



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τίτλος εργασίας

*«Εξωγενώς χορηγούμενο υδρόθειο και ενδογενής
παραγωγή υδροθείου»*

ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣ ΖΑΜΠΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ
ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ
ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ**

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΑΝΔΡΕΑΣ ΠΑΠΑΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Οι διαδικασίες που απαιτήθηκαν για την ολοκλήρωση και την παρουσίαση της συγκεκριμένης εργασίας ήταν σχετικώς αυξημένης δυσκολίας. Είμαι ικανοποιημένος που κατάφερα να έρθω σε επαφή με ένα νέο ερευνητικό πεδίο στην διαδικασία της ανάπτυξης φαρμάκων. Στο πλαίσιο αυτό η δυνατότητα που μου δόθηκε να δουλέψω πάνω στο συγκεκριμένο θέμα με τον Καθηγητή κ. Αντρέα Παπαπετρόπουλο, ήταν μια πρόκληση ιδιαίτερα ευχάριστη και δημιουργική, αλλά και σε κάθε περίπτωση η βοήθεια του σε θεωρητικό και πρακτικό επίπεδο ήταν άμεση και καθοριστικής σημασίας.

Επιπρόσθετα αμέριστη ήταν η βοήθεια της Θάνης Παυλίδου (υποψήφια διδάκτορας) και της Έλλης Ιωαννίδη (Μεταδιδακτορικός συνεργάτης) που δουλεύουν στο εργαστήριο του κ Παπαπετρόπουλου. Συνέβαλαν σημαντικά στα διάφορα στάδια εκπόνησης του παρόντος, στην εκμάθηση νέων εργαστηριακών πρακτικών, στην ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας και στην σωστή εκτίμηση των αποτελεσμάτων με βάση τις γνώσεις και την εμπειρία τους.

Τέλος ευχαριστώ την Τριμελή Επιτροπή για τα ουσιαστικά και εποικοδομητικά σχόλια της επί της μελέτης αυτής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το H_2S αποτελεί το νεότερο αέριο διαμεσολαβητή, που μετά το NO και το CO διαπιστώθηκε πως παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση. Πλήθος ερευνητικών μελετών έχει ασχοληθεί με τις βιολογικές, βιοχημικές και φαρμακολογικές ιδιότητες του H_2S , ενώ είναι γνωστή η συσχέτιση του με πολλές ανθρώπινες νόσους, όπως ασθένειες του καρδιαγγειακού, του κεντρικού νευρικού, αλλά και διάφορες μορφές καρκίνου. Από φαρμακολογικής άποψης σημαντικές προσπάθειες έχουν συντελεστεί έκτοτε, με σκοπό την ανακάλυψη νέων φαρμάκων που στοχεύουν είτε στην αύξηση των επιπέδων του ενδογενούς H_2S , είτε στην αναστολή των «βιολογικών πηγών» που το παράγουν στο κύτταρο.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να μελετηθεί η επίδραση της εξωγενούς χορήγησης H_2S στην ενδογενή παραγωγή H_2S . Προσδιορίσαμε την ιδιαίτερη ικανότητα δοτών που απελευθερώνουν H_2S με ταχύ ρυθμό να αυξάνουν την έκφραση των τριών ενζύμων που παράγουν H_2S ενδογενώς σε ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα, αλλά και σε κάποιους ιστούς από υγιείς μύες. Επιπλέον επικεντρωθήκαμε στην αποσαφήνιση του βιολογικού ρόλου του συγκεκριμένου φαινομένου, ως αναφορά τον πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών κυττάρων. Δείξαμε ότι η εξωγενής χορήγηση H_2S ελαττώνει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και πως η συγκεκριμένη φαρμακολογική δράση δεν σχετίζεται με την ικανότητα του εξωγενούς H_2S να διεγείρει την έκφραση των τριών ενζύμων παραγωγής του.

Παράλληλα σε αυτή την σειρά πειραμάτων μελετήσαμε πως επηρεάζεται η ενδογενής παραγωγή H_2S , μετά από την αναστολή της ενδογενούς παραγωγής NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Δείξαμε ότι η φαρμακολογική αναστολή της eNOS προκαλεί αύξηση στην έκφραση της CSE στον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, ενώ δεν επηρεάζει την έκφραση των άλλων δύο ενζύμων παραγωγής H_2S , CBS και 3-MST.

ABSTRACT

H₂S is the newest gasotransmitter, which after NO and CO, was found to play an important role in cellular signaling. Numerous research studies have dealt with the biological, biochemical and pharmacological properties of H₂S, and its association with many human diseases, such as cardiovascular diseases, central nervous system diseases, as well as various forms of cancer. From a pharmacological point of view, significant efforts have been made since then to discover new drugs that aim, either to increase levels of endogenous H₂S or to inhibit the "biological sources" that produce it in the cell.

In the present study, an attempt was made to study the effect of exogenous H₂S administration on endogenous H₂S production. We have determined the particular ability of fast-release H₂S-releasing donors to increase the expression of the three H₂S-producing enzymes endogenously in endothelial and smooth muscle cells, but also in some tissues of healthy mice. We also focused on clarifying the biological role of this phenomenon, referring to the proliferation of smooth muscle cells. We have shown that exogenous administration of H₂S reduces the proliferation of smooth muscle cells and that this particular pharmacological activity is not related to the ability of exogenous H₂S to stimulate the expression of the three H₂S-producing enzymes.

At the same time, in this series of experiments we studied how endogenous H₂S production is affected by inhibition of endogenous NO production, in endothelial cells. We have shown that pharmacological inhibition of eNOS causes an increase in CSE expression in this cell type and does not affect the expression of the other two enzymes that produce H₂S, CBS and 3-MST.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	4
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
1. Εισαγωγή	8
2. Ενδογενής παραγωγή του H ₂ S	9
3. Βιολογικός ρόλος του H ₂ S	15
3.1. Μοριακός μηχανισμός δράσης: Σουλφυδρυλίωση & Σηματοδοτικά μονοπάτια	15
3.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών αέριων διαβιβαστών	20
3.3 Τα επίπεδα H ₂ S σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις	24
4. Φαρμακολογικές προσεγγίσεις με στόχευση το H ₂ S	26
4.1. Μόρια που λειτουργούν ως δότες H ₂ S	26
4.1.1 Ταχείς-δότες H ₂ S: Ανόργανα Θειούχα Άλατα	26
4.1.2 Επιθυμητά φαρμακολογικά - φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά των δοτών H ₂ S	29
4.1.3 Αργοί οργανικοί δότες H ₂ S	30
4.1.4 Μικτοί δότες NO και H ₂ S	34
4.1.5 Δομικά ανάλογα φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη και λειτουργούν ως δότες H ₂ S	35
4.2 Αναστολείς της ενδογενούς παραγωγής H ₂ S	37
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	40
1. Σκοπός εργασίας	41
2. Υλικά και μέθοδοι	42
2.1 Πειραματικό πρωτόκολλο in vitro	42
2.2 Μέθοδοι in vitro	44
2.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων	44
2.2.2 Μέτρηση και στρώσιμο των κυττάρων	45
2.2.3 Συγκομιδή των κυττάρων και παρασκευή κυτταρικού διαλύματος	46
2.2.4 MTT assay	47
2.3 Πειράματα in vivo	49
2.3.1 Πρωτόκολλο πειραματόζωων	49
2.3.2 Μέθοδοι in vivo	49
2.3.3 Ομογενοποίηση ιστών	49
2.4 Σύσταση του διαλύματος λύσης	50
2.5 Ανοσοαποτύπωση Western	51
2.5.1 Καμπύλη αναφοράς Lowry και παρασκευή δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση	51
2.5.2 Ηλεκτροφόρηση	52
2.5.3 Διαδικασία μεταφοράς πρωτεϊνών στην μεμβράνη	53

2.5.4 Διαδικασία μετά την μεταφορά στην μεμβράνη	54
2.5.5 Εμφάνιση	55
2.5.6 Stripping	56
2.6 Ποσοτικοποίηση και στατιστική ανάλυση	56
3. Αποτελέσματα	57
3.1 Έκφραση των ενζύμων παραγωγής H ₂ S μετά την χορήγηση Na ₂ S σε ενδοθηλιακά κύτταρα bEnd.3.	57
3.2 Έκφραση των ενζύμων παραγωγής H ₂ S μετά την χορήγηση Na ₂ S σε λεία μυϊκά κύτταρα A7r5.	59
3.3 Έκφραση των ενζύμων παραγωγής H ₂ S σε διάφορους ιστούς μετά από χορήγηση Na ₂ S σε μύες C57BL/6	61
3.4 Πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων μετά την χορήγηση θειούχου άλατος	65
3.5 Πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων μετά την συγχορήγηση θειούχου άλατος και αναστολέα της CSE	66
3.6 Πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων μετά την συγχορήγηση θειούχου άλατος και AOA	67
3.7 Έκφραση των ενζύμων παραγωγής H ₂ S μετά την χορήγηση αναστολέα της eNOS σε ενδοθηλιακά κύτταρα bEnd.3.	68
4. Συζήτηση	70
6. Βιβλιογραφία	78

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

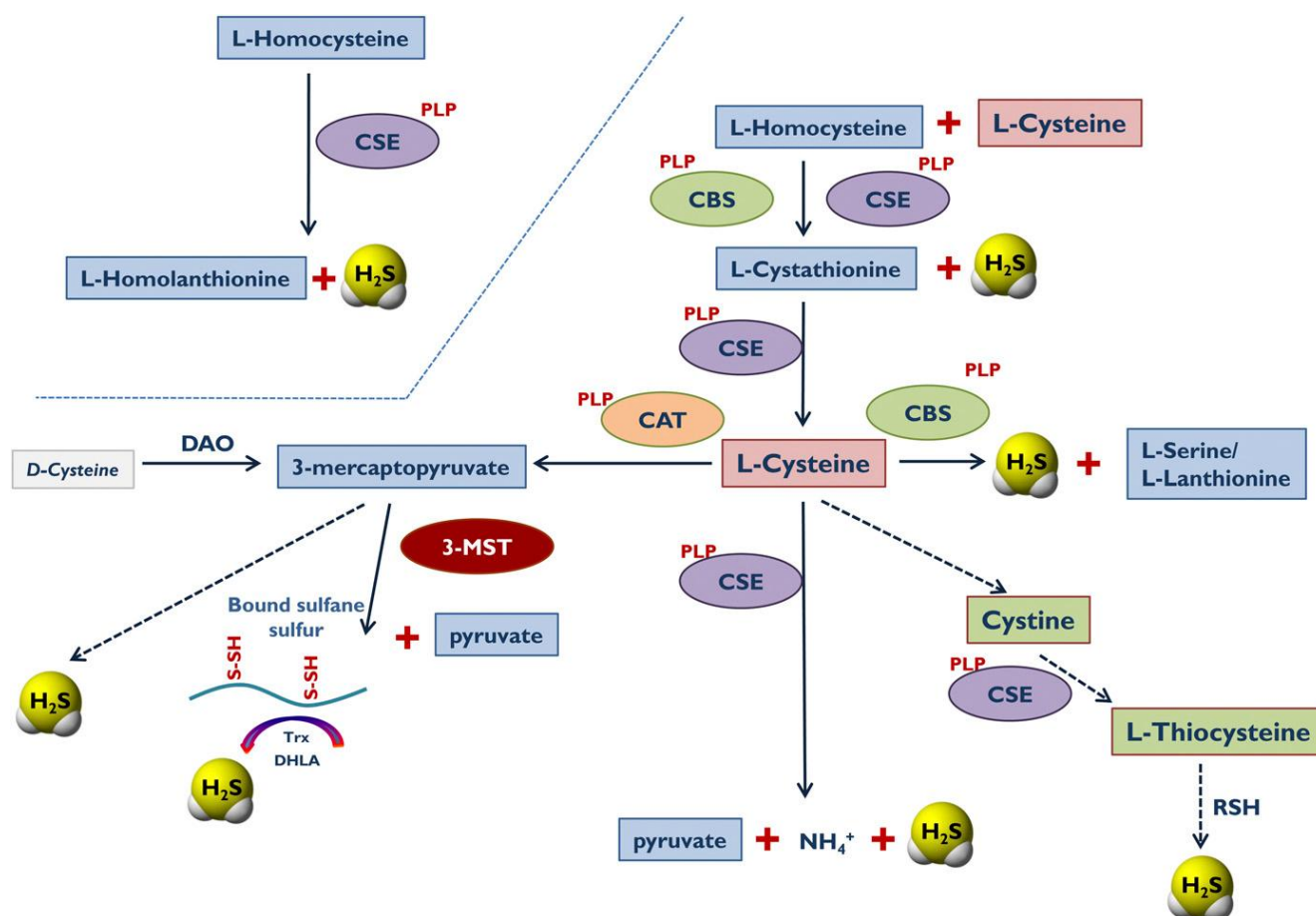
1. Εισαγωγή

Το υδρόθειο (H_2S) είναι ένα άχρωμο, εύφλεκτο και τοξικό αέριο, με χαρακτηριστική δυσάρεστη οσμή «κλούβιου αυγού». Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 90' το H_2S παρουσίαζε ενδιαφέρον αποκλειστικά για τις τοξικολογικές του ιδιότητες, αφού αποτελεί σημαντικό περιβαλλοντικό ρύπο που απελευθερώνεται από πολλούς βιομηχανικούς κλάδους, πχ βυρσοδεψία, διυλιστήρια πετρελαίου, εξορυκτική βιομηχανία κ.α.[1] Ωστόσο το ερευνητικό ενδιαφέρον επεκτάθηκε τις τελευταίες τρεις δεκαετίες και σε άλλους επιστημονικούς κλάδους, όπως τη βιοχημεία, τη φυσιολογία, τη παθοφυσιολογία και τη φαρμακολογία. Η στροφή αυτή προέκυψε από την προγενέστερη ανακάλυψη πως αέρια μόρια, όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) αποτελούν σηματοδοτικά μόρια που συμμετέχουν σε πολλές βιοχημικές οδούς, ρυθμίζοντας πολλές βιολογικές λειτουργίες [2].

