą pokarmową jest klasyczną metodą indukowania stanu tolerancji stosowaną już przez starożytnych władców, którzy przyjmowali niewielkie dawki trucizn w obawie przed otruciem. Dokładniejsze poznanie mechanizmu tolerancji pokarmowej zawdzięcza się doświadczeniom przeprowadzonym na zwierzętach i opisanym po raz pierwszy przez Wellsa w 1911 r. [133]. Jednak dopiero w 1946 r. naturę tolerancji pokarmowej poznali dokładniej Chase i Sulzberger [20,104]. Naukowcy od lat badają mechanizmy regulacyjne związane ze zjawiskiem tolerancji pokarmowej. W wielu modelach zwierzęcych, stanowiących odpowiedniki ludzkich chorób autoimmunizacyjnych, testuje się wpływ podawania autoantygenów drogą pokarmową na rozwój choroby. Zaobserwowano, że podanie odpowiednich antygenów *per os* prowadzi do złagodzenia przebiegu eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia, eksperymentalnego zapalenia stawów, zespołu antyfosfolipidowego, insulinozależnej cukrzycy oraz zapalenia nerwów obwodowych [56]. Określenie jednolitego mechanizmu tolerancji pokarmowej jest jednak utrudnione przez różnice związane z podłożem genetycznym, wiekiem zwierząt, rodzajem mikroflory bakteryjnej, integralnością bariery nabłonkowej, profilem miejscowo wydzielanych cytokin, odmienną ekspresją molekuł adhezyjnych, czy też dawką i strukturą antygeny [13].

Komórki regulacyjne generowane w trakcie karmienia szczurów Lewis małymi dawkami zasadowego białka mieliny (MBP), które hamują funkcję komórek efektorowych Th1, należą do populacji limfocytów T CD8+. W podobnym schemacie badań prowadzonych na myszach transgenicznych za aktywną supresję są odpowiedzialne oprócz limfocytów T CD8+ również limfocyty T CD4+. Opisane kłony komórek T supresyjnych są identyczne pod względem budowy TCR oraz restrikcji MHC do komórek efektorowych Th1, jednak po stymulacji antygenem uwalniają supresyjne cytokiny (TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10), które hamują proliferację i uwalnianie cytokin przez komórki Th1. Ten typ supresji był zniesiony po wstrzyknięciu mAb anty-TGF- $\beta$  [132].

Inne badania wykazały, że małe dawki antygeny podawane drogą pokarmową zwierzętom bez adiuwantu, prowadzą do indukowania populacji limfocytów T CD4+ CD25+ w tkankach obwodowych, przypuszczalnie alternatywnie do grasiczej drogi ich powstawania. Obwodowe komórki T CD4+ CD25+ po stymulacji są zdolne wytwarzać TGF- $\beta$  oraz IL-10, wykazują dużą ekspresję molekuly CTLA-4 i fenotyp komórek pamięci [116]. Obserwowano również, że po zastosowaniu małych dawek antygeny dochodzi do różnicowania naiwnych komórek T CD4+ w limfocyty Th3, które nie wykazują ekspresji CD25, są odporne na selekcję i wydzielają duże ilości TGF- $\beta$ . W przypadku supresji mediowanej przez limfocyty Th3 może być ona zniesiona *in vitro* przez podanie mAb anty-TGF- $\beta$ , natomiast supresja indukowana przez limfocyty T CD4+ CD25+ jest nieodwracalna. Przypuszcza się, że komórki T CD4+ CD25+ mają zdolność wiązania TGF- $\beta$  na swojej powierzchni i wykorzystywania go w bezpośrednim kontakcie z komórkami efektorowymi, co wskazuje na odmienny mechanizm działania opisanych populacji komórek supresyjnych [139].

Z kolei duże dawki antygeny podane drogą pokarmową w odróżnieniu od małych dawek przenikają do krążenia w postaci natywnej, bądź jedynie częściowo zmienionej. Tolerancja obserwowana u myszy traktowanych dużymi dawkami owalbuminy (OVA) jest wynikiem głównie selekcji klonalnej swoistych antygenowy limfocytów T. Istnieją również doniesienia na temat generowania pod wpływem dużych dawek antygeny komórek T regulacyjnych CD4+ nieswoistych względem antygeny i cechujących się wysoką ekspresją FasL oraz sekrecją IL-4, IL-10 i TGF- $\beta$ . Przypuszcza się, że komórki te powstają w wątrobie lub tkance limfatycznej przewodu pokarmowego (GALT) [131].

