

## Białka szoku cieplnego w przewlekłej chorobie nerek – obrońcy czy agresorzy ?

Kinga MUSIAŁ

Danuta ZWOLIŃSKA

Katedra i Klinika Nefrologii Pediatrycznej Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu  
Kierownik Kliniki:  
Prof. dr hab. n. med. Danuta Zwolińska

### Słowa kluczowe:

- białka szoku cieplnego
- hemodializa
- dializa otrzewnowa
- miażdżyca
- układ immunologiczny

### Key words:

- heat shock proteins
- hemodialysis
- peritoneal dialysis
- atherosclerosis
- immune system

Białka szoku cieplnego (heat shock proteins - HSP) to różnorodna grupa protein cechująca się wysoką międzygatunkową homologią strukturalną. Ich podstawową rolą jako białek opiekuńczych jest wewnątrzkomórkowa ochrona struktury przestrzennej protein przed działaniem czynników stresowych. Pozakomórkowe HSP, uwalniane w wyniku uszkodzenia lub nekrozy, odgrywają rolę w odpowiedzi immunologicznej organizmu, uczestniczą też w wielu patologicznych procesach. Celem pracy jest omówienie aktualnego stanu wiedzy na temat roli HSP w przewlekłej chorobie nerek (PChN) w świetle trzech różnych aspektów. Pierwszy, o zasadniczym znaczeniu klinicznym, to charakterystyczny dla PChN przyspieszony rozwój miażdżycy, będącej główną przyczyną zgonów w tej populacji. Drugi to związek HSP z progresją niewydolności nerek i możliwościami jej spowolnienia. Ostatnie omawiane zagadnienie to wpływ dializoterapii, potencjalnie modyfikowalnego czynnika stresogennego, na HSP i próba oceny tych białek jako wskaźników biogodności.

(NEFROL. DIAL. POL. 2010, 14, 206-210)

## Heat shock proteins in chronic kidney disease – protectors or aggressors ?

Heat shock proteins (HSP) form a heterogenous, evolutionarily conserved group with high sequence homology. They mainly act as intracellular chaperones, protecting protein structure and folding under stress conditions. Extracellular HSP, released in the course of damage or necrosis, play a pivotal role in innate and adaptive immune responses. They also take part in many pathological processes. The aim of this review is to update on recent developments in the field of HSP in chronic kidney disease (CKD), in regard to three different aspects. First, of clinical importance, is the acceleration of atherosclerosis, characteristic for CKD and being the major cause of mortality in this population. Second is the relation of HSP to the progression of renal failure and possibilities to slow this process. The last area is that of the impact of dialysis, being a potentially modifiable stressor, on HSP and the attempt to assess the value of these proteins as biocompatibility markers.

(NEPHROL. DIAL. POL. 2010, 14, 206-210)

### Wstęp

Białka szoku cieplnego (*heat shock proteins* – HSP) to heterogenna grupa protein o wysokiej międzygatunkowej homologii strukturalnej [13,18]. Odkryte przypadkowo w latach 60-tych podczas badań nad *Drosophila melanogaster* [53], były przez długi czas uważane za cząsteczki o stricte ochronnej roli, stąd ich nazwa białka opiekuńcze (chaperones) [17]. Dzisiejszy stan wiedzy pozwolił na wyodrębnienie poszczególnych podgrup HSP i na poznanie złożoności ich funkcji, wynikającej z lokalizacji poszczególnych białek, a także z ich umiejętności oddziaływania z szeroką gamą tzw. „białek klientów” w odpowiedzi na różnorodne stresogenne bodźce [20,69]. Obecnie uważa się, że oprócz podstawowej roli tych protein w procesie tworzenia i ochrony struktury przestrzennej wszystkich białek, wystę-

pujących zarówno u Prokaryota, jak i w organizmach eukariotycznych, ich aktywność ma wpływ na tak zróżnicowane procesy jak stan zapalny, apoptoza, nowotworzenie, odpowiedź immunologiczna, a nawet struktura genomu [9,20,37].

### Klasyfikacja HSP

Podziału w obrębie grup HSP dokonano na podstawie ich mas cząsteczkowych, których wartości (wyrażone w kDa) stanowią integralną część nazw poszczególnych białek. Wybrane podgrupy obejmują duże (Hsp100, Hsp90), średnie (Hsp70, Hsp60, Hsp40) i małe HSP (Hsp27, Hsp10). Głównymi czynnikami warunkującymi ekspresję genów dla HSP są zarówno endo-, jak i egzogenne szeroko pojęte szkodliwe czynniki, określane ogólnie mianem stresorów. Zaliczane są do nich czynniki fizyczne (tem-

### Adres do korespondencji:

Dr n. med. Kinga Musiał  
Katedra i Klinika Nefrologii Pediatrycznej  
50-369 Wrocław, ul. M. Curie-Skłodowskiej 50/52  
Tel.: 71 770 30 32  
e-mail: kinga\_musial@hotmail.com

peratura, promieniowanie), chemiczne (trucizny, metale ciężkie, alkohole) i biologiczne (cytokiny, wolne rodniki tlenowe, zakażenia).

Różnorodność w obrębie klasycznych białek opiekuńczych, do których obecnie zalicza się rodziny Hsp60, Hsp70 i Hsp90, wskazuje na ich rolę zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych. HSP mogą bowiem występować jednocześnie jako izomery indukowane stresem (Hsp60, Hsc70, Hsp90a) oraz jako formy natywne, o stałej, niezależnej od stresu, ekspresji (Hsp70, Hsp90b).