Η ανακάλυψη πως και το H_2S παράγεται σε μικρές ποσότητες από ευκαρυωτικά κύτταρα και ιστούς θηλαστικών, αποτέλεσε ένα νέο στοιχείο [3]. Μέχρι τότε ήταν γνωστό στο πεδίο της βιολογίας το γεγονός της παραγωγής υδρόθειου κατά τον αναερόβιο καταβολισμό ορισμένων βακτηριδίων, πχ εντεροβακτηρίδια. Πλέον αποτελεί το τρίτο γνωστό αέριο μόριο μεταγωγής σήματος. Ένας μεγάλος αριθμός ερευνητικών εργασιών και επιστημονικών άρθρων αποδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο που επιτελεί σε μία σειρά βιοχημικές διεργασίες, αλλά και στους μηχανισμούς ανάπτυξης πολλών ασθενειών. Η συσχέτισή του με την παθοφυσιολογία διαφόρων ειδών καρκίνου, καρδιαγγειακών νόσων, νευροεκφυλιστικών ασθενειών και πολλών χρόνιων φλεγμονωδών νόσων έχει επικεντρώσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων που δραστηριοποιούνται στα διάφορα πεδία των φαρμακευτικών επιστημών, στην διασαφήνιση της βιολογικής και κλινικής σημασίας του H_2S , με γνώμονα την ανάπτυξη νέων φαρμακολογικών προσεγγίσεων που να συμβάλλουν στην πρόληψη και θεραπεία ασθενειών [4].

2. Ενδογενής παραγωγή του H₂S

Η βιοσύνθεση του H₂S πραγματοποιείται, μέσω της ενζυμικής κατάλυσης αμινοξέων που περιέχουν σουλφυδρικές ομάδες, όπως η L-κυστεΐνη, η όμοκυστεΐνη και η L-κυσταθειονίνη. Συγκεκριμένα, η ενδογενής παραγωγή H₂S αποδίδεται στην καταλυτική δράση τριών ενζύμων, που ονομάζονται γ-λυάση της κυσταθειονίνης (CSE), β-συνθετάση της κυσταθειονίνης (CBS) και η σουλφοτρανσφεράση του 3-μερκαπτοπυρροσταφυλικού (3-MST). Στο μονοπάτι της 3-MST συμμετέχει και η αμινοτρανσφεράση της κυστεΐνης (CAT) [5].



Εικόνα 1 : Βιοσυνθετικοί οδοί παραγωγής H₂S. Ενζυμική σύνθεση [6]

Η CBS και η CSE είναι δύο ένζυμα εξαρτώμενα από την 5-φωσφορική πυριδοξάλη (PLP, ή βιταμίνη B6) που καταλύουν μια πληθώρα αντιδράσεων που παράγουν H₂S. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη χαμηλή εξειδίκευση του ενεργού τους κέντρου ως προς συγκεκριμένο υπόστρωμα. Αποτελούν μέλη της οδού της ανάστροφης διαθειώσης, ενός βιοχημικού καταρράκτη υπεύθυνου για τη μετατροπή της μεθειονίνης σε L-κυστεΐνη. Και τα δύο ένζυμα καταλύουν την μετατροπή της L-ομοκυστεΐνης σε L-κυσταθειονίνη. Η CSE καταλύει την μετατροπή της L-κυσταθειονίνης σε L-κυστεΐνη και α-κετοβουτυρικό και την αντίδραση μετατροπής της L-κυστεΐνης σε L-ομολάνθιονίνη, αλλά και την διάσπαση της L-κυστεΐνης σε πυρροσταφυλικό οξύ και αμμωνία. Η CBS επιπρόσθετα

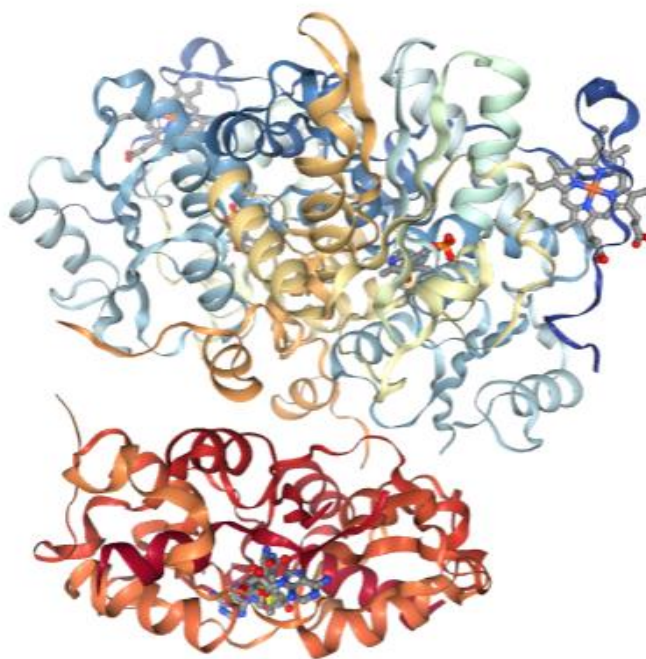
καταλύει την αντίδραση κατά την οποία η L-κυστεΐνη μετατρέπεται σε L-σερίνη και L-λανθιονίνη. Εκτός των παραπάνω πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα συγκεκριμένα ένζυμα καταλύουν αντιδράσεις και συμμετέχουν σε επιπλέον μονοπάτια που δεν εκλύουν H₂S. Για παράδειγμα η CBS αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή των επιπέδων ομοκυστεΐνης στα θηλαστικά, που δεν ακολουθείται από την παραγωγή H₂S. Ποιοι παράγοντες επιδρούν, ώστε η CBS να καταλύει αντιδράσεις για την παραγωγή H₂S, έναντι της παραγωγής κυστεΐνης από ομοκυστεΐνη αποτελεί ένα ενδιαφέρον ερώτημα που παραμένει αναπάντητο [7, 8].

Η 3-MST αποτελεί το λιγότερο μελετημένο ένζυμο. Σε αντίθεση με τα άλλα δύο ένζυμα, συμμετέχει στην οδό καταβολισμού της κυστεΐνης. Παράγει υδρόθειο, καταλύοντας την αντίδραση που παράγει πυρροσταφυλικό από 3-μερκαπτοπυρροσταφυλλικό (3-MP). Το συγκεκριμένο ένζυμο δρα στην ίδια οδό με την CAT, αφού το 3-MP ουσιαστικά παρέχεται από τον μεταβολισμό της L-κυστεΐνης και του α-κετογλουταμικού, που καταλύεται από την CAT. Η 3-MST δεν χρειάζεται την PLP ως συνένζυμο για την παραγωγή H₂S, όπως συμβαίνει με τα άλλα δύο ένζυμα, όμως η CAT είναι ένζυμο εξαρτώμενο από την PLP. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί πως το 3-MP, εκτός από την λειτουργία του ως υπόστρωμα για την 3-MST, μπορεί να παράγει αυθόρμητα H₂S [7, 8].

Επίσης σε κάποια κύτταρα και ιστούς η D-κυστεΐνη μπορεί να αποτελέσει επίσης ένα υπόστρωμα για την παραγωγή H₂S. Εν συντομία με την καταλυτική δράση της οξειδάσης των D-αμινοξέων (DAO), η D-κυστεΐνη μετατρέπεται σε 3-MP. Αυτό το μονοπάτι για την παραγωγή H₂S φαίνεται να διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο σε ελάχιστους ιστούς, όπως είναι η παρεγκεφαλίδα και ο νεφρός. Μάλιστα στο νεφρό η παραγωγή υδρόθειου από την D-κυστεΐνη είναι 80 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την L-κυστεΐνη [9].

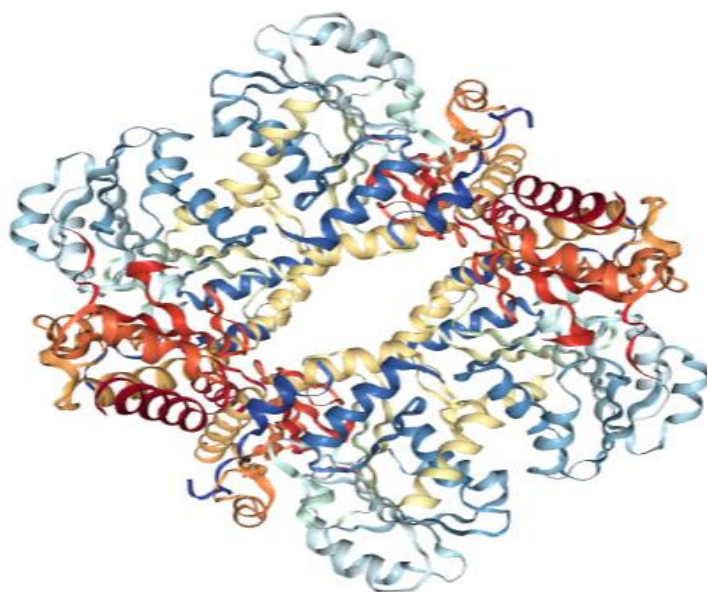
Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και τα στερεοχημικά χαρακτηριστικά των τριών ενζύμων. Η CBS έχει μελετηθεί περισσότερο από τα άλλα ένζυμα ως προς τους παράγοντες που επηρεάζουν την δραστηριότητά της. Μάλιστα φάνηκε πως παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των στερεοχημικών της χαρακτηριστικών. Η ανθρώπινη CBS είναι ένα ομοτετραμερές με μοριακό βάρος 63kD. Κάθε υπομονάδα περιέχει μία αλληλουχία 140 αμινοξέων στο καρβοξυτελικό της άκρο. Η αλληλουχία αυτή αποτελεί μια ρυθμιστική περιοχή που περιέχει ένα ζεύγος υπόλοιπων της CBS, που έχει την ικανότητα να δεσμεύει νουκλεοτίδια αδενοσίνης ρυθμίζοντας έτσι την λειτουργία του ενζύμου [10]. Η CBS ενεργοποιείται από την S-αδενοσυλμεθειονίνη (SAM), η οποία παρουσιάζει συγγένεια με μία αλλοστερική θέση του ενζύμου, που βρίσκεται συγκεκριμένα στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, στην ρυθμιστική περιοχή που αναφέρεται παραπάνω. Η δέσμευση της SAM προκαλεί αλλαγή στην στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης και επάγει την παραγωγή H₂S. Συγκεκριμένα υπό φυσιολογικές συνθήκες η ρυθμιστική περιοχή καλύπτει το ενεργό κέντρο του ενζύμου

μειώνοντας την ενεργότητά του. Η δέσμευση της SAM «χαλαρώνει» την σύνδεση ανάμεσα στις δύο περιοχές επιτρέποντας την είσοδο του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο [10, 11]. Επιπλέον η CBS αποτελεί το μοναδικό ένζυμο που είναι γνωστό και εξαρτώμενο από την PLP, ενώ διαθέτει και μία πρόσθετη ομάδα αίμης. Η ομάδα αυτή φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του ενζύμου. Έτσι η CBS αποκτά ανενεργή διαμόρφωση όταν σε αυτή την ομάδα αίμης συνδεθεί μονοξείδιο του άνθρακα (CO) που φέρει συγγένεια με το Fe, με μια αντίδραση που λαμβάνει χώρα υπό την παρουσία NADPH ή της συνθετάσης της μεθειονίνης [7, 8, 10].



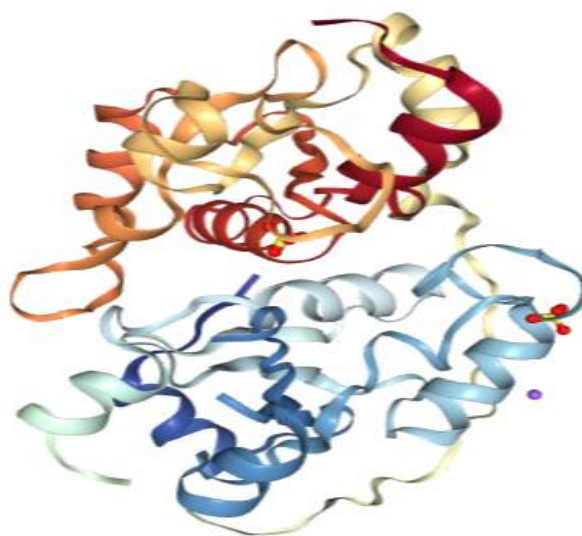
Εικόνα 2: Κρυσταλλική δομή της CBS. Φαίνεται η αλλοστερική θέση πρόσδεσης της SAM και η θέση της αίμης [10]

Η CSE είναι επίσης ένα ομοτετραμερές με μοριακό βάρος 45kD. Η χαμηλή ειδικευση ως προς συγκεκριμένο υπόστρωμα, που αναφέρεται παραπάνω, οφείλεται στην ικανότητα του ενζύμου να καταλύει αντιδράσεις β και γ υποκατάστασης. Όμως δεν υπάρχουν πολλά στοιχεία για την ρύθμιση της δραστηριότητας του ενζύμου. Έχει διαπιστωθεί σε κάποιους κυτταρικούς πληθυσμούς πως η ενεργότητα της CSE διεγείρεται από την οδό Ca^{2+} /καλμοδουλίνης, αλλά αυτό δεν επιβεβαιώνεται σε άλλους. Επιπλέον έχει μελετηθεί συγκεκριμένα η σύνδεσή της με το συνένζυμο PLP. Πραγματοποιείται μέσω της λυσίνης 212 της ανθρώπινης CSE, με τον σχηματισμό βάσης του Schiff ανάμεσα στην πλευρική αμινική ομάδα της λυσίνης και την καρβοξυλική της PLP [12].



Εικόνα 3 : Κρυσταλλική δομή της CSE. Ξεχωρίζει η ομοτετραμερής διαμόρφωση [12]

Η 3-MST είναι με την σειρά της ένα ένζυμο εξαρτώμενο από Zn στο ενεργό του κέντρο. Παρατηρείται μια χημική ισορροπία ανάμεσα στην μονομερή και στην διμερή διαμόρφωση του ενζύμου, με την ενεργή διαμόρφωση να είναι η μονομερής μορφή. Δύο επιφανειακές κυστεΐνες (154 και 263) συμμετέχουν στην δημιουργία διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών και έτσι ρυθμίζεται η ενεργότητα του ενζύμου [13].