Należy zaznaczyć, że istnieje wiele sprzecznych doniesień dotyczących powstania komórek regulacyjnych w układzie immunologicznym błon śluzowych. Poza istnieniem klasycznych komórek T regulacyjnych (CD4+ CD25+) oraz limfocytów regulacyjnych Tr1 i Th3, funkcję komórek supresyjnych mogą również pełnić limfocyty niekonwencjonalne: CD8 $\alpha\alpha$ , podwójnie negatywne CD4-CD8-, podwójnie pozytywne CD4+ CD8+, pochodzenia pozagrasiczego z receptorami TCR $\alpha\beta$ , a także limfocyty TCR $\gamma\delta$ . Aktywność supresyjna tych komórek jest wynikiem bezpośredniego kontaktu z komórkami efektorowymi oraz uwalniania cytokin, głównie: IL-4, IL-10 i TGF- $\beta$  [13]. Z przytoczonych informacji na temat mechanizmów tolerancji pokarmowej wynika, że jest to proces bardzo złożony, w którym jest zaangażowanych wiele populacji komórek regulacyjnych i których powstawanie jest uwarunkowane różnymi czynnikami.

Inną odmianą tolerancji śluzówkowej jest immunosupresja wywołana podaniem antygeny donosowo. Jej mechanizm wydaje się podobny do tego, który występuje w przypadku tolerancji pokarmowej.

W modelu zwierzęcym RZS wykazano, że podanie COLL II drogą pokarmową przed wywołaniem CIA indukuje w kępkach Peyera powstanie limfocytów T CD4+CD25+Foxp3+. Komórki te osiągają efekt regulacyjny przez hamowanie syntezy IFN- $\gamma$  oraz przeciwciał IgG2a przy jednoczesnym wzroście wytwarzania izotypu IgG1 [75,76,89]. Adopcyjny transfer tych komórek w trakcie indukcji CIA powoduje

zmniejszenie objawów chorobowych [77]. Z kolei traktowanie zwierząt mAb anti-CD25 w 14 dni przed pojawieniem się pierwszych symptomów choroby powoduje nasilenie CIA, podczas gdy transfer komórek CD25+ wywołuje supresję CIA [10]. Ponadto stwierdzono, że podanie COLL II *per os* przed indukcją CIA stymuluje powstanie limfocytów Th2, które wytwarzają IL-4 i IL-10 oraz komórek Th3 uwalniających TGF- $\beta$ . Podobne efekty obserwowano podczas donosowego podania COLL II myszom [27,36,103].

Zaletami stosowanej tolerancji pokarmowej oraz supresji indukowanej donosowym podaniem antygeny są mała inwazyjność, łatwość podania, swoistość, hamowanie odpowiedzi komórkowej i humoralnej [140].

Próby kliniczne polegające na doustnym podaniu bydłowego lub kurzego COLL II nie przyniosły oczekiwanych efektów terapeutycznych. Obecnie rozpatruje się wiele przyczyn, z powodu których śluzówkowe podanie antygeny nie wywiera efektu terapeutycznego u ludzi. Należą do nich m.in. różnice w funkcjonowaniu przewodu pokarmowego u ludzi i testowanych gryzoni, a także pewne różnice gatunkowe w budowie kolagenu, różnice w dawce aplikowanego kolagenu. Ponadto na wynik ma wpływ stan zaawansowania choroby pacjenta podczas terapii klinicznej oraz leki stosowane przed terapią, które wpływają na błonę śluzową przewodu pokarmowego [118].

#### TOLERANCJA NASKÓRNA

Jak wspomniano w poprzednim paragrafie podanie antygeny drogą pokarmową, a także na błonę śluzową nosa prowadzi do lokalnej odpowiedzi immunologicznej przy jednoczesnym wywołaniu głębokiego stanu tolerancji na obwodzie, co odgrywa istotną rolę w unikaniu indukcji odpowiedzi immunologicznej na antygeny niepatogenne, np. antygeny pokarmowe [132].

Przez wiele lat skórę traktowano jako miejsce, w którym stosunkowo łatwo można indukować odpowiedź immunologiczną, a klasycznym przykładem jest reakcja nadwrażliwości kontaktowej (CS) [109]. Natomiast skórze jako miejscu, w którym można wywołać tolerancję nie poświęcano większej uwagi. Ponieważ skóra i błony śluzowe mają podobną funkcję w organizmie (m.in. bariera dla drobnoustrojów) wydaje się możliwe, że naskórna (EC) aplikacja antygeny poza indukcją silnej odpowiedzi immunologicznej może także wywołać stan tolerancji. Wang i wsp. wykazali, że naskórna aplikacja antygeny białkowego – OVA prowadzi do rozwoju atopowego zapalenia skóry, któremu towarzyszy pojawienie się limfocytów T wydzielających IL-4 [129,130]. Następnie Herrick i wsp. zaobserwowali, że podanie EC OVA indukuje Th2 zależny model astmy u myszy [43]. Wspomniane wyżej prace mogą zatem sugerować,

iż podanie antygeny białkowego na skórę przy spełnieniu odpowiednich warunków immunizacji może także indukować powstanie limfocytów T wytwarzających przeciwzapalne cytokiny, które z kolei mogłyby hamować odpowiedź komórkową Th1 zależną.