### Białka opiekuńcze

Fizjologicznie, podstawową rolą białek opiekuńczych jest nadzór nad formowaniem struktury przestrzennej wszystkich syntetyzowanych białek i zapobieganie ich nieprawidłowemu „składaniu” [17]. W sytuacjach stresowych HSP działają protekcyjnie i zapobiegają agregacji białek [14]. Uczestniczą także w naprawie zdenaturowanych cząsteczek, a w przypadku nieodwracalnych uszkodzeń pomagają je eliminować na drodze endocytozy.

Białka szoku cieplnego wywierają też bezpośredni wpływ na proces apoptozy. Stres doprowadza do jednoczesnego wyzolenia dwóch typów reakcji: umożliwiających przeżycie komórki i prowadzących do jej śmierci [14]. Szlak „przeżycia” aktywują kinazy ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), natomiast szlak „śmierci” – kinaza JNK (*c-Jun NH2-terminal kinase*), indukująca uwalnianie cytochromu c z mitochondriów i aktywację kaspaz [14]. Reakcjom tym towarzyszy wzmożona wewnątrzkomórkowa ekspresja HSP, które z kolei modulują aktywność enzymów odpowiedzialnych za zaprogramowaną śmierć komórki. Regulacja ta może odbywać się na wielu poziomach i obejmować supresję JNK, łączenie białek szoku cieplnego z cytochromem c, prokaspazą 9, prokaspazą 3 albo Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor-1*) – czynnikiem aktywującym kaspazę 9 [26,51].

Powyższe działania dotyczą form wewnątrzkomórkowych HSP, które uważa się dziś za białka o działaniu ochronnym. Sytuacja ulega diametralnej zmianie, gdy HSP pojawiają się w przestrzeni pozakomórkowej na skutek aktywnego transportu lub rozpadu komórki w wyniku nekrozy, zakażenia albo transformacji nowotworowej [9,20].

### HSP a układ immunologiczny

Aktywność pozakomórkowych białek szoku cieplnego stanowi ważny element odpowiedzi immunologicznej.

HSP uczestniczą pośrednio w swojej odpowiedzi immunologicznej jako fizjologiczne adiuwanty. Tworzą z białkami kompleksy, które są przetwarzane przez komórki prezentujące antygen (APC – *antigen presenting cells*) i prezentowane MHC I (*major histocompatibility complex class I*), co prowadzi do aktywacji limfocytów cytotoksycznych [5,57].

Jednak najbardziej spektakularnym przykładem wpływu HSP na układ odpornościowy jest ich działanie jako sygnałów ostrzegawczych, informujących o uszkodzeniu komórki/tkanki/narządu. Zaproponowana przez Matzinger [36] „teoria niebezpie-

czeństwa” (*danger theory*) zakłada, że sygnałem stymulującym odpowiedź immunologiczną nie jest patogen, ale niespecyficzne, wywołane przez niego zniszczenia. Wg Matzinger czynnikami pełniącymi rolę sygnałów ostrzegawczych są cząsteczki o konserwatywnej budowie, które fizjologicznie występują wewnątrzkomórkowo, a ich pojawienie się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej prowadzi do uszkodzenia komórki wskutek stresu, zakażenia, lub nekrozy. Białka szoku cieplnego spełniają wszystkie powyższe kryteria [38]. Ich obecność w przestrzeni zewnątrzkomórkowej jest sygnałem dla APC, które wiążą się z HSP poprzez swoisty receptor na swojej powierzchni. Prowadzi to do produkcji cytokin takich jak: IL-1, IL-5, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  [30]. HSP działają także stymulująco na monocyty i makrofagi, efektem czego jest również synteza cytokin: IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-15 i TNF- $\alpha$  [2,15]. Pod wpływem HSP wzrasta również ekspresja E-selektyny, ICAM-1 i VCAM-1 na komórkach śródbłonna, produkowane są także IL-6 i TNF- $\alpha$  [38]. Natomiast w sytuacji, gdy dochodzi do subletalnego uszkodzenia komórki, transkrypcja i sekrecja TNF- $\alpha$  oraz IL-1 zostają zahamowane. Ta supresja syntezy cytokin pozwala na adaptację komórki do niekorzystnych warunków środowiskowych i warunkuje jej przeżycie [30].

Wg innej teorii dotyczącej patomechanizmu odpowiedzi immunologicznej [19], identyfikacja patogenów odbywa się za pomocą wzorcowych receptorów PRR (*pattern recognition receptors*) na APC. Należy do nich m.in. grupa receptorów Toll (TLR – *Toll-like receptors*), które rozpoznają pewne molekularne wzorce patogenów PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*). HSP posiadają zdolność wiązania niektórych bakteryjnych PAMP i ich prezentacji za pośrednictwem receptorów TLR2 i TLR4, wpływając tym samym na zdolność rozróżniania antygenów „własnych” od „obcych” [6,42, 59].

Kolejnym zagadnieniem opisującym potencjalny związek HSP z układem immunologicznym jest zjawisko mimikry molekularnej [25,44]. Wysoka homologia strukturalna pomiędzy HSP należącymi do różnych gatunków, w tym bakterii, może prowadzić do wytworzenia tolerancji immunologicznej, ale jest też przyczyną wytwarzania przeciwciał przeciw własnym HSP [14,64,44].