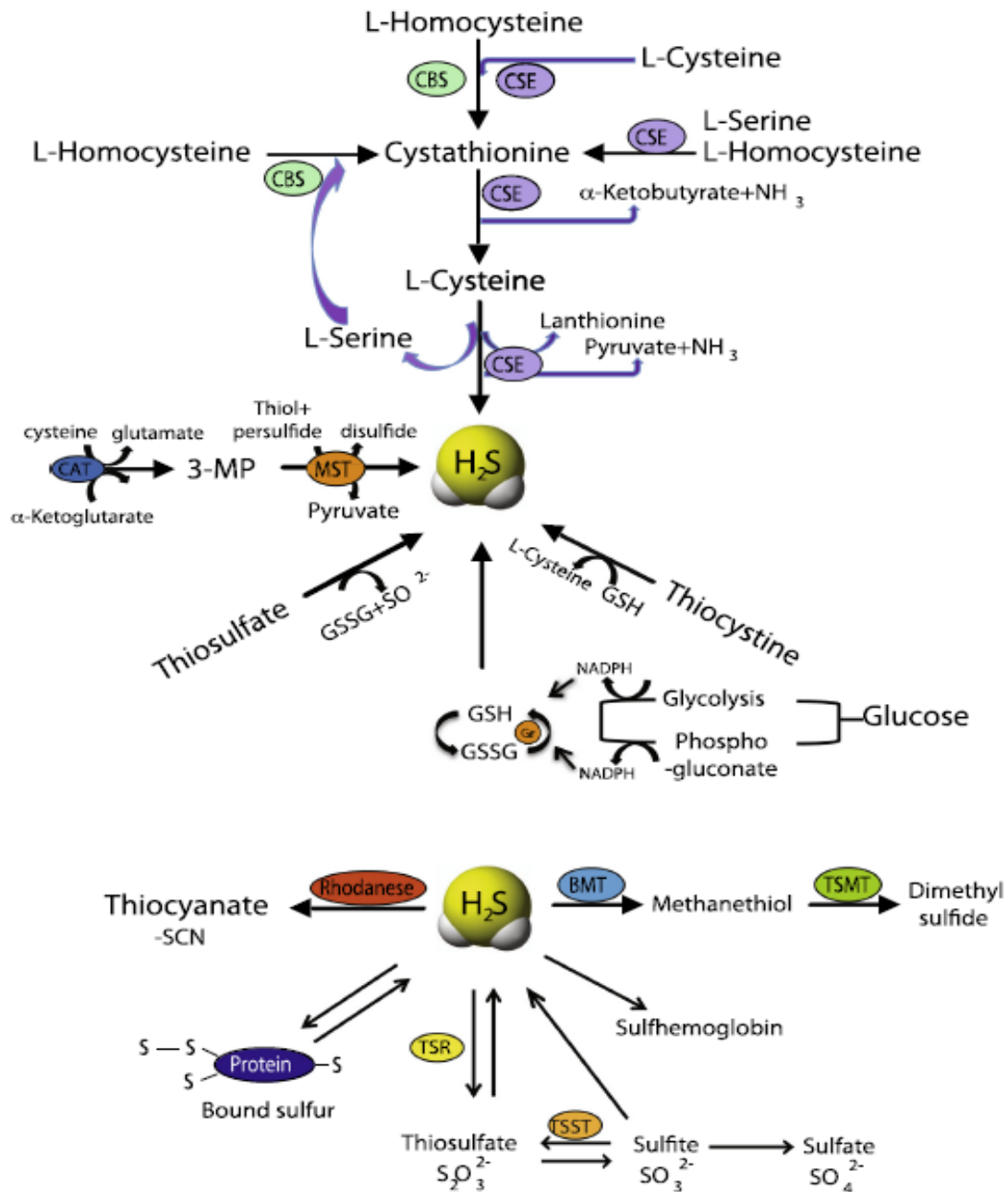


Εικόνα 4 : Κρυσταλλική δομή της 3-MST. Παρατηρείται η διμερής διαμόρφωση και ο Zn στο ενεργό της κέντρο[14]

Τα ένζυμα παραγωγής H_2S μπορεί να ανιχνευθούν σε ένα ευρύ φάσμα ιστών και οργάνων. Όμως παρουσιάζονται διαφορές στην έκφρασή τους ανάλογα με τον ιστό ή το βιολογικό σύστημα. Ενδεικτικά στην βιβλιογραφία η CSE παρουσιάζεται ως το ένζυμο που εκφράζεται κυρίως στους περιφερειακούς ιστούς, ιδιαίτερα στο καρδιαγγειακό σύστημα (στο μυοκάρδιο και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων) αλλά και στο ήπαρ, στο αναπνευστικό, στο νεφρικό κ.α. Ελάχιστα συμμετέχει στην παραγωγή H_2S στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Αντίθετα η CBS και η 3-MST εκφράζονται πολύ περισσότερο στο νευρικό σύστημα. Η CBS επίσης εκφράζεται σημαντικά στο γαστρεντερικό σωλήνα, αλλά και στο καρδιαγγειακό και το αναπνευστικό. Η 3-MST εκφράζεται σε όλους τους ιστούς με τα επίπεδά της να ποικίλουν σημαντικά. Εκφράζεται έντονα στους ενδοκρινείς αδένες, το παχύ έντερο και στο ήπαρ ποντικού. Βέβαια τα στοιχεία συνεχώς εμπλουτίζονται. Πολλές πρόσφατες μελέτες έδειξαν επίσης υψηλά επίπεδα έκφρασης της 3-MST και στο καρδιαγγειακό σύστημα, όπου η CSE μέχρι σήμερα μονοπωλούσε το ενδιαφέρον. Αλλά επί του παρόντος υπάρχει πλήρης έλλειψη γνώσεων για το ρόλο αυτού του ενζύμου στην καρδιά [6, 15].

Επιπλέον τα τρία ένζυμα που παράγουν H_2S παρουσιάζουν διαφορές και ως προς τον κυτταρικό τους εντοπισμό που πιθανόν καθορίζει σε ένα βαθμό και τον βιολογικό τους ρόλο. Η CSE είναι ένζυμο που εντοπίζεται φυσιολογικά στο κυτταρόπλασμα, όμως έχει την ικανότητα να μετατοπίζεται στο μιτοχόνδριο όταν υπάρχει παρατεταμένη αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Η CBS εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, αλλά και στο μιτοχόνδριο σε πολλούς κυτταρικούς τύπους φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων. Αντίθετα η 3-MST εντοπίζεται κυρίως στο μιτοχόνδριο, και σπανιότερα στο κυτταρόπλασμα [8, 15].

Εκτός από τα παραπάνω δεδομένα που σχετίζονται με τη CBS, τη CSE και τη 3-MST, χρειάζεται να αναφερθεί πως η ενδογενής παραγωγή του υδρόθειου μπορεί να προκύπτει και από άλλες βιοχημικές οδούς, χωρίς την συμμετοχή των παραπάνω ενζύμων. Η «μη ενζυμική παραγωγή» του υδρόθειου λαμβάνει χώρα μέσω μονοπατιών της γλουταθειόνης, ανόργανων και οργανικών πολυσουλφιδίων και του στοιχειακού θείου μέσω μια σειράς οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Η αναγωγή της δισουλφιδικής γλουταθειόνης σε γλουταθειόνη με την καταλυτική δράση της αναγωγάσης της γλουταθειόνης είναι χαρακτηριστική βιοχημική αντίδραση που απελευθερώνει υδρόθειο, με το NADPH να συμμετέχει στις παραπάνω διαδικασίες ως δότης ηλεκτρονίου. Επίσης το H_2S παράγεται και απευθείας με την αναγωγή του στοιχειακού θείου και της γλουταθειόνης. Τέλος, το θειοθειικό ιόν αποτελεί επιπλέον ένα προϊόν του μεταβολισμού του υδρόθειου και της κυστεΐνης, το οποίο όμως υπό ορισμένες συνθήκες μπορεί και να παράξει H_2S . Χαρακτηριστικά συμμετέχει σε μια αναγωγική αντίδραση με το πυρροσταφυλικό οξύ να δρα ως δότης πρωτονίων. Από την αντίδραση παράγεται H_2S , δισουλφιδική γλουταθειόνη και SO_2^{2-} [16].



Εικόνα 5 : Σχηματική απεικόνιση της ενζυμικής και μη ενζυμικής σύνθεσης του H₂S αλλά και ο μεταβολισμός του [16]

3. Βιολογικός ρόλος του H₂S

Οι γνώσεις σχετικά με τον φυσιολογικό ρόλο του υδρόθειου συνεχώς επεκτείνονται. Εμπλέκεται σε μεγάλο αριθμό βιολογικών αποκρίσεων και σε πολλά φυσιολογικά συστήματα. Ανάμεσα τους η ρύθμιση του αγγειακού τόνου και της αρτηριακής πίεσης, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, η διέγερση της αγγειογένεσης, ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων, η φυσιολογική ενδοθηλιακή λειτουργία, η ανάπτυξη αντοχής στην ινσουλίνη και γενικά διεργασίες που σχετίζονται με τον μεταβολισμό, τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση [5, 17].

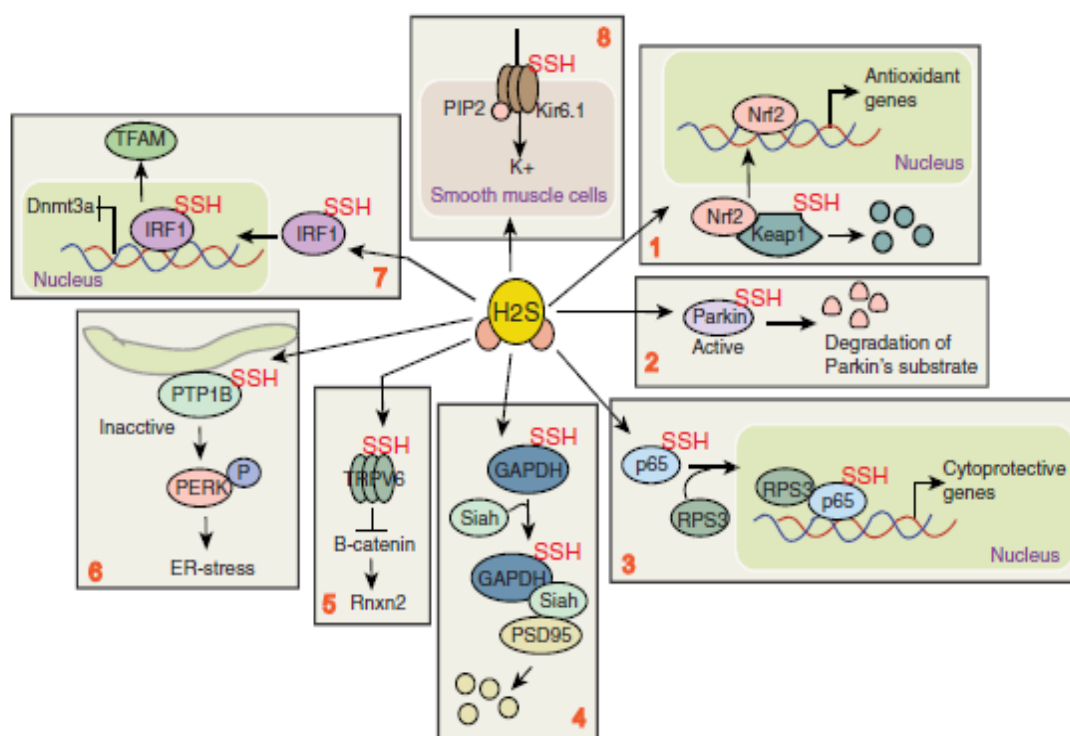
3.1. Μοριακός μηχανισμός δράσης: Σουλφυδρυλίωση & Σηματοδοτικά μονοπάτια

Το ενδογενώς παραγόμενο H₂S, όπως και τα άλλα δυο αέρια σηματοδοτικά μόρια, διαχέεται διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών, χωρίς να απαιτεί κάποια συγκεκριμένη πρωτεΐνη μεταφορέα. Το H₂S δεν έχει κάποιον συγκεκριμένο μοριακό στόχο, δηλαδή δεν δρα αποκλειστικά σε ένα μονοπάτι ή σε ένα μόνο υποδοχέα, γεγονός που εξηγεί την εμπλοκή του σε πληθώρα βιολογικών λειτουργιών [2].

Ως κύριος μηχανισμός δράσης έχει προταθεί η διαδικασία της σουλφυδρυλίωσης των πρωτεϊνών (ή περσουλφυδρίωση). Αποτελεί μια ομοιοπολική μετα-μεταφαστική τροποποίηση των πρωτεϊνών, όπου το παραγόμενο H₂S οδηγεί στην μετατροπή των ομάδων -SH των υπολοίπων κυστεΐνης σε -SSH. Ο σχηματισμός των υπερθειικών κυστεϊνών (Cys-SSH) έχει δειχθεί ότι τροποποιεί τη λειτουργία των πρωτεϊνών, τον κυτταρικό εντοπισμό, την σταθερότητά τους, την αντοχή τους έναντι του οξειδωτικού στρες, αφού μεταβάλλει την στερεοδιάταξή τους. Τελικώς η σουλφυδρυλίωση οδηγεί σε αύξηση ή μείωση της πρωτεϊνικής λειτουργίας πολλών ενζύμων, διαύλων ιόντων, μεταγραφικών παραγόντων, διαμεμβρανικών υποδοχέων, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή την αναστολή διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών. Παρακάτω παρατίθενται παραδείγματα από τις πιο σημαντικές βιολογικές λειτουργίες που ρυθμίζονται από το H₂S και οι μοριακοί στόχοι που σουλφυδρυλιώνονται και σχετίζονται με αντίστοιχα βιοχημικά μονοπάτια [17, 18].

Ένας πολύ σημαντικός μοριακός στόχος του H₂S που επηρεάζει πολλές κυτταρικές λειτουργίες είναι οι **ATP- ευαίσθητοι διάυλοι καλίου (K_{ATP} channels)**. Η σουλφυδρυλίωσή τους εμποδίζει την σύνδεση των διαύλων με το ATP και αυξάνει την συγγένεια με την 4,5-διφωσφορική φωσφατίδυλοinosιτόλη [19]. Έτσι επάγεται η διάνοιξη των διαύλων και η είσοδος K⁺ στο κύτταρο.

Οι K_{ATP} διάλυλοι υπάρχουν στις κυτταρικές μεμβράνες, στην μεμβράνη του σαρκοπλασματικού δικτύου, του μιτοχονδρίου και του πυρήνα. Ιδιαίτερη σημασία έχει ο συγκεκριμένος μηχανισμός στη χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων και κατ' επέκταση στην αγγειοσυσπαση και την χάλαση των λείων μυών των αεραγωγών [20, 21]. Επιπλέον είναι γνωστό πως οι K_{ATP} διάλυλοι διαδραματίζουν ρόλο στον διαβήτη, αφού ρυθμίζουν στα β -κύτταρα του παγκρέατος, την έκκριση ινσουλίνης [17].