Badania własne autorów nad regulacją reakcji CS wykazały, że naskórna aplikacja antygeny białkowego w postaci opatrunku z gazy, bądź emulsji w kremie przed aktywną immunizacją haptentem prowadzi do znacznego zahamowania reakcji CS mediowanej przez limfocyty CD4+ Th1 [109]. Obserwowane zahamowanie odpowiedzi komórkowej po aplikacji antygeny białkowego na skórę jest wynikiem działania powstałych komórek T o fenotypie TCR $\alpha\beta$ + CD4+ CD8+. Supresja indukowana podaniem EC antygeny jest antygenowo nieswoista [61,93]. W indukcji komórek regulacyjnych zaangażowane są: IL-4, IL-10 oraz TGF- $\beta$ . Natomiast funkcja efektorowa komórek T regulacyjnych indukowanych poprzez aplikację EC antygeny białkowego jest związana z sekrecją TGF- $\beta$ , podczas gdy IL-4 i IL-10 nie są odpowiedzialne za powstały stan immunosupresji [111]. Ponadto badania na modelu zwierzęcym stwardnienia rozsianego (experimental autoimmune encephalomyelitis – EAE) wykazały, że podobnie jak w reakcji CS EC aplikacja antygeny białkowego prowadzi do hamowania procesu zapalnego i w konsekwencji do złagodzenia objawów choroby [72, 112, 119]. Co więcej, supresja indukowana przez skórę okazała się również skuteczna w spowolnieniu reakcji CS Tc1 zależnej [110] i odrzucania przeszczepu [71].

Ponadto obecnie prowadzone przez nasz zespół badania wykazały, że immunizacja EC kolagenem typu II (COLL II) przed indukcją CIA redukuje natężenie objawów choroby, co koreluje z łagodniejszymi zmianami histopatologicznymi, zredukowaną aktywnością MPO w tkance stawowej, zredukowanym wytwarzaniem patogennych przeciwciał IgG2a anti-COLL II i obniżonym poziomem przeciwciał IgG przeciwko peptydom cytrulinowanym (anti-CCP) [62]. Dodatkowo udowodniono, że komórki zdolne do hamowania reakcji zapalnej towarzyszącej CIA, a indukowane podaniem EC COLL II powstają oraz zasiedlają węzły chłonne podskórne oraz śledzionę. Komórki te należą do populacji limfocytów TCR $\alpha\beta$ +, które nie wykazują swoistości antygenowej [137]. Naskórnice indukowane komórki regulacyjne osiągają efekt supresyjny m.in. w wyniku hamowania wytwarzania IFN- $\gamma$  przez komórki efektorowe [138].

Podsumowując uzyskane wyniki badań na kilku różnych modelach doświadczalnych wykazały, że manewr immunizacji EC antygenem białkowym może się okazać skuteczną metodą wywołania stanu tolerancji, a przez to może się stać użyteczny w opracowaniu metod terapii schorzeń u podstaw, których leży przewlekły proces zapalny.

#### PIŚMIENICTWO

- [1] Adamopoulos I.E., Bowman E.P.: Immune regulation of bone loss by Th17 cells. *Arthritis Res. Ther.*, 2008; 10: 225–234
- [2] Alamanos Y., Drosos A.A.: Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.*, 2005; 4: 130–136
- [3] Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S.: Type 17 T helper cells—origins, features and possible roles in rheumatic disease. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2009; 5: 325–331

- [4] Asquith D.L., Miller A.M., McInnes I.B., Liew F.Y.: Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*, 2009; 39: 2040–2044

- [5] Balague C., Kunkel S.L., Godessart N.: Understanding autoimmune disease: new targets for drug discovery. *Drug Discov. Today*, 2009; 14: 926–934