Odkrycie krążących form HSP i ich przeciwciał pod koniec lat 90-tych otworzyło nowy rozdział w badaniach nad wieloma zaburzeniami immunologicznymi. Pozwoliło również na zdefiniowanie mechanizmów autoimmunologicznych w schorzeniach, w których reakcja z autoagresji jako potencjalny patomechanizm, nie była rozpatrywana.

### HSP w przewlekłej chorobie nerek

Przewlekła choroba nerek (PChN), ze względu na złożoność zaburzeń składających się na całość obrazu i mnogość towarzyszących im powikłań, wydaje się być idealnym przykładem długotrwałej reakcji komórek i narządów na stres pod postacią toksyn mocznicowych, czynników prozapalnych, wolnych rodników tlenowych, nasilonej apoptozy i zwiększonej podatności na infekcje, a w końcowym etapie – dializoterapii *per se* [22,23,43]. Wszystkie powyższe czynniki mogą odpowiadać za przyspie-

szony rozwój miażdżycy i powikłań sercowo-naczyniowych, będących główną przyczyną zgonów w populacji PChN, ze szczególnym uwzględnieniem chorych dializowanych [10,58].

Dlatego rozważania na temat roli HSP w PChN powinny przebiegać wielotorowo.

Z klinicznego punktu widzenia zasadniczym aspektem jest wpływ HSP na rozwój zmian miażdżycowych, odpowiedzialnych za wysoką śmiertelność w tej populacji. Interesującym poznawczo zagadnieniem jest odpowiedź na pytanie, czy HSP, w sytuacji nieodwracalnego uszkodzenia nerek w przebiegu PChN, mają wpływ na spowolnienie progresji niewydolności, czy też ją przyspieszają. Ostatni, terapeutyczny aspekt rozważań, to wpływ dializoterapii, będącej potencjalnie modyfikowalnym stresorem, na HSP i pytanie o zastosowanie białek szoku cieplnego jako wskaźników biozgodności materiałów używanych w leczeniu nerkozastępczym.

### Rola HSP w patogenezie miażdżycy

Po raz pierwszy obecność Hsp60, Hsp70 i przeciwciał przeciwko nim w surowicach zdrowych ludzi wykrył Pockley [45,48]. Podwyższone stężenia Hsp60 i anty-Hsp60 opisywano również u chorych z chorobą niedokrwinną serca i nadciśnieniem tętniczym [46,49]. Związek krążących Hsp70 i anty-Hsp70 z chorobą niedokrwinną serca wydaje się mniej oczywisty ze względu na rozbieżność wyników uzyskiwanych przez różnych autorów. Przekrojowe badania populacyjne wykazywały ochronny [11,47,68,] albo szkodliwy [67] wpływ podwyższonych stężeń Hsp70 na rozwój, przebieg i rokowanie w ostrych zespołach wieńcowych. Jednocześnie podkreślano zależność pomiędzy HSP a klasycznymi czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Hsp60 korelowało ze stężeniami całkowitego cholesterolu i LDL-cholesterolu [56] oraz z IMT (*intima-media thickness*) [49], podczas gdy Hsp70 było niezależne od parametrów gospodarki lipidowej. Żadne z białek nie korelowało również z wartościami CRP. Powyższe wyniki skłoniły badaczy do poszukiwań związków między zmianami miażdżycowymi a aktywnością HSP, uznawanych obecnie za istotne czynniki ryzyka rozwoju aterosklerozy [11,47,66].

Aterogeneza jest złożonym procesem, na który wpływ ma szereg powiązanych ze sobą czynników, takich jak dysfunkcja śródbłonna, stan zapalny, migracja komórek immunokompetentnych, proliferacja i przebudowa komórek mięśni gładkich oraz procesy autoimmunologiczne. Bezpośrednim dowodem udziału HSP w powyższych procesach było wykazanie obecności tych białek w blaszkach miażdżycowych. Wzmożona ekspresja Hsp60 cechuje komórki endotelium i mięśni gładkich oraz monocyty ludzkich blaszek miażdżycowych [65]. Obecność Hsp70 stwierdzano w badaniach *in vitro* na śródbłonnku, makrofagach i mięśniach gładkich wchodzących w skład blaszek miażdżycowych myszy [21]. Jednak zlokalizowanie HSP nie dawało odpowiedzi na pytanie, jaka rolę odgrywają one w tworzeniu tych struktur.

HSP, poprzez wspomnianą wcześniej zdolność do stymulacji komórek i produkcji

cytokin, wpływają na rozwój procesu zapalnego. O ile pro-zapalne działanie Hsp60 nie budzi wątpliwości, to w przypadku Hsp70, ze względu na sekrecję cytokin, zarówno o działaniu prozapalnym (IL-6, TNF- $\alpha$ ), jak i przeciwzapalnym (IL-10), trudno o jednoznaczne określenie roli tego białka w rozwoju miażdżycy.

Kluczowym czynnikiem regulującym aktywność krążących HSP mogą okazać się przeciwciała przeciwko nim skierowane. Ich obecność jest spójna z koncepcją dotyczącą reakcji autoimmunologicznych, współodpowiedzialnych za tworzenie zmian miażdżycowych, z uwzględnieniem roli przeciwciał przeciw własnym i bakteryjnym HSP [63].