Εικόνα 6 : Σουλφυδρυλίωση Μοριακών Στόχων του H_2S και επαγόμενες λειτουργίες [17]

Πολύ μεγάλης σημασίας είναι η **αντιφλεγμονώδης δράση** του υδρόθειου. Ανταγωνίζεται την φλεγμονή, μέσω πολλών διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αναστέλλοντας τον μεταγραφικό παράγοντα NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) και την p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase), καταστέλλοντας την έκφραση του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF- α και ενεργοποιώντας τους ATP- ευαίσθητους διαλύτες K^+ (K_{ATP}). Μάλιστα σε χρόνια φλεγμονή μειώνει την έκφραση των προ φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως την ιντερλευκίνη-1 β (IL-1 β), τον TNF- α , την ιντερφερόνη IFN γ , τις IL-12 και IL-23, την κυκλοξυγενάση (COX-2), ενώ αυξάνει την έκφραση αντιφλεγμονωδών παραγόντων, όπως η IL-10 [5, 16, 17]. Ένα παράδειγμα από την αντιφλεγμονώδη δράση του H_2S φαίνεται στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας με καθοριστικό ρόλο να παίζει η αναστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης προσκόλλησης ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), σε υψηλές συγκεντρώσεις H_2S , λόγω της αναστολής του NF- κ B [22, 23]. Η αναστολή επιτυγχάνεται με την σουλφυδρυλίωση της υπομονάδας p65 [17]. Ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας παίζει κρίσιμο ρόλο στην

έκφραση πολλών πρωτεϊνικών μορίων που συμμετέχουν στη διαδικασία της χημειοταξίας και στην ανάπτυξη της φλεγμονής, όπως χημειοκίνες και μόρια προσκόλλησης. Εκτός των παραπάνω, μειώνει την έκφραση των υποδοχέων χημειοκινών (CX3C, CX3CR1, CX3CL1) [24]. Έτσι εμποδίζεται η προσκόλληση και διείσδυση των μονοκύτταρων στο εσωτερικό των ιστών.

Συμμετέχει στην ρύθμιση της **αγγειογένεσης**, με τα μέχρι τώρα ευρήματα να δείχνουν ότι την αυξάνει, διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων [21, 25]. Η ομάδα των Tao et al. έδειξε ότι ο υποδοχέας VEGFR2 (υποδοχέας κινάσης της τυροσίνης) ενεργοποιείται από το υδρόθειο, κατά την αγγειογένεση. Έτσι έχει προταθεί ότι ενισχύεται η δραστηριότητα των σηματοδοτικών πρωτεϊνών VEGF και ενεργοποιούν τους υποδοχείς VEGFRs επάγοντας την αγγειογένεση [26]. Μάλιστα η υπερέκφραση των ενζύμων παραγωγής H₂S μπορεί να οδηγήσει σε επιβάρυνση παθολογικών καταστάσεων, όπως στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων ή στην ανάπτυξη ασταθούς αθηρωματικής πλάκας. Είναι μεγάλης σημασίας η πρόσφατη ανακάλυψη ότι η CBS υπερεκφράζεται στον καρκίνο του κόλον. Μάλιστα η φαρμακολογική αναστολή της CBS σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες δείχνει πως μπορεί να αναστρέψει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, αλλά και την εξέλιξη της αγγειογένεσης που προκαλείται από το H₂S [27]. Επιπρόσθετα ερευνητικές μελέτες, τονίζουν την σπουδαιότητα της ενεργοποίησης της ERK1/2 και p38, ως βάση της αγγειογεννητικής δράσης του H₂S [28]. Άλλη μελέτη, εμπλέκει και την ενεργοποίηση των K_{ATP} διαύλων, αφού ανταγωνιστές των διαύλων εμπόδισαν την φωσφορυλίωση της p38 που αποτελεί μέλος της οικογένειας των MAPK κινασών [16].

Επιπλέον το H₂S ασκεί σημαντική **αντιοξειδωτική δράση**. Μειώνει τα επίπεδα ROS (ελεύθερες ρίζες οξυγόνου), ενώ η έκφραση πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων, για παράδειγμα η καταλάση, η υπεροξειδάση της δισμουτάσης, η περοξειδάση της γλουταθειόνης και η τρανσφεράση της γλουταθειόνης αυξάνονται παρουσία του H₂S. Επίσης η αυξημένη παραγωγή γλουταθειόνης συνεισφέρει στην κυτταροπροστατευτική επίδραση του H₂S στο ενδοθήλιο [16]. Σύμφωνα με τους Hilde et al. μετά από χορήγηση εξωγενούς υδρόθειου ελαττώνεται η οξείδωση της LDL που επάγεται από το HOC1 [29]. Εν τέλει οι περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι το υδρόθειο δεν έχει άμεση αντιοξειδωτική δράση, αλλά μόνο έμμεση, διεγείροντας τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Ένα παράδειγμα που ξεχωρίζει στην βιβλιογραφία είναι η επαγωγή της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf-2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), ο οποίος συμμετέχει στην μεταγραφή πολλών αντιοξειδωτικών παραγόντων. Το H₂S σουλφυδρυλιώνει την KEAP-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) στην κυστεΐνη 151, με αποτέλεσμα να επάγει την αποικοδόμησή της. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελεί ένα αρνητικό ρυθμιστή της δράσης του Nrf-2 δηλαδή όταν η KEAP-1 σχηματίζει διμερές με τον Nrf-2 εμποδίζει την είσοδο του μεταγραφικού παράγοντα στον

πυρήνα [30-33]. Επιπρόσθετα το H₂S ρυθμίζει την μιτοχονδριακή λειτουργία. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι ένας ισχυρός και αντιστρεπτός ανταγωνιστής της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, αμβλύνοντας την κυτταρική αναπνοή και μειώνοντας την παραγωγή ATP. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις διεγείρει αντιοξειδωτικές λειτουργίες του μιτοχονδρίου και μειώνει την παραγωγή ROS [6].

Σημαντικό ρόλο έχει το H₂S και στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης και συνολικά του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Επεμβαίνει σε διάφορες φάσεις στον κυτταρικό κύκλο καρκινικών κυττάρων [34]. Το H₂S μειώνει τον πληθυσμό των κυττάρων που βρίσκονται στην φάση G₁-G₀ και συγχρονίζει τον κυτταρικό πληθυσμό στην φάση σύνθεσης (S) ρυθμίζοντας της έκφραση της πρωτεΐνης p21, που αποτελεί μία ανασταλτική πρωτεΐνη των κινασών εξαρτώμενων από κυκλίνη (CDKs). Δηλαδή η p21 αντιδρά με το σύμπλεγμα κυκλίνης-CDK, και αναστέλλει την λειτουργία της κινάσης εμποδίζοντας την αλλαγή φάσης στον κυτταρικό κύκλο. Επιπλέον σε ηπατικά κύτταρα η έλλειψη της CSE προκαλεί συντονισμό στην φάση G₁-G₀ και μειώνει τον κυτταρικό πληθυσμό που βρίσκεται στην φάση S γεγονός που αντιστρέφεται μετά από την εξωγενή χορήγηση H₂S. Επίσης το H₂S έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει το μονοπάτι PI3K (κινάση 3 των φωσφοϊνοσιτιδίων) /Akt. Αυξάνει την έκφραση και τη φωσφορυλίωση της Akt (πρωτεϊνική κινάση B), μία κινάση σερίνης/θρεονίνης που ρυθμίζει πολλές δραστηριότητες του κυττάρου, όπως την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό και ανταγωνίζεται την κυτταρική απόπτωση. Αλλά και των ERK_{1/2} (extracellular signal-regulated kinases), που αποτελούν μέλος της οικογένειας των MAPK κινασών (mitogen-activated protein kinase). Είναι ένα σημαντικό μόριο τελεστής στη μεταγωγή σημάτων, εξαρτώμενη από την κινάση Ras, επειδή φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες, μετά από την μιτογόνο διέγερση. Συνολικά τα παραπάνω στοιχεία συνιστούν πως το H₂S αποτελεί ένα παράγοντα που διεγείρει τον πολλαπλασιασμό σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα εν μέρει παρεμβαίνοντας στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [6, 17].

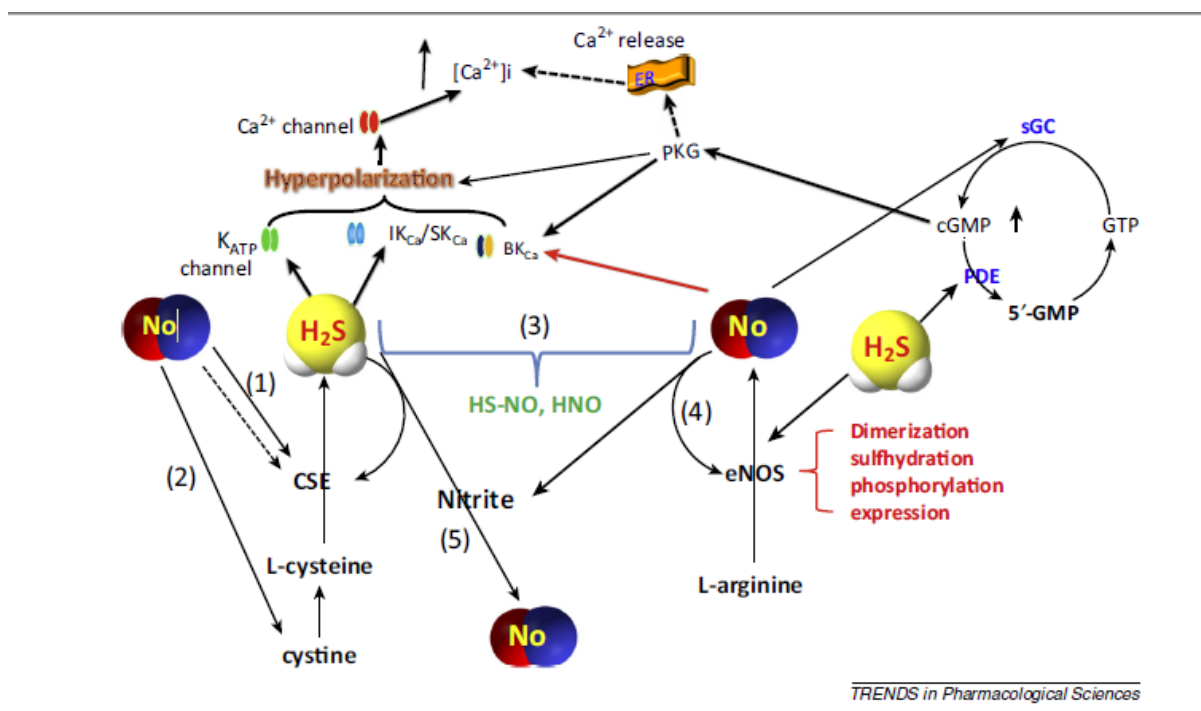
Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από το H₂S συμβαίνει και σε φυσιολογικά κύτταρα και σε ορισμένες περιπτώσεις διαφοροποιείται σημαντικά από την επίδρασή του στα καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα είναι γνωστό ότι ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Φαίνεται από έναν αριθμό ερευνητικών εργασιών πως το H₂S αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και επάγει την απόπτωσή τους. Δηλαδή παρατηρείται μια βιολογική λειτουργία που διαφοροποιείται από την δράση του H₂S στον καρκίνο, όπου συμβάλλει στο ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν είναι σαφής. Υποστηρίζεται ότι δρα σταθεροποιώντας την p53 (Tumor protein p53), που αποτελεί παράγοντα διέγερσης της απόπτωσης και του κυτταρικού θανάτου, αλλά και επάγοντας την δραστηριότητα της αποπτωτικής

Bax (BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator), χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) [22, 24].

3.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών αέριων διαβιβαστών

Οι γνώσεις μας σήμερα γύρω από την φυσιολογία των αέριων σηματοδοτικών μορίων υποδεικνύουν πως τα τρία αέρια NO, CO και H₂S δεν λειτουργούν ανεξάρτητα, αλλά συνεργάζονται και αλληλεπιδρούν εξασφαλίζοντας την ρύθμιση πολλών βιολογικών λειτουργιών. Το τελικό φυσιολογικό αποτέλεσμα είναι συνισταμένη των ξεχωριστών δράσεών τους, ανάλογα με τον ιστό που μελετάται.

Εκτός του H₂S που η βιοσύνθεση του έχει παρουσιαστεί αναλυτικά, το NO αποτελεί το καλύτερα μελετημένο μόριο και παράγεται στους περισσότερους ιστούς και κύτταρα, τόσο με την δράση ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις αμινοξέων (L-αργινίνης), αλλά και με μη ενζυμικές αντιδράσεις. Τα ένζυμα που το παράγουν ονομάζονται συνθετάσες του μονοξειδίου του αζώτου και έχουν τρεις ισομορφές: την ενδοθηλιακή συνθετάση του NO (eNOS) που αποτελεί το κύριο ένζυμο που εκφράζεται στο αγγειακό ενδοθήλιο, την επαγωγίμη συνθετάση του NO (iNOS), που υπερεκφράζεται σε φλεγμονή και την νευρωνική συνθετάση του NO (nNOS) που εκφράζεται σε συγκεκριμένους νευρώνες του εγκεφάλου. Το CO απελευθερώνεται από την αντίδραση αποικοδόμησης της αίμης, μέσω της καταλυτικής δράσης της οξυγενάσης της αίμης (HO-1 και HO-2). Ταυτόχρονα, απελευθερώνεται μπιλιβερδίνη, που ταχύτατα μετατρέπεται σε χολερυθρίνη [2, 35].



Εικόνα 7: Κάποιες από τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο NO και H₂S [23]

Η πιο καλά μελετημένη αλληλεπίδραση είναι ανάμεσα στο NO και το H₂S που θα μας απασχολήσει ιδιαίτερα στην παρούσα εργασία. Τα δύο μόρια δρουν σε πολλά κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια. Μάλιστα το ένα αέριο φαίνεται να επηρεάζει άμεσα την έκφραση και ενεργοποίηση των ενζύμων παραγωγής του άλλου, χωρίς όμως να υπάρχει σαφής εικόνα του μηχανισμού, αφού πολλά στοιχεία από την βιβλιογραφία είναι συχνά αντιφατικά. Πιο συστηματική μελέτη έχει γίνει στο ενδοθήλιο και στο καρδιαγγειακό σύστημα από όπου προέρχεται και η πλειονότητα των πληροφοριών [36].