- [6] Behrens F., Himsel A., Rehart S., Stanczyk J., Beutel B., Zimmermann S.Y., Koehl U., Möller B., Gay S., Kaltwasser J.P., Pfeilschifter J.M., Radeke H.H.: Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2007; 66: 1151–1156
- [7] Bendele A.M.: Animal models of rheumatoid arthritis. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, 2001; 1: 377–385
- [8] Bettelli E., Korn T., Oukka M., Kuchroo V.K.: Induction and effector functions of Th17 cells. *Nature*, 2008; 453: 1051–1057
- [9] Bingham C.O.: Emerging therapeutics for rheumatoid arthritis. *Bull. N Y U Hosp. Jt. Dis.*, 2008; 66: 210–215
- [10] Boissier M.C., Assier E., Biton J., Denys A., Falgarone G., Bessis N.: Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 2009; 76: 10–14
- [11] Bokarewa M., Lindholm C., Zendjanchi K., Nadali M., Tarkowski A.: Efficacy of anti-CD20 treatment in patients with rheumatoid arthritis resistant to a combination of methotrexate/anti-TNF therapy. *Scand J. Immunol.*, 2007; 66: 476–483
- [12] Brand D.D., Kang A.H., Rosloniec E.F.: Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.*, 2003; 25: 3–18
- [13] Brandtzaeg P.: History of oral tolerance and mucosal immunity. *Ann. NY Acad. Sci. USA*, 1996; 778: 1–27
- [14] Brennan F.M., Foey A.D.: Cytokine regulation in RA synovial tissue: role of T cell/macrophage contact-dependent interactions. *Arthritis Res.*, 2002; 4(Suppl.3): S177–S182
- [15] Brennan F.M., McInnes I.B.: Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, 2008; 118: 3537–3545
- [16] Bugatti S., Codullo V., Caporali R., Montecucco C.: B cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.*, 2007; 6: 482–487
- [17] Cantaert T., De Rycke L., Bongartz T., Matteson E.L., Tak P.P., Nicholas A.P., Baeten D.: Citrullinated protein in rheumatoid arthritis: crucial... but not sufficient! *Arthritis Rheum.*, 2006; 54: 3381–3389
- [18] Chaiamnuay S., Bridges S.L.: The role of B cells and autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*, 2005; 12: 203–216
- [19] Chapel H., Haeney M., Misbah S., Snowden N.: Essential of clinical immunology, 2006; 10: 178–200
- [20] Chase M.W.: Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitivity agent. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1946; 61: 257–259
- [21] Cho Y.G., Cho M.L., Min S.Y., Kim H.Y.: Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.*, 2007; 7: 65–70
- [22] Combe B.: Early rheumatoid arthritis: strategies for prevention and management. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2007; 21: 27–42
- [23] Combe B.: Progression in early rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2009; 23: 59–69
- [24] Cope A.P.: T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2008; 10: 1–10
- [25] Courtney P., Doherty M.: Joint aspiration and injection. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2005; 19: 345–369
- [26] Dardalhon V., Korn T., Kuchroo V.K., Anderson A.C.: Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J. Autoimmun.*, 2008; 31: 252–256
- [27] Derry C.J., Harper N., Davies D.H., Murphy J.J., Staines N.A.: Importance of dose of type II collagen in suppression of collagen-induced arthritis by nasal tolerance. *Arthritis Rheum.*, 2001; 44: 1917–1927
- [28] Di Paola R., Cuzzocrea S.: Predictivity and sensitivity of animal models of arthritis. *Autoimmun. Rev.*, 2008; 8: 73–75
- [29] Diaz de Stahl T., Andren M., Martinsson P., Verbeek J.S., Kleinau S.: Expression of FcγRIII is required for development of collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.*, 2002; 32: 2915–2922
- [30] Esensten J.H., Wofsy D., Bluestone J.A.: Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2009; 5: 560–565
- [31] Fournier C.: Where do T cells stand in rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine*, 2005; 72: 527–532
- [32] Fouser L.A., Wright J.F., Dunussi-Joannopoulos K., Collins M.: Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunol. Rev.*, 2008; 226: 87–102
- [33] Fries J.F., Murtagh K.N., Bennett M., Zatarain E., Lingala B., Bruce B.: The rise and decline of nonsteroidal antiinflammatory drug – associated gastropathy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2004; 50: 2433–2440