W etiopatogenezie miażdżycy zasadniczą rolę odgrywa infekcja, doprowadzająca do uwalniania HSP ze zmienionych zapalnie komórek, skutkiem czego jest wzrost ekspresji mediatorów zapalenia, m. in. cytokin czy cząsteczek adhezyjnych [29,54]. Czynniki wywołujące przewlekłe zapalenie w obrębie ścian naczyń są najczęściej bakterie. Odpowiedź organizmu na stymulację antygenem może być w takim wypadku zaburzona ze względu na wspomniane wcześniej podobieństwo między ludzkimi a bakteryjnymi HSP. Mimikra epitopów bakteryjnych i ludzkich HSP doprowadza do wytwarzania przeciwciał, pierwotnie skierowanych przeciw bakteryjnym HSP, ale reagujących krzyżowo z ludzkimi HSP za pośrednictwem receptorów Toll (TLR). Klasyycznym przykładem są wyniki badań *in vitro*, które udowodniły, że chlamydialne Hsp60, w takim samym stopniu jak ludzkie, indukują zmiany w obrębie śródbłonka, mięśni gładkich naczyń i makrofagów, zwiększając produkcję prozapalnej IL-6 oraz ekspresję cząstek adhezyjnych [24]. Ponadto anty-HSP, poprzez połączenie z HSP obecnymi na komórkach endotelium lub mięśni gładkich blaszek miażdżycowych i aktywację procesu zapalnego, mogą doprowadzać do uszkodzeń śródbłonka i progresji zmian. Takie działanie udowodniono w badaniach eksperymentalnych na myszach w odniesieniu do anty-Hsp60 [12]. Jednak u ludzi niskie stężenia anty-Hsp60 i anty-Hsp70 występowały w przypadku zwiększonego ryzyka choroby niedokrwiennej serca, a najwyższe wartości tych przeciwciał wykazano w zdrowej populacji [11,67]. Jednocześnie stwierdzono, że u osób z hiperlipidemią dochodzi do wzrostu miana przeciwciał anty-Hsp70 przy niezmiennych wartościach miana anty-Hsp60 [16]. Te rozbieżności mogą sugerować, że ostateczny efekt działania HSP jest wynikiem interakcji tych białek a skierowanymi przeciwko nim przeciwciałami.

Istnieją przypuszczenia, że pomiędzy HSP a anty-HSP wytwarza się rodzaj równowagi i ujemnego sprzężenia zwrotnego. W wyniku zaburzonej odpowiedzi immunologicznej, obecność podwyższonych stężeń HSP prowadzi do produkcji przeciwciał, a te z kolei, prawdopodobnie poprzez tworzenie kompleksów HSP - anty-HSP, eliminują nadmiar form krążących. Istnienie takich zależności udowodniono w przypadku par Hsp60 - anty-Hsp60 i Hsp70 - anty-Hsp70 [11,67].

Brak jest natomiast danych na temat

przeciwciał przeciwko Hsp90, które jest nowym rozgrywanym w drużynie HSP, o potencjalnym wpływie na rozwój zmian miażdżycowych. Mogą o tym świadczyć doniesienia sugerujące wpływ Hsp90 jako antygeny stymulującego odpowiedź immunologiczną na rozwój zmian w obrębie blaszek miażdżycowych [8,32]. W badaniach *in vitro* udowodniono, że Hsp90 stymuluje zarówno produkcję IFN- $\gamma$  jak i IL-4, czyli aktywuje jednocześnie limfocyty Th1 i Th2 [8]. Zaobserwowano również, że hamowanie aktywności Hsp90 w obrębie blaszek miażdżycowych ograniczało proces zapalny [32]. Jak dotąd, Hsp90 okazało się także jedynym HSP o udowodnionym bezpośrednim związku ze stresem oksydacyjnym [28].

#### **HSP a progresja PChN w okresie predializacyjnym**

Badania *in vitro* z połowy lat 90-tych pokazało, że w ludzkich komórkach neuroblastoma, poddanych działaniu mocznika w stężeniach 40-200 mg/dl, dochodzi po 30 minutach do indukcji ekspresji Hsp72, narastającej aż do 10 godzin, a następnie stopniowo obniżającej się i zanikającej po 48 godzinach [31]. Równolegle badano wpływ kreatyniny w stężeniach 0,5-14 mg/dl, nie uzyskując odpowiedzi ze strony Hsp72. Doświadczenie to potwierdziło selektywny wpływ wybranych toksyn mocznicowych na reakcję stresową, ale jednocześnie zasugerowało, że wzrost ekspresji Hsp72 pełni rolę ochronną, zapobiega apoptozie i umożliwia adaptację komórek do niekorzystnych warunków. Jednak czas trwania eksperymentu, mierzony w godzinach, nie oddaje w pełni warunków charakterystycznych dla PChN, można więc jedynie pośrednio wnioskować na temat ewentualnej reakcji adaptacyjnej na stres w przebiegu PChN. Analogicznie, udokumentowana rola ochronna i anty-apoptotyczna Hsp70 w ostrym niedokrwieniu nerek i ich reperfuzji oddaje dynamikę zmian w krótkiej perspektywie czasowej, nie odpowiada jednak na pytanie jak zachowuje się HSP w warunkach przewlekłego wieloczynnikowego stresu, jakim jest PChN [60].

Jedynym jak dotąd eksperymentem dotyczącym wpływu HSP na przewlekłe uszkodzenie nerek są niedawne badania Mao i wsp. przeprowadzone na szczurach z nefropatią zaporową [33]. Autorzy wykazali, że doustna podaż czynnika selektywnie pobudzającego Hsp72 hamowała proliferację i apoptozę w obrębie komórek cewek nerkowych, a także zmniejszała odkładanie fibroblastów i kolagenu w obrębie śródmiaższu nerek, spowalniając proces włóknienia.