Στο καρδιαγγειακό το H₂S αποτελεί έναν καθοριστικό διεγέρτη των σηματοδοτικών μονοπατιών του NO. Η συγκεκριμένη ρύθμιση συμβαίνει σε πολλά επίπεδα. Αρχικά υπάρχει απευθείας αντίδραση μεταξύ των δύο μορίων με αποτέλεσμα τον σχηματισμό S-νιτροσοθειολών που μεταβάλλουν τις βιολογικές δραστηριότητες των αερίων. Βέβαια οι βιοχημικές αντιδράσεις ανάμεσα στο NO και το H₂S παρουσιάζουν πολυπλοκότητα, λόγω των πολλών μεταβολιτών και παραπροϊόντων που προκύπτουν κατά την διάλυση των αερίων στα βιολογικά υγρά ή στο καλλιεργητικό υλικό των κυττάρων. Πάντως ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως το H₂S έχει την ικανότητα να αντιδρά με μεταβολίτες του NO, όπως τα νιτρικά, οι νιτροσοθειόλες και τα υπεροξυνιτρώδη ιόντα. Αυτές οι ενώσεις αποτελούν στην ουσία “βιολογικές αποθήκες” του αερίου NO, που απελευθερώνεται όταν αντιδράσουν με το H₂S, διεγείροντας βιολογικές αποκρίσεις όπως την αγγειογένεση, την διαστολή των αγγείων κ.α [37]

Ένα δεύτερο επίπεδο ρύθμισης εντοπίζεται στην οδό PI3K / Akt. Γνωρίζουμε πως η eNOS φωσφορυλιώνεται από την Akt, στην Ser1177, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται και να καταλύει την παραγωγή NO. Πολλές μελέτες σε ενδοθηλιακά κύτταρα υποστηρίζουν πως το H₂S ενισχύει αυτή την οδό, επάγοντας την ενεργοποίηση της Akt μέσω φωσφορυλίωσης της Ser493 του ενζύμου. Η ενεργοποίησή της Akt μέσω της συγκεκριμένης φωσφορυλίωσης εξαρτάται από τα επίπεδα της (3,4,5)-τριφωσφορικής φωσφατυδυλοινοσιτόλης (PIP3), η οποία σχηματίζεται από την (3,4)-διφωσφορική φωσφατυδυλοινοσιτόλη (PIP2) με την καταλυτική δράση της κινάσης PI3K. Είναι ασαφές αν το H₂S δρα άμεσα σουλφυδρυλιώνοντας την PI3K με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή της. Όμως έχει βρεθεί πως το H₂S σουλφυδρυλιώνει το ένζυμο PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) στην Cys124 αναστέλλοντας την δράση του. Το PTEN φυσιολογικά εξισορροπεί τα επίπεδα της PIP3, μετατρέποντας την ξανά σε PIP2, άρα ανταγωνίζεται την PI3K και την ενεργοποίηση της Akt. Επίσης το H₂S αναστέλλει και την φωσφατάση PTP1B (protein-tyrosine phosphatase 1B) σουλφυδρυλιώνοντας την Cys215. Η PTP1B φυσιολογικά αναστέλλει την φωσφορυλίωση της IRS1 (Insulin receptor substrate 1) προκαλώντας μια σημαντική μείωση στην συγγένεια της IRS1 με την υπομονάδα p85 της PI3K, με αποτέλεσμα την αναστολή της φωσφορυλίωσης της Akt.

Συμπερασματικά από κοινού οι σουλφυδρυλιώσεις στην PTEN και την PTP1B, που έχουν ως συνέπεια την αναστολή τους, εξηγούν την ενίσχυση της φωσφορυλίωσης της Akt και την επαγόμενη ενεργοποίηση της eNOS [36].

Το τρίτο επίπεδο αλληλεπίδρασης λαμβάνει χώρα απευθείας πάνω στην ίδια την eNOS. Το H₂S γνωρίζουμε πλέον ότι σουλφυδρυλιώνει την Cys443 της eNOS με αποτέλεσμα να διεγείρει την καταλυτική δραστηριότητα της eNOS. Επιπλέον ευνοεί την διμερή διαμόρφωση του ενζύμου η οποία είναι πιο αποδοτική ως προς την παραγωγή NO συγκριτικά με την παραγωγή υπεροξειδίων, η οποία ευνοείται κυρίως στην μονομερή κατάσταση της eNOS [38]. Επίσης έχει παρατηρηθεί σε κάποια πειραματικά μοντέλα αύξηση της έκφρασης της eNOS, μετά την χορήγηση κάποιων δοτών H₂S, και αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων του mRNA της eNOS.

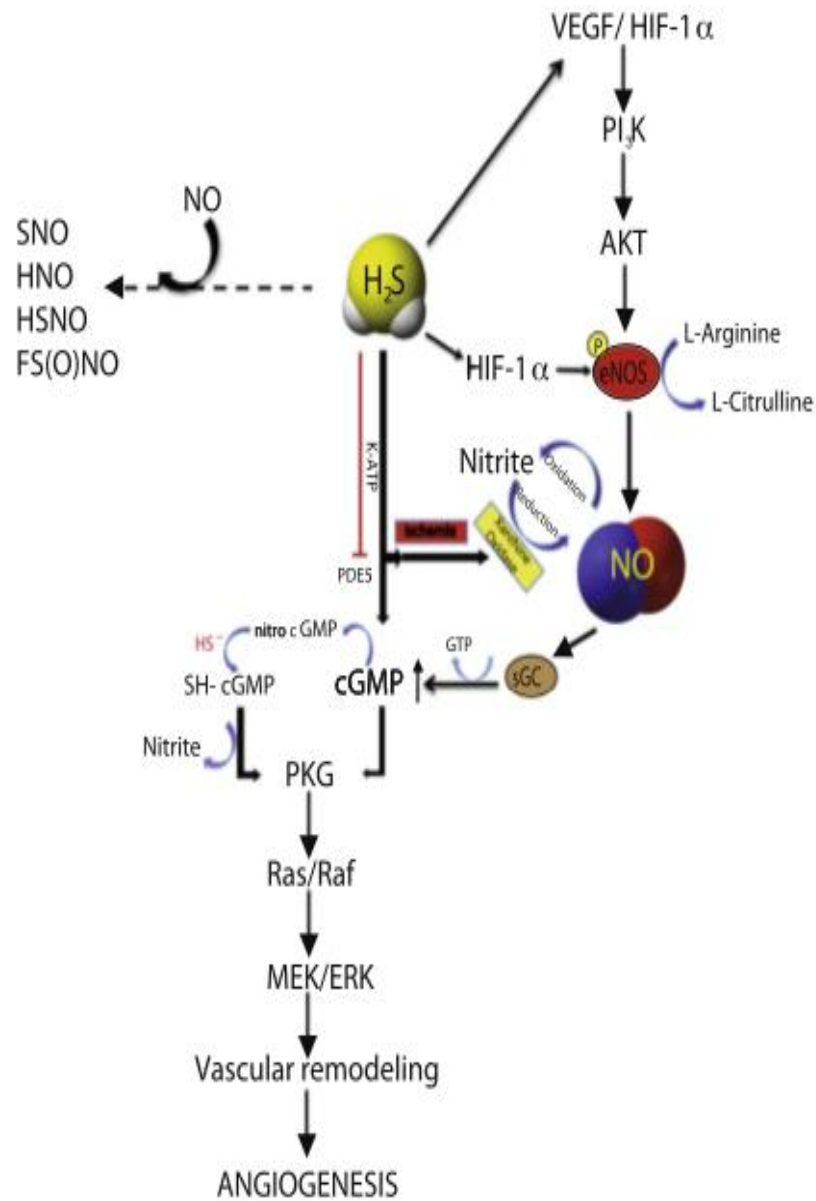
Τέταρτον αξίζει να σημειωθεί ότι η eNOS είναι ένα ένζυμο που η ενεργοποίηση και η έκφραση της εξαρτώνται από τα ενδοκυττάρια επίπεδα Ca²⁺. Το H₂S φαίνεται να αυξάνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου σε ενδοθηλιακά κύτταρα, χωρίς όμως να υπάρχει σαφής άμεση σύνδεση αιτίου-αποτελέσματος με μια αντίστοιχη αύξηση στην έκφραση της eNOS [36].

Τέλος η πιο καλά μελετημένη αλληλεπίδραση βρίσκεται καθοδικά των δύο αερίων και έχει να κάνει με την ρύθμιση των επιπέδων της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP). Το NO ενεργοποιεί την διαλυτή γουνυλική κυκλάση (sGC), αντιδρώντας με την ομάδα αίμης του ενζύμου. Έτσι καταλύεται ο σχηματισμός cGMP από τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP). Το H₂S παρεμβαίνει στον κύκλο, αναστέλλοντας την φωσφοδιεστεράση-5 (PDE-5), ένζυμο που κανονικά συμβάλλει στην αποικοδόμηση της cGMP. Έτσι το H₂S οδηγεί σε συσσώρευση cGMP στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, που συνεπάγεται ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης G (PKG) και αγγειοχάλαση. Έτσι το H₂S αποτελεί σε συνέργεια με το NO έναν σημαντικό ρυθμιστή της αρτηριακής πίεσης. Ως αποτέλεσμα η μελέτη της φαρμακολογίας του αερίου αφορά και τις αντιυπερτασικές του ιδιότητες [36, 39].

Επιπρόσθετα στα παραπάνω το H₂S φαίνεται να ενισχύει την παραγωγή cGMP δρώντας και άμεσα στην sGC. Συγκεκριμένα σταθεροποιεί την ανηγμένη μορφή του ενζύμου που ευνοεί την αντίδρασή του με το NO και έτσι την ενεργοποίησή του. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι με την φαρμακολογική αναστολή της eNOS, εξασθενεί η αγγειοχάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων που έχει προκληθεί προηγουμένως από το H₂S. Αντιστρόφως η αναστολή της CSE, καταργεί την υπερσυσσώρευση cGMP και την προκαλούμενη από αυτή αγγειοχάλαση [36].

Συμπερασματικά η αλληλεπίδραση των δύο αερίων παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, παρέχει νέα δεδομένα για τον τρόπο ρύθμισης φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών μηχανισμών και

παράλληλα αναδεικνύει νέες δυνατότητες στην φαρμακολογική παρέμβαση με άξονα τους αέριους διαβιβαστές.



Εικόνα 8 : Η αλληλεπίδραση του H₂S και του NO στο μονοπάτι της PI3K/Akt και στην ρύθμιση των επιπέδων της cGMP με τελικό βιολογικό αποτέλεσμα την διέγερση της αγγειογένεσης (16)

3.3 Τα επίπεδα H₂S σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις

Όπως γίνεται αντιληπτό το H₂S αποτελεί ένα σηματοδοτικό μόριο που επηρεάζει την δραστηριότητα πολλών βιοχημικών μονοπατιών, τα οποία ρυθμίζουν πολλές διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες. Έτσι εμπλέκεται και σε έναν μεγάλο αριθμό παθολογικών καταστάσεων, που προκύπτουν από διαταραχές στην φυσιολογική λειτουργία των σηματοδοτικών μονοπατιών. Βέβαια ο μεγάλος αριθμός μοριακών στόχων που σουλφυδρυλιώνει το H₂S, το γεγονός πως η διαδικασία αυτή άλλοτε επάγει την ενεργοποίηση πρωτεϊνών και άλλοτε την αναστέλλει, ενώ και το κλινικό αποτέλεσμα αυτής της επίδρασης άλλοτε είναι ωφέλιμο για τον οργανισμό και άλλοτε τοξικό και εξαρτώμενο από την συγκέντρωση, δημιουργεί μια πολυπλοκότητα στην ταξινόμηση των ρόλων του H₂S και της σημασίας του σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Από την μία υπάρχουν ασθένειες όπου υπάρχει τοπική ή συστημική έλλειψη H₂S, είτε λόγω μείωσης της ενδογενούς παραγωγής H₂S, είτε λόγω αυξημένης αποικοδόμησης και απομάκρυνσης του αερίου. Παραδείγματα τέτοιων καταστάσεων είναι το άσθμα, η υπέρταση, η βλάβη από ισχαιμία – επαναιμάτωση, η ανεπάρκεια του μυοκαρδίου και αγγειακές επιπλοκές σε διαβητικούς. Από την άλλη, υπάρχουν άλλες ασθένειες, όπου παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση H₂S, λόγω υπερέκφρασης των ενζύμων παραγωγής του [6].

Τέτοιες περιπτώσεις είναι διάφορες μορφές καρκίνου. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου στο κόλον. Τα καρκινικά κύτταρα της συγκεκριμένης νεοπλασίας παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της CBS. Το αυξημένο παραγόμενο H₂S επάγει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα [27]. Επίσης μια μελέτη συνδέει την υπερέκφραση της CSE με τον καρκίνο του μαστού. Το γεγονός παρατηρήθηκε και σε ιστό, αλλά και σε καρκινικές σειρές, και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του πολλαπλασιασμού και την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Η λειτουργία της CSE στον καρκίνο του μαστού εξαρτάται από τις οδούς σηματοδότησης που εξαρτώνται από τον STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), που αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που φωσφορυλιώνεται από υποδοχέα που συνδέεται με Janus κινάση (JAK). Είναι ρυθμιστής κρίσιμων κυτταρικών λειτουργιών συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης σε μια ευρεία ποικιλία ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων, μέσω ενεργοποίησης της έκφρασης σχετικών γονιδίων. Ο STAT3 συνδέεται άμεσα με τον υποκινητή του γονιδίου που εκφράζει την CSE με αποτέλεσμα να αυξάνεται η έκφραση της στον καρκίνο του μαστού [40].