- [34] Furuzawa-Carballeda J., Vargas-Rojas M.I., Cabral A.R.: Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun. Rev.*, 2007; 6: 169–175
- [35] Gaffen S.L.: An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine*, 2008; 43: 402–407
- [36] Garcia G., Komagata Y., Slavina A.J., Maron R., Weiner H.L.: Suppression of collagen-induced arthritis by oral or nasal administration of type II collagen. *J. Autoimmun.*, 1999; 13: 315–324
- [37] Gerli R., Bistoni O., Russano A., Fiorucci S., Borgato L., Cesarotti M.E., Lunardi C.: *In vivo* activated T cells in rheumatoid synovitis. Analysis of Th1- and Th2-type cytokine production at clonal level in different stages of disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 2002; 129: 549–555
- [38] Ghattas L., Mascella F., Pomponio G.: Hand surgery in rheumatoid arthritis: state of the art and suggestions for research. *Rheumatology*, 2005; 44: 834–845
- [39] Goronzy J.J., Weyand C.M.: Rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.*, 2005; 204: 55–73
- [40] Gravalles E.M.: Bone destruction in arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2002; 61(Suppl.2): ii84–ii86
- [41] Guther I., Becher B.: APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2007; 117: 1119–1127
- [42] Hegen M., Keith J.C., Collins M., Nickerson-Nutter C.L.: Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2008; 67: 1505–1515
- [43] Herrick C.A., MacLeod H., Glusac E., Tigelaar R.E., Bottomly K.: Th2 responses induced by epicutaneous or inhalational protein exposure are differentially dependent on IL-4. *J. Clin. Invest.*, 2000; 105: 765–775
- [44] Holmdahl R., Bockermann R., Bäcklund J., Yamada H.: The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice – a model for rheumatoid arthritis. *Ageing Res. Rev.*, 2002; 1: 135–147
- [45] Imboden J.B.: The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Pathol.*, 2009; 4: 417–434
- [46] Iwakura Y., Ishigame H.: The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 1218–1222
- [47] Jirholt J., Lindqvist A.B., Holmdahl R.: The genetic of rheumatoid arthritis and the need for animal models to find and understand the underlying genes. *Arthritis Res.*, 2001; 3: 87–97
- [48] Kannan K., Ortmann R.A., Kimpel D.: Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology*, 2005; 12: 167–181
- [49] Kelchtermans H., Billiau A., Matys P.: How interferon-γ keeps autoimmune diseases in check. *Trends Immunol.*, 2008; 29: 479–486
- [50] Klareskog L., Alfredsson L., Rantapää-Dahlqvist S., Berglin E., Stolt P., Padyukov L.: What precedes development of rheumatoid arthritis? *Ann. Rheum. Dis.*, 2004; 63: 28–31
- [51] Klareskog L., Catrina A. I., Paget S.: Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2009; 373: 659–672
- [52] Klareskog L., Padyukov L., Rönnelid J., Alfredsson L.: Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Immunol.*, 2006; 18: 650–655
- [53] Kleinau S., Martinsson P., Heyman B.: Induction and suppression of collagen-induced arthritis is dependent on distinct Fcγ receptors. *J. Exp. Med.*, 2000; 191: 1611–1616
- [54] Koenders M.I., Joosten L.A., Berg W.B.: Potential new targets in arthritis therapy: interleukin IL-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2006; 65(Suppl.3): iii29–iii33
- [55] Kong J.S., Yoo S.A., Kim H.S., Kim H.A., Yea K., Ryu S.H., Chung Y.J., Cho C.S., Kim W.U.: Inhibition of synovial hyperplasia, rheumatoid T cell activation, and experimental arthritis in mice by sulfuraphane, a natural occurring isothiocyanate. *Arthritis Rheum.*, 2010; 62: 159–170
- [56] Krause I., Blank M., Shoenfeld Y.: Immunomodulation of experimental autoimmune diseases via oral tolerance. *Crit. Rev. Immunol.*, 2000; 20: 1–16
- [57] Kukar M., Petryna O., Efthimiou P.: Biological targets in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of current and in-development biological disease modifying anti-rheumatic drugs. *Biologics*, 2009; 3: 443–457
- [58] Lan R.Y., Ansari A.A., Lian Z.X., Gershwin M.E.: Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2005; 4: 351–363