Z kolei o niekorzystnym wpływie HSP na wydolność nerek mogą świadczyć wyniki badań u myszy z gwałtownie postępującym kłębuszkowym zapaleniem nerek, u których po iniekcji Hsp60 obserwowano dramatyczne pogorszenie funkcji nerek, z martwicą kłębuszków i anurią włącznie [27]. Brak jest natomiast doniesień dotyczących roli Hsp90 w przewlekłej chorobie nerek.

Badania HSP u ludzi z PChN w okresie predializacyjnym ograniczają się do dwóch doniesień z polskich ośrodków. Potwierdzona w pierwszym z nich obniżona ekspresja Hsp72 w monocytach krwi krążącej dorosłych pacjentów może świadczyć o wyczerpaniu mechanizmów adaptacyjnych i znaj-

duje odzwierciedlenie m.in. w nasilonej apoptozie i upośledzonej odporności, charakterystycznej dla PChN [35]. Niezmienione stężenia Hsp70 w surowicach dzieci z PChN mogłyby przemawiać za mniejszym nasileniem powyższych zmian w populacji pediatrycznej, ale towarzyszące im obniżone stężenia anty-Hsp70, uważane za niekorzystny czynnik rokowniczy w przebiegu powikłań sercowo-naczyniowych, potwierdzają zwiększone ryzyko rozwoju miażdżycy w tej grupie chorych [41]. W tym samym badaniu stwierdzono również obniżone stężenia Hsp60 i podwyższone wartości miana przeciwciał anty-Hsp60 w surowicy. Chociaż w świetle uprzednio cytowanych badań niskie stężenia Hsp60 wydają się korzystne, to wyniki badań własnych nie potwierdzają tej obserwacji. Niższe wartości stężeń Hsp60 są prawdopodobnie skutkiem przesunięcia równowagi w układzie antygen – przeciwciało na korzyść anty-Hsp60, o udowodnionym niekorzystnym wpływie na rozwój zmian miażdżycowych. Obserwowany natomiast w tej grupie chorych wzrost stężenia Hsp90a może być wskaźnikiem nasilonego stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego, które towarzyszą PChN i są czynnikami sprzyjającymi rozwojowi miażdżycy. Stwierdzone u dzieci z PChN korelacje pomiędzy stężeniami Hsp90a, anty-Hsp60 i sE-selektyny, będącej markerem aktywacji śródbłonka, przemawiają również za patogenną rolą HSP w procesie atrogenyzy u chorych na PChN [41].

#### **Rola HSP w dializoterapii**

W przeciwieństwie do nielicznych danych na temat HSP u chorych na przewlekłą chorobę nerek leczonych zachowawczo, piśmiennictwo dotyczące pacjentów przewlekle dializowanych, zarówno hemodializą jak i dializą otrzewnową, jest bogatsze. W obu przypadkach badacze kładą główny nacisk na rolę HSP jako potencjalnych markerów biogodności używanych materiałów. Należy jednak pamiętać, że chorzy dializowani to grupa o większym ryzyku zapadalności na choroby naczyniowo-sercowe niż pacjenci z mniej zaawansowaną PChN. Powstaje pytanie, czy te różnice znajdują odzwierciedlenie w badaniach nad HSP.

#### **HSP a hemodializa (HD)**

Badania nad białkami szoku cieplnego w grupie hemodializowanych chorych dotyczą głównie Hsp72. Wykazano, że u tych pacjentów ekspresja mRNA Hsp72 na monocytach jest istotnie niższa niż w grupie kontrolnej [35]. W przypadku makrofagów, nie stwierdzono natomiast analogicznych różnic w podstawowym poziomie ekspresji, ale odpowiedź komórek na bodziec w postaci wysokiej temperatury (47°C przez 40 minut) była upośledzona i towarzyszyło jej nasilenie apoptozy [52]. Co ciekawe, inkubacja makrofagów z grupy kontrolnej z mocznikiem w stężeniu 150 mg/dl przy jednoczesnym stresie termalnym (47°C przez 40 minut) wywoływała większy wzrost ekspresji Hsp72 niż samo działanie mocznika. Potwierdzały to późniejsze wyniki wcześniejszych badań eksperymentalnych, w których obserwowano indukcję Hsp72 w komórkach *neuroblastoma* pod wpływem wysokich stężeń mocznika [31]. Wyniki te

sugerują jednocześnie, że odpowiedź na czynniki stresowe, choć zaburzona, nie jest w PChN całkowicie zniesiona.

W badaniach u dzieci i młodych dorosłych nie wykazano różnic w stężeniach krążących Hsp70 i anti-Hsp70 pomiędzy leczonymi przewlekle hemodializami a grupą kontrolną, co może świadczyć o braku negatywnego wpływu dializoterapii na funkcję Hsp70 w populacji pediatrycznej [39,40]. Stwierdzono natomiast obniżone wartości Hsp60 w HD, chociaż, podobnie jak w przypadku Hsp70, nie różniły się one od wartości obserwowanych u pacjentów w okresie predializacyjnym. Jedynymi wyjątkami okazały się Hsp90a i anti-Hsp60, których stężenia w przebiegu HD były wyższe zarówno w porównaniu z grupą kontrolną, jak i z chorymi na PChN leczonymi zachowawczo. W przypadku Hsp90a może to mieć związek z nasilającym się w przebiegu dializoterapii stresem oksydacyjnym i przewlekłym stanem zapalnym. Natomiast podwyższone wartości anti-Hsp60 świadczą o aktywacji odpowiedzi immunologicznej, nasilającej się wraz z rozpoczęciem dializoterapii. Mogą też odpowiadać za supresję za czym przemawia obecność ujemnej korelacji między Hsp60 a anti-Hsp60 w tej grupie.