Επιπλέον τα δεδομένα γίνονται ακόμη πιο πολύπλοκα αν λάβουμε υπόψη την εξέλιξη και κλιμάκωση μιας παθολογικής κατάστασης. Είναι χαρακτηριστικό το παράδειγμα της

αθηροσκλήρωσης που αποτελεί βασική αιτία πολλών καρδιαγγειακών νοσημάτων. Τα επίπεδα H_2S μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της αθηρωματικής πλάκας. Εργασία σε καρωτιδικές πλάκες έδειξε πως υπάρχει υπερέκφραση της CSE και της CBS σε ασταθείς καρωτιδικές πλάκες, όπου υπάρχει έντονη φλεγμονή, εκτεταμένος νεκρωτικός λιπιδικός πυρήνας και λεπτή ινώδης κάψα, έναντι των σταθεροποιημένων πλακών χαμηλού κινδύνου [41]. Το H_2S μπορεί να αναπτύσσει αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση και να περιορίζει την ανάπτυξη της πλάκας σε αρχικά στάδια εξέλιξης της αθηρωμάτωσης. Μπορεί όμως σε προχωρημένη αθηροσκλήρωση να επάγει την αγγειογένεση και να περιορίζει την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος, δράσεις που συμβάλλουν στην αποσταθεροποίηση της πλάκας και την αύξηση των κινδύνων ρήξης, θρόμβωσης και πρόκλησης οξέος ισχαιμικού επεισοδίου.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η φαρμακολογική αντιμετώπιση σημαντικών παθήσεων μέσω της επίδρασης στα επίπεδα H_2S , αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον, υποσχόμενο, αλλά ταυτόχρονα σύνθετο ζήτημα που θα παρουσιαστεί αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο.

4. Φαρμακολογικές προσεγγίσεις με στόχευση το H₂S

Οι νέες ανακαλύψεις ως προς την δράση του H₂S οδήγησαν τις τελευταίες δεκαετίες σε αυξημένο ενδιαφέρον ως προς τα φαρμακολογικά οφέλη του νέου αερίου διαβιβαστή. Οι δύο λογικές φαρμακολογικής παρέμβασης εστιάζουν: 1) στην αύξηση των επιπέδων H₂S στα βιολογικά συστήματα μέσω μορίων που έχουν την δυνατότητα να απελευθερώνουν H₂S και χαρακτηρίζονται ως δότες H₂S και 2) στον σχεδιασμό αναστολέων της ενδογενούς παραγωγής του H₂S, που συνήθως αναστέλλουν την δράση ενός ή περισσότερων από τα τρία ένζυμα που το βιοσυνθέτουν [4].

4.1. Μόρια που λειτουργούν ως δότες H₂S

Η χορήγηση H₂S μπορεί να πραγματοποιηθεί από έναν μεγάλο αριθμό μορίων που χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση την ταχύτητα απελευθέρωσης του αερίου H₂S. Έτσι έχουμε τους δότες που ταχύτατα αποδίδουν H₂S και άλλους δότες που απελευθερώνουν H₂S αργά. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα θειούχα άλατα, όπως το Na₂S και το NaHS. Στην δεύτερη κατηγορία, το GYY4137 αποτελεί το πρωτότυπο μόριο που έχει χρησιμοποιηθεί στο μεγαλύτερο αριθμό ερευνητικών εργασιών [4].

4.1.1 Ταχείς-δότες H₂S: Ανόργανα Θειούχα Άλατα

Αποτελούν τον πιο κοινό τρόπο για να χορηγηθεί H₂S φαρμακολογικά σε ένα βιολογικό σύστημα. Στην κατηγορία ανήκουν τα θειούχα άλατα (NaHS και Na₂S) [4] οι ιδιότητες των οποίων θα παρουσιαστούν αναλυτικά, αφού στην συγκεκριμένη εργασία αποτέλεσαν την βάση για την μελέτη των ιδιοτήτων του εξωγενώς χορηγούμενου H₂S.

Αν και χαρακτηρίζονται ως “δότες” στην πραγματικότητα δεν απελευθερώνουν H₂S, αλλά απλά δίστανται αυθόρμητα με τρόπο εξαρτώμενο από το PH. Ανάμεσα στα χημικά προϊόντα που προκύπτουν από την διάλυσή τους είναι το αέριο H₂S. Η χορήγησή τους αρχικά προκαλεί μία μεγάλη αύξηση στην συγκέντρωση του αερίου στο βιολογικό σύστημα, η οποία στην συνέχεια μειώνεται ραγδαία λόγω διαφυγής στην ατμόσφαιρα. Γι’ αυτό η παρασκευή διαλυμάτων που περιέχουν ανόργανα θειούχα άλατα πρέπει να γίνεται την ώρα του πειράματος και να χρησιμοποιούνται ακαριαία. Ενδεικτικά σε in vitro μελέτες ο χρόνος απελευθέρωσης H₂S από τα θειούχα άλατα κυμαίνεται μόλις στα 5-30 λεπτά [6].

Η σχέση συγκέντρωσης – φαρμακολογικής απόκρισης δεν είναι τέλεια αποσαφηνισμένη. Όμως φαίνεται από τις περισσότερες δημοσιευμένες ερευνητικές εργασίες ότι σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις οι ταχείς δότες δίνουν φυσιολογικά ή ωφέλιμα φαρμακολογικά αποτελέσματα, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις πολύ τοξικά. Για παράδειγμα σε χαμηλές δόσεις της τάξης των 1-100μΜ σε *in vitro* μελέτες, οι ταχείς δότες H₂S ασκούν προστατευτική δράση στα κύτταρα, διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη, προκαλούν την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση του H₂S. Αντίστοιχα σε *in vivo* πειράματα ελαττώνουν την αρτηριακή πίεση, ασκούν προστατευτική δράση σε βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, σε μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας, σε φλεγμονώδεις νόσους των αγγείων και του νευρικού συστήματος. Αντίθετα σε μεγαλύτερες δόσεις αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, προκαλούν σοβαρή κυτταροτοξικότητα, αυξάνουν την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών [6, 42].

Για την φαρμακολογική δράση των γρήγορων δοτών H₂S έχει προταθεί ένας πιθανός μηχανισμός που εν μέρη εξηγεί την διαφορετική τους δράση από τους αργούς δότες H₂S. Υποδεικνύει πως η δράση του δότη οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στην παροδική αναστολή της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, ως αποτέλεσμα παροδικής αναστολής του συμπλέγματος IV, που πραγματοποιείται λόγω στιγμιαίας πολύ υψηλής συγκέντρωσης H₂S κατά την αρχική χορήγηση. Έτσι προκαλείται αναστολή στην παραγωγή ATP και μια κατάσταση στιγμιαίας χημικώς επαγόμενης υποξίας [43]. Αυτή η κατάσταση που διαμορφώνεται στο κύτταρο έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών που παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο για τις βιολογικές δράσεις του H₂S. Το φαινόμενο προσομοιάζει την ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών που λαμβάνει χώρα σε ισχαιμική προετοιμασία του μυοκαρδίου (preconditioning). Η ισχαιμική προετοιμασία του μυοκαρδίου αποτελεί φαινόμενο κατά το οποίο μικρά επαναλαμβανόμενα διαστήματα ισχαιμίας επαναιμάτωσης, που προκαλούνται φυσικά ή φαρμακολογικά, πριν το έμφραγμα του μυοκαρδίου, καταλήγουν να μειώνουν την έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Μάλιστα ερευνητικές ομάδες που εξειδικεύονται επί του θέματος έχουν δείξει ότι τα θειούχα άλατα πράγματι επάγουν τις βιοχημικές αποκρίσεις που προκαλεί η ισχαιμική προετοιμασία, αλλά και η μετσχαιμική προστασία (postconditioning) [35, 44, 45].

Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι τα θειούχα άλατα προκαλούν μια σημαντική αύξηση των επιπέδων της cGMP [46]. Ο συγκεκριμένος μοριακός στόχος σηματοδοτεί πολλές από τις επιδράσεις του H₂S στο καρδιαγγειακό (π.χ την αντιυπερτασική και αγγειογενετική δράση), μέσω της αλληλεπίδρασης με το NO, όπως παρουσιάστηκε παραπάνω. Αυτή η φαρμακολογική δράση είναι χαρακτηριστική ιδιότητα των γρήγορων δοτών H₂S. Φαίνεται πως τα επίπεδα του cGMP είναι πιο πιθανόν να επηρεάζονται κατά την γρήγορη χορήγηση H₂S και την πρόκληση μιας αρχικά υψηλής

συγκέντρωσης H_2S , παρά με την αργή χορήγηση H_2S [46]. Ένα παράδειγμα της φαρμακολογικής σημασίας του φαινομένου αποτελεί συγκριτική μελέτη μεταξύ του γρήγορου δότη Na_2S και του GYY4137, της thioalpin και του AP39 (οργανικοί δότες που θα παρουσιαστούν στην επόμενη ενότητα) η οποία έδειξε πως όλοι οι δότες ελάττωσαν το μέγεθος του εμφράγματος σε in vivo μοντέλο ισχαιμίας επαναιμάτωσης, αλλά και βελτίωσαν την επιβίωση των καρδιομυοκυττάρων μετά την έκθεσή τους σε H_2O_2 , που προσομοιάζει την κατάσταση που παρατηρείται στην υποξία. Ανάμεσά τους όμως μόνο ο γρήγορος δότης Na_2S μείωσε το μέγεθος του εμφράγματος κατά τρόπο εξαρτώμενο από την eNOS και την cGMP, αφού κατά την ταυτόχρονη αναστολή της eNOS, ο δότης Na_2S δεν μπόρεσε να μειώσει στατιστικά σημαντικά το μέγεθος του εμφράγματος [47]. Συμπεραίνουμε ότι παρά τους πολλαπλούς στόχους του H_2S η συγκέντρωσή του, αλλά και το περιβάλλον που βρίσκεται παίζουν σημαντικό ρόλο στο τελικό βιολογικό αποτέλεσμα και στα μονοπάτια που θα ενεργοποιηθούν ή θα ανασταλούν από το H_2S . Υποδηλώνει ότι μπορεί με κατάλληλο σχεδιασμό να υπάρξει εκλεκτικότητα στην δράση των δοτών και μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών.

Η φαρμακοκινητική των θειούχων αλάτων παρουσιάζει επίσης σημαντικά προβλήματα. Η χορήγησή τους σε πειραματόζωα γίνεται κυρίως παρεντερικά, με ενδοπεριτοναϊκή ένεση. Έτσι πάλι παρατηρείται αρχικά μια πολύ υψηλή συγκέντρωση στην γενική κυκλοφορία του αίματος, που πολύ γρήγορα απομακρύνεται. Η per os χορήγηση παρουσιάζει επιπλέον ελαττώματα κυρίως λόγω της άγνωστης βιοδιαθεσιμότητας του δότη. Το γεγονός πως στο εντερικό επιθήλιο φυσιολογικά αναπτύσσεται ισχυρός βιολογικός φραγμός έναντι του H_2S που παράγεται από κάποια βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας, εγείρει τον προβληματισμό ως προς την τελική συγκέντρωση του H_2S που επιτυγχάνεται στην γενική κυκλοφορία του αίματος [6].

Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο που αποτέλεσε πηγή προβληματισμού και στην συγκεκριμένη εργασία είναι πως τα βιολογικά αποτελέσματα των γρήγορων δοτών H_2S εμφανίζονται αρκετά μεταγενέστερα από τον χρόνο χορήγησης του δότη. Δηλαδή παρ' ότι ο δότης αρχικά προκαλεί μια υψηλή κορυφή στην συγκέντρωση του χορηγούμενου H_2S και απομακρύνεται μέσα σε μερικά λεπτά συχνά οι φαρμακολογικές δράσεις παρατηρούνται μετά από διάστημα 24 με 48 ωρών. Το φαινόμενο εκδηλώνεται και μετά από μια απλή χορήγηση δότη, χωρίς να μεσολαβούν πολλές ενδιάμεσες επαναλήψεις [6].

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω χαρακτηριστικά, πρέπει να είναι σαφές ότι οι ταχύς δότες H_2S δεν προσφέρονται για την μελέτη των φυσιολογικών ρόλων του ενδογενώς παραγόμενου H_2S , καθώς ο ρυθμός απελευθέρωσης H_2S φυσιολογικά από τους ιστούς είναι πολύ πιο αργός. Επιπλέον η χρήση τους από τον άνθρωπο καθίσταται αδύνατη, εξαιτίας των φαρμακοδυναμικών και

φαρμακοκινητικών τους χαρακτηριστικών [5]. Ενδεικτικά η δυσάρεστη οσμή, η δυσκολία ελέγχου του αερίου H_2S που απελευθερώνεται στον οργανισμό σε συνδυασμό με το στενό θεραπευτικό εύρος και την υψηλή τοξικότητα, ο πολύ μικρός χρόνος ημιζωής, η αδυναμία χορήγησης per os αποτελούν τους βασικούς παράγοντες που καθιστούν τα θειούχα άλατα, φάρμακα ακατάλληλα για ανθρώπινη χορήγηση.

Παρ' όλα αυτά η πλειονότητα των δημοσιευμένων ερευνητικών εργασιών που σχετίζονται με το H_2S χρησιμοποιούν για την χορήγηση H_2S γρήγορους δότες, με αποτέλεσμα να παρέχουν ένα μεγάλο όγκο δεδομένων για την βιολογική δράση του H_2S . Μπορούν να συμβάλλουν γενικά στην μελέτη των κλινικών, βιολογικών και τοξικών επιδράσεων του χορηγούμενου H_2S σε πειραματόζωα και καλλιέργειες κυττάρων, ανεξάρτητα με το γεγονός πως δεν αντιστοιχίζεται πάντα αυτή η βιολογική δράση με την ενδογενή παραγωγή H_2S και πως δεν μπορούν οι ίδιοι να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση [4, 42].

Τέλος αξίζει φυσικά να σημειωθεί πως έχουν γίνει προσπάθειες πειραματικά να χορηγηθεί με σταθερό ρυθμό υδρόθειο που εκλύεται από θειούχα άλατα σε πειραματόζωα, αλλά και στον άνθρωπο. Η μία προσέγγιση εστιάζει στην χορήγηση του μέσω μικρο υπολογιστικών αντλιών (micropumps) [48]. Η δεύτερη περιλαμβάνει την ανάπτυξη ενός φαρμακευτικού σκεύασματος για παρεντερική έγχυση H_2S . Το φάρμακο ονομάστηκε IK-1001 και αποτελεί διάλυμα του Na_2S σε φυσιολογικό ορό για ενδοφλέβια χορήγηση. Η χορήγηση μπορεί να είναι στιγμιαία, σταθερής έγχυσης ή συνδυασμός των δύο. Το σκεύασμα χρησιμοποιήθηκε σε πολλά προκλινικά μοντέλα ασθενειών, όπως ισχαιμίας – επαναιμάτωσης. Πέρασε στην φάση I κλινικών μελετών όπου χρησιμοποιήθηκε σε δείγμα υγιών εθελοντών, προσδιορίστηκε η δόση, ο μεταβολισμός και η απομάκρυνση από τους πνεύμονες. Όμως η ανάπτυξή του σταμάτησε στην φάση II των κλινικών μελετών [6].