- [59] Liao K.P., Alfredsson L., Karlson E.W.: Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2009; 21: 279–283
- [60] Lindqvist A.K., Bockermann R., Johansson A.C., Nandakumar K.S., Johannesson M., Holmdahl R.: Mouse models for rheumatoid. *Trends Gen.*, 2006; 22: 7–13
- [61] Lobo F., Szczepanik M., Bryniarski K., Ptak M., Ptak W.: TCR $\alpha\beta$  CD4/CD8 double-positive T cells mediate suppression of delayed type hypersensitivity (DTH) reactions induced by epicutaneous (EC) immunization. *FASEB J.*, 2004; 88: 17
- [62] Lobo F., Zajac K., Majewska M., Zemelka M., Szczepanik M.: Epicutaneous immunization with protein antigen protects from collagen-induced arthritis. *J. Immunol.*, 2006; 176(Suppl.): 115–113
- [63] Lubberts E.: IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine*, 2008; 41: 84–91
- [64] Lubberts E., Joosten L.A., Oppers B., Bersselaar L., Roo C.J., Kolls J.K., Schwarzenberger P., Loo F.A., Berg W.B.: IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J. Immunol.*, 2001; 167: 1004–1013
- [65] Lubberts E., Koenders M.I., Berg W.B.: The role of T cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res. Ther.*, 2005; 7: 29–37
- [66] Lubberts E., Koenders M.I., Oppers-Walgreen B., Bersselaar L., Roo C.J., Joosten L.A., Berg W.B.: Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheumatism*, 2004; 50: 650–659
- [67] Lundy S.K., Sarkar S., Tesmer L.A., Fox D.A.: Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res. Ther.*, 2007; 9: 202–213
- [68] Luross J.A., Williams N.A.: The genetic and immunopathological process underlying collagen-induced arthritis. *Immunology*, 2001; 103: 407–416
- [69] Lutzky V., Hannawi S., Thomas R.: Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2007; 9: 219–231
- [70] MacKenzie N.M.: New therapeutics that treat rheumatoid arthritis by blocking T-cell activation. *Drug Discov. Today*, 2006; 11: 952–956
- [71] Majewska M., Zajac K., Kubera M., Bryniarski K., Ptak M., Basta-Kaim A., Książek L., Ptak W., Lasoń W., Szczepanik M.: Effects of ovalbumin on the survival of an H-Y incompatible skin graft in C57BL/6 mice. *Pharmacol. Rep.*, 2006; 58: 439–442
- [72] Majewska M., Zajac K., Srebro Z., Sura P., Książek L., Zemelka M., Szczepanik M.: Epicutaneous immunization with myelin basic protein protects from the experimental autoimmune encephalomyelitis. *Pharmacol. Rep.*, 2007; 59: 74–79
- [73] McGeachy M.J., Cua D.J.: Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*, 2008; 28: 445–453
- [74] Mills K.H.: Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2008; 38: 2636–2649
- [75] Min S.Y., Hwang S.Y., Park K.S., Lee J.S., Lee K.E., Kim K.W., Jung Y.O., Koh H.J., Do J.H., Kim H., Kim H.Y.: Induction of IL-10 producing CD4+CD25+ T cells in animal model of collagen-induced arthritis by oral administration of type II collagen. *Arthritis Res. Ther.*, 2004; 6: R213–R219
- [76] Min S.Y., Park K.S., Cho M.L., Kang J.W., Cho Y.G., Hwang S.Y., Park M.J., Yoon C.H., Min J.K., Lee S.H., Park S.H., Kim H.Y.: Antigen-induced, tolerogenic CD11c+, Cd11b+ dendritic cells are abundant in Peyer's patches during the induction of oral tolerance to type II collagen and suppress experimental collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2006; 54: 887–898
- [77] Morgan M.E., Flierman R., van Duivenvoorde L.M., Witteveen H.J., van Ewijk W., van Laar J.M., de Vries R.R., Toes R.E.: Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis Rheum.*, 2005; 52: 2212–2221
- [78] Mun S.H., Kim H.S., Kim J.W., Ko N.Y., Kim D.K., Lee B.Y., Kim B., Won H.S., Shin H.S., Han J.W., Lee H.Y., Kim Y.M., Choi W. S.: Oral administration of curcumin suppresses production of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 to ameliorate collagen-induced arthritis: inhibition of the PKC $\delta$ /JNK/c-jun pathway. *J. Pharmacol. Sci.*, 2009; 111: 13–21
- [79] Murphy C.A., Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W., McClanahan T., Kastelein R.A., Sedgwick J.D., Cua D.J.: Divergent pro- and anti-inflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.*, 2003; 198: 1951–1957