Dwa doniesienia oceniające wpływ pojedynczego zabiegu hemodializy z użyciem błon polisulfonowych wykazały wzrost ekspresji Hsp70 [50], zwiększone stężenie krążącego Hsp60 oraz spadek stężeń anti-Hsp60 i anti-Hsp70 po sesji HD [40]. Aktywacja Hsp70 podczas zabiegu mogłaby sugerować reakcję na stres wywołany kontaktem z błoną dializacyjną. Wzrost Hsp60, będący prawdopodobnie wynikiem uwalniania białka z pobudzonych lub uszkodzonych wskutek kontaktu z dializatorem krążących komórek krwi, wydaje się potwierdzać tę tezę. Przyczyny obniżenia miana przeciwciał przeciw HSP są wieloczynnikowe. Wśród potencjalnych czynników wymienić należy: adsorpcję do powierzchni dializatora lub tworzenie kompleksów HSP-anty-HSP. Kliniczna interpretacja wobec braku innych badań wydaje się przedwczesna, ponieważ obniżeniu aktywności autoimmunologicznej towarzyszy zmniejszenie, opisywanego wcześniej, ochronnego wpływu tych przeciwciał na układ krążenia. Z drugiej strony stężenia całkowitego cholesterolu i HDL-cholesterolu okazały się predyktorami wartości stężeń anti-Hsp60 zarówno przed, jak i po zabiegu HD, sugerując związek tego przeciwciała z rozwojem miażdżycy w tej grupie chorych [40]. Zdefiniowanie roli Hsp60 i anti-Hsp60 jest w związku z tym dyskusyjne nie tylko ze względu na kwestię wcześniej omawianej roli interakcji HSP-anty-HSP, ale również z uwagi na ambiwalentność funkcji obu białek [1]. Powyższe badania wskazują jednak na nasilenie zaburzeń w obrębie HSP, mogących mieć wpływ na aterogenezę i obserwowanych uprzednio w okresie predializacyjnym, pod wpływem hemodializoterapii.

#### HSP a dializa otrzewnowa

Badania dotyczące roli HSP w dializie otrzewnowej dotyczą przede wszystkim wpływu płynu dializacyjnego, jako czynnika stresogennego, na funkcję otrzewnej. Potwierdzono indukcję ekspresji Hsp72 na ko-

mórkach mezotelium narażonych na działanie płynu dializacyjnego [3,4,55] i makrofażach wyizolowanych z dializatu po 4-godzinnej wymianie [34]. Udowodniono jednocześnie wrażliwość tego białka na skład zastosowanego roztworu, co mogłoby sugerować przydatność Hsp72 jako wskaźnika biologiczności płynów dializacyjnych [7,34].

Jedyne doniesienie o pozakomórkowych formach HSP dotyczy dzieci leczonych automatyczną dializą otrzewnową (APD) [41]. Wykazano w nim istotny spadek surowiczego stężenia Hsp60 i anti-Hsp70 oraz wzrost wartości Hsp90a i anti-Hsp60 w porównaniu z grupą kontrolną. W przypadku Hsp90a i anti-Hsp60 stwierdzono również znaczącą różnicę pomiędzy dziećmi dializowanymi a pacjentami w okresie predializacyjnym; w grupie APD stężenia były istotnie wyższe, co potwierdzałoby niekorzystny wpływ dializoterapii na nasilenie stresu oksydacyjnego i reakcji autoimmunologicznych. Jednak wobec braku podobnych różnic w odniesieniu do Hsp60 i anti-Hsp70 trudno o jednoznaczną ocenę wpływu APD na jakość reakcji stresowych w populacji dziecięcej.

Próba odpowiedzi na pytanie o istnienie różnic pomiędzy chorymi hemodializowanymi i dializowanymi otrzewnowo było badanie porównujące stężenia wybranych HSP u dzieci leczonych obiema metodami [39]. Nie zaobserwowano różnic w stężeniach Hsp60 i Hsp90a między badanymi grupami. Natomiast wartości anti-Hsp60 w populacji HD były znacząco wyższe niż u dzieci leczonych APD, co potwierdza wcześniej sugerowany negatywny wpływ hemodializ na odpowiedź stresową u dzieci. Chociaż wartości anti-Hsp70 u chorych HD były wyższe niż u dzieci APD, pozostawały jednak niezmiennymi w stosunku do grupy kontrolnej, trudno więc interpretować ten wynik w kategoriach negatywnego wpływu hemodializy. Być może brak zmian w mianie przeciwciał anti-Hsp70 był skutkiem supresji przez Hsp70, które podlega stymulacji w przebiegu HD [50]. Powyższe badanie uwiarydliwia złożoność odpowiedzi poszczególnych HSP na stresowy bodziec w postaci dializoterapii, ze wskazaniem na anti-HSP jako czynniki różnicujące między obiema metodami i potencjalne markery biologiczności.

Pomimo większego nasilenia zmian u chorych hemodializowanych nie można jednak uznać HD za jednoznacznie szkodliwą, z punktu widzenia narażenia na reakcje stresowe, metodę w porównaniu z dializą otrzewnową.