4.1.2 Επιθυμητά φαρμακολογικά - φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά των δοτών H_2S

Με βάση τα παραπάνω προέκυψε η αναγκαιότητα να συντεθούν δότες H_2S που θα φέρουν βελτιωμένα φυσικοχημικά, φαρμακολογικά και φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά, ώστε να προχωρήσει η χρήση τους σε κλινικές μελέτες ως φάρμακα που προορίζονται για την αντιμετώπιση ανθρώπινων παθήσεων στις οποίες παρατηρείται μείωση της ενδογενούς παραγωγής H_2S [6]. Ιδιαίτερο βάρος δόθηκε κατ' αρχάς στο προφίλ απελευθέρωσης του αερίου. Ο ρυθμός απελευθέρωσης επιδιώκεται να προσομοιάζει περισσότερο την φυσιολογική παραγωγή H_2S από τους ιστούς. Θέλουμε να είναι σίγουρα πιο αργός από τα θειούχα άλατα, σταθερότερος και συχνά

επαγόμενος από τις συνθήκες στα βιολογικά υγρά. Επίσης η χημική τους δομή πρέπει να είναι βιολογικά συμβατή, όπως και τα παραπροϊόντα και οι μεταβολίτες τους. Σημαντική πρόκληση αποτελεί επίσης η ανάπτυξη φαρμάκων που απελευθερώνουν H_2S με αποσαφηνισμένη σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης, με βελτιωμένο θεραπευτικό εύρος και τοξικολογικό προφίλ, με περιορισμένες ανεπιθύμητες ενέργειες. Η εξειδίκευση έναντι συγκεκριμένων μοριακών στόχων και παθήσεων αποτελεί ένα αντικείμενο μελέτης, λαμβάνοντας υπόψη τους πολλαπλούς στόχους του H_2S , που η ταυτόχρονη σουλφυδρυλίωσή τους, συχνά οδηγεί σε μη επιθυμητά και αντίθετα αποτελέσματα. Τέλος ζήτημα αποτελεί και ο τρόπος χορήγησης. Σκοπός είναι η ανάπτυξη δοτών που θα μπορούν να χορηγηθούν *per os*, εξασφαλίζοντας ικανοποιητικά επίπεδα H_2S στο αίμα [6].

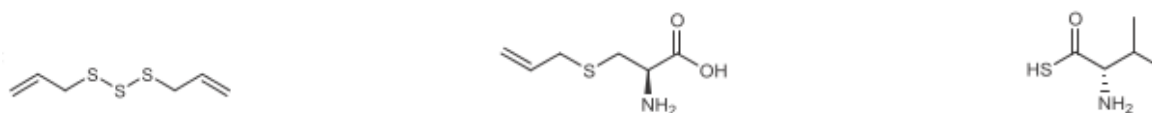
4.1.3 Αργοί οργανικοί δότες H_2S

Πλέον έχει αναπτυχθεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός οργανικών ενώσεων που λειτουργούν ως δότες H_2S . Οι ενώσεις αυτές δεν φέρουν πολλά από τα μειονεκτήματα των ανόργανων θειούχων αλάτων που παρουσιάστηκαν παραπάνω. Παρατηρείται μεγάλη ποικιλία ως προς τις χημικές τους δομές, τον μηχανισμό δράσης, αλλά και τον ρυθμό απελευθέρωσης H_2S , με αποτέλεσμα να είναι αδύναμη η απλή κατηγοριοποίησή τους βάσει του κοινού χαρακτηριστικού της σημαντικά πιο αργής απελευθέρωσης H_2S συγκριτικά με τα θειούχα άλατα. Έτσι διακρίνονται σε δότες που είναι διαλυτοί σε υδατικά διαλύματα, άλλοι που απελευθερώνουν H_2S σε συγκεκριμένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και ακτινοβολίας, άλλοι λειτουργούν ως προφάρμακα που θα υποστούν ενζυμική διάσπαση στον οργανισμό για να δώσουν H_2S , άλλοι δρουν σε συγκεκριμένα κυτταρικά διαμερίσματα όπως το μιτοχόνδριο κ.α [6].

Στην παρούσα εργασία θα γίνει μια ανασκόπηση των πιο χαρακτηριστικών φαρμάκων της κατηγορίας, ώστε να αποτυπωθεί η επιστημονική εξέλιξη στην φαρμακολογική παρέμβαση στα επίπεδα του H_2S . Δεν θα γίνει λεπτομερής περιγραφή όλων των οργανικών δοτών, αφού δεν χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μας πρωτόκολλο, όπως θα παρουσιαστεί στο ειδικό μέρος της εργασίας.

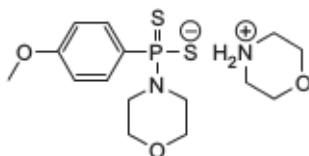
Κατ' αρχάς θα αναφερθούμε στους δότες φυσικής προέλευσης. Στην κατηγορία ανήκουν τα φυσικά εκχυλίσματα και τα πολυσουλφίδια του σκόρδου (*Allium sativum* L), αλλά και ημισυνθετικά τους παράγωγα. Μάλιστα γνωστές φαρμακολογικές ιδιότητες της δρόγης, όπως η αντιυπερτασική και αντιθρομβωτική δράση του σκόρδου, υποστηρίζεται ότι οφείλεται σε ένα βαθμό στην απελευθέρωση H_2S από τα συστατικά του [31, 49]. Τρεις ενώσεις, το diallyl sulfide (DAS), το diallyl disulfide (DADS) και το diallyl trisulfide (DATS), θεωρούνται οι κύριοι εκπρόσωποι της

κατηγορίας των φυσικών συστατικών του σκόρδου. Το DAS αποτελεί έναν αδύναμο δότη H_2S , ενώ το DATS είναι ο κύριος δότης του σκόρδου που απελευθερώνει τις μεγαλύτερες ποσότητες αερίου, ενώ εμφανίζει και τον ταχύτερο ρυθμό απελευθέρωσης, που βέβαια είναι σημαντικά πιο αργός από τον αντίστοιχο των θειούχων αλάτων [50]. Οι συγκεκριμένες ενώσεις υποστηρίζεται ότι απελευθερώνουν H_2S μέσω μιας βιοχημικής αντίδρασης με την γλουταθειονίνη [50], ενώ η δράση τους εστιάζεται στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf-2 που οδηγεί σε ενεργοποίηση πολλών αντιοξειδωτικών μονοπατιών [31]. Εκτός των τριών ενώσεων, δότες αυτής της κατηγορίας είναι η S-allylcysteine (SAC), η S-propargyl- L -cysteine (SPRC), η thioglycine (TG), η L-thiovaline (TV) και η thiocarbamate-functionalized carbonyl sulfide (TCO-1). Αυτοί οι δότες είναι ημισυνθετικοί και φέρουν διαφορετικές χημικές δομές από τα τρία πρώτα συστατικά του σκόρδου. Εμπεριέχουν ως κοινό δομικό χαρακτηριστικό αμινοξικές ομάδες [6].



Εικόνα 9 : Φυσικοί και ημισυνθετικοί δότες υδροθείου. Κατά σειρά DATS, SAC, Thiovalin (6)

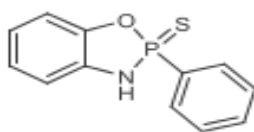
Το πρότυπο μόριο της νεότερης γενιάς των αργών δοτών H_2S και αναμφίβολα το πιο διαδεδομένο και πιο συχνά χρησιμοποιημένο από την επιστημονική κοινότητα είναι το GYY4137 (morpholin-4-ium 4-methoxyphenyl (morpholino) phosphinodithioate). Αποτελεί ένα μόριο με πολλά πλεονεκτήματα βάσει όσων παρουσιάστηκαν στην ενότητα 4.1.2. Χαρακτηρίζεται από αργό ρυθμό απελευθέρωσης H_2S που προσομοιάζει στην ενδογενή παραγωγή H_2S . Πιο συγκεκριμένα απελευθερώνει μικρές ποσότητες H_2S για παρατεταμένη περίοδο, της τάξης μερικών ωρών έως και ημερών, σε υδατικά διαλύματα (pH 7.4, 37 ° C). Επιπλέον, η απελευθέρωση του αερίου H_2S από το GYY4137 είναι εξαρτώμενη από το pH και τη θερμοκρασία. Λιγότερο H_2S απελευθερώνεται στους 4 ° C και μέγιστη ποσότητα H_2S απελευθερώνεται περίπου σε pH 3. Επίσης επειδή είναι πολύ υδατοδιαλυτό μόριο παρέχει την δυνατότητα να διατηρηθεί σε stock και να χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα σε αντίθεση με τους γρήγορους δότες H_2S . Τέλος η σύνθεσή του είναι απλή και τα παρασκευάσματα του χαρακτηρίζονται από υψηλή καθαρότητα, πράγμα που συμβάλλει στον καλό χαρακτηρισμό των χημικών του ιδιοτήτων [51].



Εικόνα 10 : Χημική δομή GYY4137 (50)

Το GYY4137 έχει μελετηθεί διεξοδικά ως προς τις φαρμακολογικές του ιδιότητες σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες. Ιδιαίτερη μελέτη έχει γίνει σε *in vivo* μοντέλα που σχετίζονται με παθήσεις του καρδιαγγειακού . Προκαλεί αγγειοχάλαση μέσω διάνοιξης των K_{ATP} διαύλων των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων [52]. Έχει δείξει αντιφλεγμονώδη δράση μειώνοντας την έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών π.χ τον TNF- α , την IL-1 β , την IL-6 και την L-σελεκτίνη. Έχει πιθανόν ευεργετικά αποτελέσματα στην εξέλιξη της αθηρωματικής βλάβης. Μειώνει συνολικά την φλεγμονή των αγγείων μέσω πολλών μονοπατιών. Μειώνει την έκφραση της ICAM-1, του TNF- α , την ποσότητα του mRNA της IL-6, την ενεργοποίηση του NF- κ B, αλλά και την παραγωγή ελεύθερων ριζών ανιόντος υπεροξειδίου στην αορτή. Επιπλέον αυξάνει την έκφραση της eNOS, μειώνει την έκφραση της iNOS, αυξάνει την φωσφορυλίωση και την έκφραση της PI3K, επάγει την φωσφορυλίωση της Akt στην Ser(473), και αναστέλλει την έκφραση της LOX-1. Επίσης μελέτη έδειξε πως το GYY4137 (αλλά και η θειογλυκίνη) έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Σε ενδοθηλιακά κύτταρα αντιστρέφει την αύξηση, που προκαλεί η επώαση των κυττάρων με TNF- α , στην έκφραση των υπομονάδων της NADPH οξειδάσης, ενός ενζυμικού συμπλέγματος με καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή ROS. Εκτός του καρδιαγγειακού το GYY5137 έχει μελετηθεί και ως προς πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες. Πολλές *in vivo* και *in vitro* μελέτες υποστηρίζουν πως επεμβαίνει στον κυτταρικό κύκλο και προάγει την απόπτωση. Μειώνει την επιβίωση των κυττάρων και μάλιστα εκλεκτικά ως προς τα καρκινικά κύτταρα [51, 53-55].

Το GYY4137 δεν αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα του cGMP σε αντίθεση με τα θειούχα άλατα και τα θειούχα αμινοξέα (θειοβαλίνη και θειογλυκίνη) [56]. Ωστόσο έχουν παρασκευαστεί δομικά ανάλογα του μορίου, όπως το AP105 και AP106 τα οποία απελευθερώνουν ταχύτερα υδρόθειο [57]. Οι ενώσεις αυτές επηρεάζουν τα επίπεδα του cGMP επιβεβαιώνοντας την σημασία που παίζει ο ρυθμός απελευθέρωσης H_2S στην εκλεκτικότητα έναντι συγκεκριμένων στόχων [6]. Επιπλέον άλλο συνθετικό δομικά ανάλογο όπως το FW1256 προκαλεί πιο ισχυρή αναστολή μεσολαβητών της φλεγμονής σε μακροφάγα και σε ποντίκια [58].

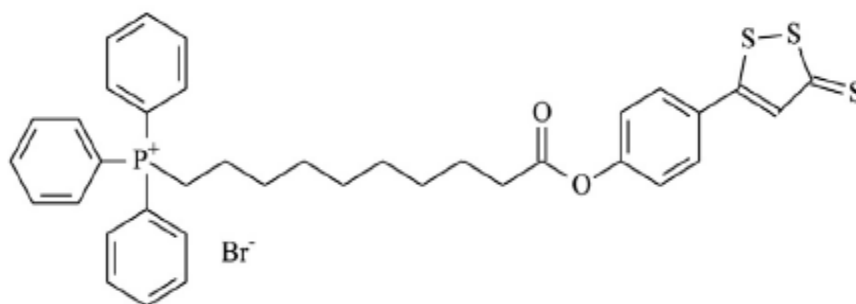


Εικόνα 11 : Δομή FW1256 (57)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μια άλλη κατηγορία οργανικών δοτών H_2S που έχουν την δυνατότητα να εισέρχονται στο μιτοχόνδριο. Ο κυτταρικός εντοπισμός των συγκεκριμένων δοτών είναι ξεχωριστός, αφού γενικά οι κατηγορίες των δοτών H_2S που αναφέραμε ως τώρα, είτε απελευθερώνουν το αέριο χωρίς να εισέρχονται στο κύτταρο και στην συνέχεια το αέριο διαχέεται μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, είτε εισέρχονται στο κύτταρο και απελευθερώνουν H_2S στο κυτταρόπλασμα και τα υπόλοιπα κυτταρικά διαμερίσματα [59].

Η φαρμακολογική στόχευση για την αύξηση των επιπέδων του H_2S στο μιτοχόνδριο έχει μεγάλη σημασία. Στο μιτοχόνδριο, το H_2S παράγεται κυρίως από την 3-MST και ασκεί πληθώρα ενεργειών που σχετίζονται με αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Το πρότυπο μόριο της κατηγορίας είναι το AP39 (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol5yl)-phenoxy)decyl) triphenylphosphonium bromide. Η χημική του δομή χαρακτηρίζεται από μια ομάδα τριφαινυλοφωσφονίου. Το συγκεκριμένο δομικό μοτίβο είναι απαραίτητο για την στόχευση των μιτοχονδρίων και βρίσκεται συζευγμένο με μια ομάδα διθειολεθειόνης (ομάδα υπεύθυνη για την απελευθέρωση H_2S) μέσω μίας αλειφατικής αλυσίδας [60].