- [80] Myers L.K., Myllyharju J., Nokelainen M., Brand D.D., Cremer M.A., Stuart J.M., Bodo M., Kivirikko K.I., Kang A.H.: Relevance of post-translational modifications for the arthritogenicity of type II collagen. *J. Immunol.*, 2004; 172: 2970–2975
- [81] Myers L.K., Rosloniec E.F., Cremer M.A., Kang A.H.: Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci.*, 1997; 61: 1861–1878
- [82] Nagasawa Y., Takada T., Shimizu T., Narita J., Moriyama H., Terada M., Suzuki E., Gejyo F.: Inflammatory cells in lung disease associated with rheumatoid arthritis. *Intern. Med.*, 2009; 48: 1209–1217
- [83] Nakamura A., Takai T.: A role of Fc $\gamma$ RIIB In the development of collagen-induced arthritis. *Biomed. Pharmacother.*, 2004; 58: 292–298
- [84] Nakashima T., Takayanagi H.: The dynamic interplay between osteoclasts and the immune system. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008; 473: 166–171
- [85] Nishimura K., Sugiyama D., Kogata Y., Tsuji G., Nakazawa T., Kawano S., Saigo K., Morinobu A., Koshiba M., Kuntz K.M., Kamae I., Kumagai S.: Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.*, 2007; 146: 797–808
- [86] Ochs H.D., Gambineri E., Torgerson T.R.: IPEX, FOXP3 and regulatory T-cells: a model for autoimmunity. *Immunol. Res.*, 2007; 38: 112–121
- [87] Olsen N.J., Stein C.M.: New drugs for rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 350: 2167–2179
- [88] Paradowska A., Maśliński W., Grzybowska-Kowalczyk A., Łącki J.: The function of interleukin 17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2007; 55: 329–334
- [89] Park K.S., Park M.J., Cho M.L., Kwok S.K., Ju J.H., Ko H.J., Park S.H., Kim H.Y.: Type II collagen oral tolerance; mechanism and role in collagen-induced arthritis and rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.*, 2009; 19: 581–589
- [90] Paunovic V., Carroll H.P., Vandenbroeck K., Gadina M.: Signalling, inflammation and arthritis: crossed signals: the role of interleukin (IL)-12, -17, -23 and -27 in autoimmunity. *Rheumatology*, 2008; 47: 771–776
- [91] Peck A., Mellins E.D.: Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. *Clin. Immunol.*, 2009; 132: 295–304
- [92] Pincus T., Ferraccioli G., Sokka T., Larsen A., Rau R., Kushner I., Wolfe F.: Evidence from clinical trials and long-term observational studies that disease-modifying anti-rheumatic drugs slow radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2002; 41: 1346–1356
- [93] Ptak W., Szczepanik M., Bryniarski K., Tutaj M., Ptak M.: Epicutaneous application of protein antigens incorporated into cosmetic cream induces antigen-nonspecific unresponsiveness in mice and affects the cell-mediated immune response. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2002; 128: 8–14
- [94] Quan L.D., Thiele G.M., Tian J., Wang D.: The development of novel therapies for rheumatoid arthritis. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2008; 18: 723–738
- [95] Rao P.N., Knaus E.E.: Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2008; 11: 81s–110s
- [96] Rowley M.J., Nandakumar K.S., Holmdahl R.: The role of collagen antibodies in mediating arthritis. *Mod. Rheumatol.*, 2008; 18: 429–441
- [97] Saraux A., Berthelot J.M., Chales G., Le H.C., Thorel J., Hoang S., Martin A., Allain J., Nouy-Trolle I., Devauchelle V., Youinou P., Le G.P.: Second-line drugs used in recent-onset rheumatoid arthritis in Brittany (France). *Joint Bone Spine*, 2002; 69: 37–42
- [98] Sato K.: Th17 cells and rheumatoid arthritis – from the standpoint of osteoclast differentiation. *Allergol. Int.*, 2008; 57: 109–114
- [99] Schulze-Koops H., Kalden J.R.: The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2001; 15: 677–691
- [100] Senolt L., Vencovsky J., Pavelka K., Ospelt C., Gay S.: Prospective new biological therapies for rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.*, 2009; 9: 102–107
- [101] Silverman G.J., Carson D.A.: Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2003; 5(Suppl.4): S1–S6
- [102] Spolski R., Leonard W.J.: Cytokine mediators of Th17 function. *Eur. J. Immunol.*, 2009; 39: 658–661