#### Podsumowanie

Zagadnienia dotyczące białek szoku cieplnego to szeroka i nie do końca zbadana dziedzina. Pomimo dużej wiedzy na temat wewnątrzkomórkowego funkcjonowania HSP w warunkach fizjologicznych, istnieje dużo kontrowersji odnośnie ich wpływu na takie procesy jak odpowiedź immunologiczna, rozwój miażdżycy czy progresja niewydolności nerek. Brak jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy krążące HSP aktywują i chronią organizm, działając destrukcyjnie, czy też są jedynie markerami już dokonanego uszkodzenia komórek, skłania do poszukiwania nowych metod identyfikacji i wizualizacji tych białek oraz kompleksowej

ich oceny in vivo w sieci zależności wraz z innymi czynnikami wpływającymi na ich funkcję [61,62].

#### Piśmiennictwo

1. Alard J.E., Dweymes M., Youinou P., Jamin C.: Modulation of endothelial cell damages by anti-Hsp60 autoantibodies in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 2007, 6, 438.
2. Anderson K.A., Srivastava P.K.: Heat, heat shock, heat shock proteins and death: a central link in innate and adaptive immune responses. *Immunol. Lett.* 2000, 74, 35.
3. Arbeiter K., Bidman B., Endemann M. et al.: Peritoneal dialysate fluid composition determines heat shock protein expression patterns in human mesothelial cells. *Kidney Int.* 2001, 60, 1930.
4. Arbeiter K., Bidman B., Endemann M. et al.: Induction of mesothelial HSP-72 upon in vivo exposure to peritoneal dialysis fluid. *Perit. Dial. Int.* 2003, 23, 499.
5. Arnold-Schild D., Hanau D., Spehner D. et al.: Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 1999, 162, 3757.
6. Asea A., Rehli M., Kabingu E. et al.: Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role for toll-like receptor (TLR)2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 15028.
7. Bender T.O., Witowski J., Aufricht C. et al.: Biocompatibility of a bicarbonate-buffered amino acid-based solution for peritoneal dialysis. *Pediatr. Nephrol.* 2008, 23, 1537.
8. Businaro R., Profumo E., Tagliani A. et al.: Heat shock protein 90: a novel autoantigen in human carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009, 207, 74.
9. Calderwood S.K., Mambula S.S., Gray P.J. Jr.: Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2007, 1113, 28.
10. Cheung A.K., Sarnak M.J., Yan G. et al.: Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2000, 58, 353.
11. Dulin E., Garcia-Barreno P., Guisasaola M.C.: Extracellular heat shock protein 70 (HSPA1A) and classical vascular risk factors in a general population. *Cell Stress Chaperones*. 2010; DOI 10.1007/s12192-010-0201-2.
12. Foteinos G., Afzal A.R., Mandal K. et al.: Anti-heat shock protein 60 autoantibodies induce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via endothelial damage. *Circulation* 2005, 112, 1206.
13. Frydman J.: Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 2001, 70, 603.
14. Gabai V.L., Sherman M.Y.: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J. Appl. Physiol.* 2002, 92, 1743.
15. Gaston J.S.: Heat shock proteins and innate immunity. *Clin. Exp. Immunol.* 2002, 127, 1.
16. Guisasaola M.C., Dulin E., Almendral J., Garcia-Barreno P.: Reduction of heat shock protein antibody levels by statin therapy. *Lipids* 2009, 44, 317.
17. Hartl F.U., Hayer-Hartl M.: Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002, 295, 1852.
18. Henderson B.: Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. *Cell Biochem. Funct.* 2010, 28, 1.
19. Janeway C.A. Jr.: The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* 1992, 13, 11.
20. Joly A.L., Wettstein G., Mignot G. et al.: Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J. Innate Immun.* 2010, 2, 238.
21. Kanwar R.K., Kanwar J.R., Wang D. et al.: Temporal expression of heat shock proteins 60 and 70 at lesion-prone sites during atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, 21, 1991.
22. Kimmel P.L., Phillips T.M., Simmens S.J. et al.: Immunologic function and survival in hemodialysis