- [103] Staines N.A., Derry C.J., Marinova-Mutafchieva L., Ali N., Davies D.H., Murphy J.J.: Constraints on the efficacy of mucosal tolerance in treatment of human and animal arthritis diseases. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2004; 1029: 250–259
- [104] Sulzberger M.B.: Arspenname hypersensitivity in guinea-pigs. Experiments demonstrating the role of skin, both as originator and as site of hypersensitivity. *Arch. Dermatol. Syphilol.*, 1930; 22: 839
- [105] 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
- [106] Suzuki A., Yamada R., Yamamoto K.: Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2007; 1108: 323–339
- [107] Sweeney S.E., Firestein G.S.: Mitogen activated protein kinase inhibitors: where are we now and where are we going? *Ann. Rheum. Dis.*, 2006; 65(Suppl.3): iii83–iii88
- [108] Sweeney S.E., Firestein G.S.: Signal transduction in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2004; 16: 231–237
- [109] Szczepanik M.: Regulation of contact hypersensitivity responses by different populations of T suppressor cells. Skin induced tolerance and its clinical implications. *Recent Res. Devel. Immunol.*, 2002; 4: 641–667
- [110] Szczepanik M.: Skin-induced tolerance and its reversal by Toll-like receptor ligands. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2007; 55: 161–172
- [111] Szczepanik M., Bryniarski K., Tutaj M., Ptak M., Skrzeczyńska J., Askenase P.W., Ptak W.: Epicutaneous immunization induces  $\alpha\beta$  T-cell receptor CD4 CD8 double-positive non-specific suppressor T cells that inhibit contact sensitivity via transforming growth factor- $\beta$ . *Immunology*, 2005; 115: 42–54
- [112] Szczepanik M., Tutaj M., Bryniarski K., Dittel B. N.: Epicutaneously induced TGF- $\beta$ -dependent tolerance inhibits experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, 2005; 164: 105–114
- [113] Szekanecz Z., Koch A.E.: Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2007; 19: 289–295
- [114] Tanaka E., Taniguchi A., Urano W., Yamanaka H., Kamatani N.: Pharmacogenetics of disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2004; 18: 233–247
- [115] Thiel M.J., Schaefer C.J., Lesch M.E., Mobley J.L., Dudley D.T., Teclé H., Barrett S.D., Schrier D.J., Flory C.M.: Central role of the MEK/ERK MAP kinase pathway in a mouse model of rheumatoid arthritis: potential proinflammatory mechanisms. *Arthritis Rheum.*, 2007; 56: 3347–3357
- [116] Thorstenson K.M., Khoruts A.: Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells *in vivo* after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J. Immunol.*, 2001; 167: 188–195
- [117] Toh M.L., Miossec P.: The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2007; 19: 284–288
- [118] Toussier E.A.: Oral tolerance in the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.*, 2002; 1: 45–52
- [119] Tutaj M., Szczepanik M.: Epicutaneous (EC) immunization with myelin basic protein (MBP) induced TCR  $\alpha\beta$ +CD4+CD8+ double positive suppressor cells that protect from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Autoimmun.*, 2007; 28: 208–215
- [120] Uysal H., Bockermann R., Nandakumar K.S., Sehnert B., Bajtner E., Engstrom A., Serre G., Burkhardt H., Thunnissen M.G.M., Holmdahl R.: Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. *J. Exp. Med.*, 2009; 206: 449–462
- [121] van Boekel M.A., Vossenaar E.R., van den Hoogen F.H., van Venrooij W.J.: Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res.*, 2002; 4: 87–93
- [122] van Venrooij W.J., Beers J.J., Pruijn G.J.: Anti-CCP antibody, a marker for the early detection of rheumatoid arthritis. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2008; 1143: 268–285
- [123] van Venrooij W.J., Zendman A.J., Pruijn G.J.: Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis. *Autoimm. Rev.*, 2006; 6: 37–41
- [124] van Vollenhoven R.F.: Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art. 2009. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2009; 5: 531–541
- [125] Villeneuve E., Emery P.: Rheumatoid arthritis: what has changed? *Skeletal Radiol.*, 2009; 38: 109–112
- [126] Vliet Vlieland T.P., Pattison D.: Non-drug therapies in early rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2009; 23: 103–116
- [127] Vossenaar E.R., Boekel M.A., Venrooij W.J., Merino J., Merino R., Joosten L.A.: Absence of citrulline-specific autoantibodies in animal models of autoimmunity. *Arthritis Rheum.*, 2004; 50: 2370–2372
- [128] Vries R.R., Huizinga T.W., Toes R.E.: Redefining the HLA and RA association: to be or not to be anti-CCP positive. *J. Autoimmun.*, 2005; 25(Suppl.): 21–25
- [129] Wang L.F., Lin J.Y., Hsieh K.H., Lin R.H.: Epicutaneous exposure of protein antigen induces a predominant Th2-like response with high IgE production in mice. *J. Immunol.*, 1996; 156: 4079–4082
- [130] Wang L.F., Wu J.T., Sun C.C.: Local but not systemic administration of IFN- $\gamma$  during the sensitization phase of protein antigen immunization suppress Th2 development in a murine model of atopic dermatitis. *Cytokine*, 2002; 19:147–152
- [131] Weiner H.L.: Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. *J. Clin. Invest.*, 2000; 106: 935–937
- [132] Weiner H.L.: Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF- $\beta$ -secreting regulatory cells. *Microbes Infect.*, 2001; 3: 947–954
- [133] Well H.: Studies on the chemistry of anaphylaxis. III. Experiments with isolated proteins, especially those of hen's egg. *J. Infect. Dis.*, 1911; 9: 147–151
- [134] Weyand C.M., Goronzy J.J.: Pathomechanisms in rheumatoid arthritis – time for a string theory? *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 869–871
- [135] Wing K., Sakaguchi S.: Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.*, 2010; 11: 7–13
- [136] Young A., Koduri G.: Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2007; 21: 907–927
- [137] Zająk K., Stochmal E., Szczepanik M.: Epicutaneous immunization with collagen induced TCR $\alpha\beta$ +CD4+CD8+ regulatory T cells which suppress collagen induced arthritis (CIA). *Centr. Eur. J. Immunol.*, 2008; 33: 2.83
- [138] Zająk K., Stochmal E., Szczepanik M.: Epicutaneous immunization with collagen protects from the development of collagen induced arthritis (CIA). *Centr. Eur. J. Immunol.* 2008; 33: 2.82
- [139] Zhang X., Izikson L., Liu L., Weiner H.L.: Activation of CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J. Immunol.*, 2001; 167: 4245–4253
- [140] Zhu P., Li X.Y., Wang H.K., Jia J.F., Zheng Z.H., Ding J., Fan C.M.: Oral administration of type-II collagen peptide 250-270 suppresses specific cellular and humoral immune response in collagen-induced arthritis. *Clin. Immunol.*, 2007; 122: 75–84
- [141] Zrour S.H., Boumiza R., Sakly N., Mannai R., Korbaa W., Younes M., Bejia I., Touzi M., Bergaoui N.: The impact of pregnancy on rheumatoid arthritis outcome: The role of maternofetal HLA class II disparity. *Joint Bone Spine*, 2010; 77: 36–40
- [142] Zyllicz M., Bocian K., Korczak-Kowalska G.: Regulatory cells: their development, mechanisms and effects of action, and their potential use in transplantation. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2005; 59: 160–171

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.