- patients. *Kidney Int.* 1998, 54, 236.
23. **Kitiyakara C., Gonin J., Massy Z., Wilcox C.S.:** Non-traditional cardiovascular disease risk factors in end-stage renal disease: oxidative stress and hyperhomocysteinemia. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2000, 9, 477.
  24. **Kol A., Bourcier T., Lichtman A.H., Libby P.:** Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 571.
  25. **Lamb D.J., El-Sankary W., Ferns G.A.:** Molecular mimicry in atherosclerosis: a role for heat shock proteins in immunisation. *Atherosclerosis* 2002, 167, 177.
  26. **Lang A., Benke D., Eitner F. et al.:** Heat shock protein 60 is released in immune-mediated glomerulonephritis and aggravates disease: in vivo evidence for an immunologic danger signal. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005, 16, 383.
  27. **Lang D., Dohle F., Terstesse M. et al.:** Down-regulation of monocyte apoptosis by phagocytosis of platelets: involvement of a caspase-9, caspase-3, and heat shock protein 70-dependent pathway. *J. Immunol.* 2002, 168, 6152.
  28. **Liao D.F., Jin Z.G., Baas A.S. et al.:** Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 189.
  29. **Libby P., Ridker P.M., Maseri A.:** Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2001, 105, 1135.
  30. **Li Z., Menoret A., Srivastava P.:** Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 2002, 14, 45.
  31. **Maddock A.L., Westenfelder C.:** Urea induces the heat shock response in human neuroblastoma cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1996, 7, 275.
  32. **Madrigal-Matute J., Lopez-Franco O., Blanco-Colio L.M. et al.:** Heat shock protein 90 inhibitors attenuate inflammatory responses in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 2010, DOI 10.1093/cvr/cvq046.
  33. **Mao H., Li Z., Zhou Y. et al.:** HSP72 attenuates renal tubular cell apoptosis and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2008, 295, F202.
  34. **Marzec Ł., Liberek T., Chmielewski M. et al.:** Expression of heat shock protein 72 in peritoneal leukocytes is induced by peritoneal dialysis. *Perit. Dial. Int.* 2007, 27, 288.
  35. **Marzec Ł., Zdrojewski Z., Liberek T. et al.:** Expression of Hsp72 protein in chronic kidney disease patients. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 2009, 43, 400.
  36. **Matzinger P.:** Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 1994, 12, 991.
  37. **Mittelman D., Wilson J.H.:** Stress, genomes, and evolution. *Cell Stress Chaperones* 2010, DOI: 10.1007/s12192-010-0205-y.
  38. **Moseley P.:** Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology* 2000, 48, 299.
  39. **Musiał K., Szczepańska M., Szprynger K., Zwolińska D.:** The impact of dialysis modality on serum heat shock proteins in children and young adults with chronic kidney disease. *Kidney Blood Press. Res.* 2009, 32, 366.
  40. **Musiał K., Szprynger K., Szczepańska M., Zwolińska D.:** Heat shock proteins in children and young adults on chronic hemodialysis. *Pediatr. Nephrol.* 2009, 24, 2029.
  41. **Musiał K., Szprynger K., Szczepańska M., Zwolińska D.:** The heat shock protein profile in children with chronic kidney disease. *Perit. Dial. Int.* 2010, 30, 227.
  42. **Osterloh A., Kalinke U., Weiss S. et al.:** Synergistic and differential modulation of immune responses by Hsp60 and lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 20847.
  43. **Papagianni A., Kokolina E., Kalovoulos M. et al.:** Carotid atherosclerosis is associated with inflammation and endothelial cell adhesion molecules in chronic haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003, 18, 113.
  44. **Perschinka H., Mayr M., Millonig G. et al.:** Cross-reactive B-cell epitopes of microbial and human heat shock protein 60/65 in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23, 1060.
  45. **Pockley A.G., Bulmer J., Hanks B.M., Wright B.H.:** Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. *Cell Stress Chaperones.* 1999, 4, 29.
  46. **Pockley A.G., de Faire U., Kiessling R. et al.:** Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension. *J. Hypertens.* 2000, 20, 1815.
  47. **Pockley A.G., Georgiades A., Thulin T. et al.:** Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension* 2003, 42, 235.
  48. **Pockley A.G., Shepherd J., Corton J.M.:** Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *J. Immunol. Invest.* 1998, 27, 367.
  49. **Pockley A.G., Wu R., Lemme C. et al.:** Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension* 2000, 36, 303.
  50. **Raj D.S., Boivin M.A., Dominic E.A. et al.:** Haemodialysis induces mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 2007, 37, 971.
  51. **Ravagnan L., Gurbuxani S., Santos A. et al.:** Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature Cell Biol.* 2001, 3, 839.
  52. **Reuter S., Bangen P., Edemir B. et al.:** The HSP72 stress response of monocytes from patients on haemodialysis is impaired. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009, 24, 2838.
  53. **Ritossa F.M.:** A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila melanogaster*. *Experimenta* 1962, 18, 571.
  54. **Ross R.:** Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999, 340, 115.
  55. **Ruffingshofer D., Endemann M., Arbeiter K. et al.:** Induction of heat shock protein 72 in mesothelial cells exposed to peritoneal dialysis effluent. *Perit. Dial. Int.* 2003, 23, 74.
  56. **Shamaei-Tousi A., Halcox J.P., Henderson B.:** Stressing the obvious? Cell stress and cell stress proteins in cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 2007, 74, 19.
  57. **Srivastava P.:** Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2002, 20, 395.
  58. **Stenvinkel P., Heimbürger O., Paulter F. et al.:** Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1999, 55, 1899.
  59. **Vabulas R.M., Ahmad-Nejad P., da Costa C. et al.:** Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 31332.
  60. **van Why S.K., Siegel N.J.:** Heat shock proteins in renal injury and recovery. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 1998, 7, 407.
  61. **Wick M.C., Kremser C., Frischauf S., Wick G.:** In vivo molecular imaging of vascular stress. *Cell Stress Chaperones.* 2008, 13, 263.
  62. **Wick M.C., Mayerl C., Backovic A. et al.:** In vivo imaging of the effect of LPS on arterial endothelial cells: molecular imaging of heat shock protein 60 expression. *Cell Stress Chaperones.* 2008, 13, 275.
  63. **Wick G., Knoflach M., Xu Q.:** Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 2004, 22, 361.
  64. **Wu T., Tanguay R.M.:** Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases: friend or foe? *Cell Stress Chaperones.* 2006, 11, 1.
  65. **Xu Q.:** Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 1547.
  66. **Xu Q., Scett G., Perschinka H. et al.:** Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation* 2000, 102, 14.
  67. **Zhang X., Xu Z., Zhou L. et al.:** Plasma levels of Hsp70 and anti-Hsp70 antibody predict risk of acute coronary syndrome. *Cell Stress Chaperones.* 2010, DOI 10.1007/s12192-010-0180-3.
  68. **Zhu J., Quyyumi A.A., Wu H. et al.:** Increased serum levels of heat shock protein 70 are associated with low risk of coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23, 1055.
  69. **Zuehlke A., Johnson J.L.:** Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers* 2010, 93, 211.