Το μόριο παρουσιάζει ιδιαίτερες φαρμακολογικές ιδιότητες. Μελέτη σε ενδοθηλιακά κύτταρα bEnd.3 αναδεικνύει τις αντιοξειδωτικές και κυτταροπροστατευτικές δράσεις υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, το οποίο προκλήθηκε με χορήγηση στην καλλιέργεια οξειδάσης της γλυκόζης. Η προσθήκη του AP39 σε μικρές συγκεντρώσεις (30-300 μM) αύξησε τα επίπεδα του H_2S , κυρίως στο μιτοχόνδριο. Το AP39 άσκησε μια εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση επίδραση στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα, η οποία συνίστατο σε διέγερση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Σε υψηλότερη συγκέντρωση (300 μM) παρατηρήθηκε αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Επίσης η προκατεργασία με AP39 εξασθένησε την αύξηση πολλών δεικτών του οξειδωτικού στρες αλλά και την βλάβη στο μιτοχονδριακό DNA που προκάλεσε η οξειδάση της γλυκόζης [60]. Άλλες μελέτες δείχνουν πως το AP39 δρα ανεξάρτητα από το NO και δεν ενεργοποιεί την οδό cGMP/PKG [47].

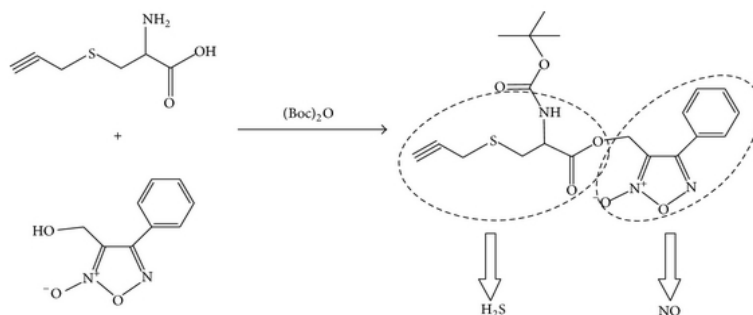


Εικόνα 12 : Χημική δομή AP39 [60]

4.1.4 Μικτοί δότες NO και H₂S

Το γεγονός πως το NO και το H₂S αλληλεπιδρούν και ρυθμίζουν από κοινού πολλές βιολογικές λειτουργίες, όπως την αγγειογένεση και την αρτηριακή πίεση έδωσε την ιδέα σε ερευνητικές ομάδες να συνθέσουν μόρια που να αποτελούν ταυτόχρονα δότες και των δύο αερίων.

Το μόριο ZYZ 803 (2-amino-3-propynylsulfanyl-propionic acid) αποτελεί το πρότυπο υβριδικό μόριο H₂S-NO. Το ZYZ 803 επιτυχώς σε αορτικούς δακτυλίους, αλλά και σε *in vivo* μελέτες διέγειρε την αγγειογένεση και να προκάλεσε σημαντική αγγειοχάλαση. Επιπλέον μελέτη σε πειραματικό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας σε ποντίκι, έδειξε σημαντική καρδιοπροστατευτική δράση. Το μόριο κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, βελτίωσε την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας και διατήρησε την λειτουργία της σε καρδιακή ανεπάρκεια προκαλούμενη από χορήγηση ισοπρεναλίνης. Μάλιστα το αποτέλεσμα του υβριδικού μορίου συγκρινόμενο με δότες μόνο H₂S ή μόνο NO ήταν πιο ισχυρό. Επίσης αύξησε την έκφραση της cGMP και του VEGF ενώ διέγειρε και αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς αυξάνοντας την έκφραση ενζύμων, όπως την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και την HO-1 [61].



Εικόνα 13: Σύνθεση του ZYZ803. Διακρίνονται οι περιοχές που εθύνονται για την απελευθέρωση των αερίων (60)

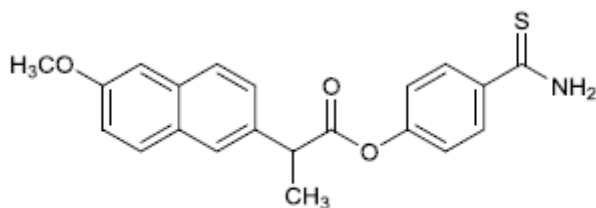
4.1.5 Δομικά ανάλογα φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη και λειτουργούν ως δότες H₂S

Η συγκεκριμένη κατηγορία δοτών H₂S αναπτύχθηκε για να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια φαρμάκων που ήδη χρησιμοποιούνται κλινικά. Τα περισσότερα ανάλογα φέρουν μια ομάδα 4-υδροξύ θειοβενζαμίδης ή το ADT-OH (5-phydroxyphenyl-1,2-dithione-3-thione) στις οποίες οφείλεται η ικανότητα απελευθέρωσης H₂S. Το πιο διαδεδομένο μόριο της κατηγορίας είναι ένα ανάλογο του μη στεροειδούς αντιφλεγμονώδους (ΜΣΑΦ) ναπροξένης, με όνομα ATB-346 ή κατά IUPAC 2-(6-methoxy-naphthalen-2-yl)-propionic acid 4-thiocarbamoyl-phenyl ester, το οποίο έχει περάσει επιτυχώς από κλινική μελέτη Φάσης II. Το σύνολο των προκλινικών και κλινικών πειραμάτων για το ATB-346 αποδεικνύει ότι το φάρμακο είναι πιο ασφαλές από την ναπροξένη, αφού σε θεραπευτικές δόσεις δεν επάγει γαστρεντερικές διαταραχές και πεπτικά έλκη, δυο ανεπιθύμητες ενέργειες ιδιαίτερα χαρακτηριστικές ανάμεσα στα ΜΣΑΦ λόγω της αναστολής των προσταγλανδινών. Επιπλέον παρουσιάζει την ίδια αποτελεσματικότητα και σημαντική αναστολή της COX, ενώ σε κάποια in vitro πειράματα παρουσίαζε ανά περιπτώσεις πιο ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση από την ναπροξένη [6, 62].

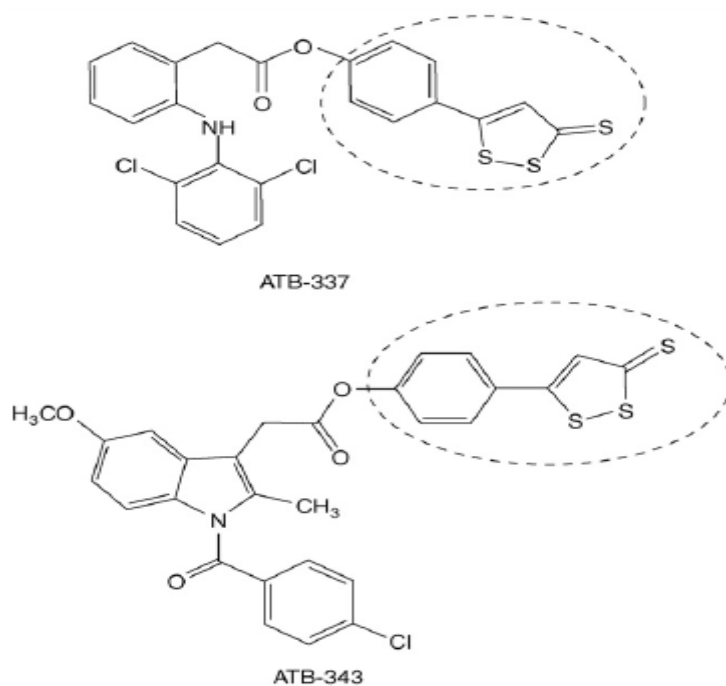
Πολλά τέτοια μόρια έχουν συντεθεί και δοκιμαστεί πειραματικά, στην λογική της αξιοποίησης των φαρμακολογικών στόχων του H₂S. Η ναπροξένη δεν αποτελεί το μοναδικό παράδειγμα. Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις του H₂S με την αναστολή του NF-κB και της ICAM-1 και μέσω και της δράσης του στους K_{ATP} διαύλους διαμόρφωσαν την υπόθεση πως γνωστά αντιφλεγμονώδη φάρμακα που λειτουργούν ως αναστολείς των COX, θα μπορούσαν να γίνουν πιο αποτελεσματικά και ισχυρά αν απελευθερώνουν H₂S. Επίσης με βάση την ικανότητα των δοτών H₂S να καταστέλλουν την προσκόλληση των λευκοκυττάρων, θα μπορούσε κάποιος να προβλέψει ότι ένα ΜΣΑΦ που απελευθερώνει H₂S, δεν θα διεγείρει την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθηλίου στην μεσεντερική κυκλοφορία και θα προκαλούσε μικρότερη γαστρική βλάβη [63]. Έτσι στην βιβλιογραφία ξεχωρίζουν πολλά τέτοια υβριδικά αντιφλεγμονώδη μόρια, όπως το ATB-429 που αποτελεί ένα προϊόν σύζευξης της μεσαλαμίνης με το ADT, το ATB-337 (γνωστό και ως ACS15) που είναι ένα ανάλογο της δικλοφενάκης με μία ομάδα βενζαμιδίου, το ATB-343 ως προϊόν σύζευξης της ινδομεθακίνης με βενζαμίδιο, το AVT-18A που αποτελεί υβριδικό μόριο της σουλινδάκης και το ACS14 που αποτελεί προϊόν σύζευξης της ασπιρίνης με το ADT [6, 63].

Επίσης αντίστοιχη υπόθεση διαμορφώθηκε και για τις αντιυπερτασικές ιδιότητες του H₂S, λόγω της ικανότητάς του να αναστέλλει την φωσφοδιεστεράση-5. Αναφέρουμε μερικά συζευγμένα αντιυπερτασικά μόρια με ομάδες που απελευθερώνουν H₂S, όπως το ACS67 που είναι προϊόν

σύζευξης του ADT με την λατανοπρόστη και το ACS84 που είναι προϊόν σύζευξης της L-DOPA με το ADT [6]. Τέλος ενδιαφέρον παρουσιάζει και το ACS-6 που είναι επίσης ένα προϊόν σύζευξης του ADT με τον αναστολέα της PDE-5 σιλденаφίλη [64]. Η σιλденаφίλη είναι φάρμακο με ένδειξη για την πρωτοπαθή πνευμονική αρτηριακή υπέρταση σταδίου II και III και την πνευμονική υπέρταση που συνδέεται με νόσο του συνδετικού ιστού, αλλά και για την στυτική δυσλειτουργία .



Εικόνα 14 : Χημική δομή ATB 346 του μοναδικού δότη H_2S που πέρασε σε φάση 3 κλινικών μελετών [62]



Εικόνα 15 : Χημικές δομές χαρακτηριστικών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων με ομάδες βενζαμιδίου που απελευθερώνουν H_2S [63]

4.2 Αναστολείς της ενδογενούς παραγωγής H₂S

Η αναστολή της ενδογενούς παραγωγής H₂S αποτελεί ένα σημαντικό πεδίο φαρμακολογικής μελέτης με σκοπό την αντιμετώπιση παθήσεων όπου παρατηρείται υπερέκφραση των ενζύμων παραγωγής H₂S και υψηλά επίπεδα του αερίου, αλλά και την αποσαφήνιση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών. Σήμερα έχουν αναπτυχθεί αναστολείς και για τα τρία ένζυμα CBS, CSE και 3-MST που όμως στερούνται σε σημαντικό βαθμό ισχύος και εκλεκτικότητας με αποτέλεσμα να αξιοποιούνται αποκλειστικά για πειραματικούς σκοπούς [6].

Αρχικά θα αναφερθούμε σε αναστολείς των ενζύμων παραγωγής H₂S που παρουσιάζουν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για την CSE. Τα τρία πιο χαρακτηριστικά μόρια της κατηγορίας είναι η Amino-ethoxy-vinyl-glycine (AVG), η β-cyano-L-alanine (BCA) και η propargylglycine (PAG) [4]. Αν και τα τρία φάρμακα ασκούν ανασταλτικά αποτελέσματα σε πολλά ένζυμα εξαρτώμενα από την PLP, η PAG ανάμεσα τους είναι ο περισσότερο εκλεκτικός αναστολέας ως προς την CSE. Η PAG είναι ένα στερεοεκλεκτικό μόριο με το L-ισομερές να είναι αυτό που αναστέλλει την CSE [65]. Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη που εργαστηρίου μας που χρησιμοποίησε απομονωμένη CSE και υπόστρωμα L-κυστεΐνη, το IC₅₀ της PAG είναι 40 μM, ενώ το αντίστοιχο της BCA είναι 14 μM και της AVG είναι 1μM. Άρα παρατηρούμε ότι το AVG είναι ο πιο ισχυρός αναστολέας και η PAG ο λιγότερο ισχυρός [66]. Η PAG καταλαμβάνει το χώρο της πλευρικής αλυσίδας του υποστρώματος του ενζύμου, παρεμποδίζοντας στερικά την προσβασιμότητα του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο, ενώ δεν επιδρά άμεσα στην σύνδεση με την PLP. Επιπλέον, η PAG με ομοιοπολική σύνδεση με την Tyr114, παρεμβαίνει και στην απελευθέρωση του υποστρώματος [12]. Τέλος παρ' ότι η χρησιμοποίηση της PAG σε πολλές βιολογικές μελέτες μας παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την σημασία του ενζύμου στις φυσιολογικές λειτουργίες και σε παθολογικές καταστάσεις, η βαθύτερη κατανόηση απαιτεί έναν συνδυασμό προσεγγίσεων εκτός της φαρμακολογικής αναστολής, όπως μελέτες με γενετικώς τροποποιημένα ζώα, αλλά και παρέμβαση στο γονίδιο της CSE με siRNA [4].

Στην συνέχεια θα αναφερθούμε στην φαρμακολογική αναστολή της CBS. Στην κατηγορία ξεχωρίζει το άμινο-οξικό οξύ (AOAA) ως ο πιο ισχυρός αναστολέας της CBS. Αυτό το μόριο, όπως και οι αναστολείς της CSE, παρουσιάζει μικρή εκλεκτικότητα έναντι του ενζύμου. Μάλιστα στην πραγματικότητα αναστέλλει και τις τρεις κύριες οδούς της ενδογενούς παραγωγής του H₂S, αφού συνδέεται και με την CSE [66], αλλά και με την CAT, δηλαδή το ένζυμο που είναι απαραίτητο για την παραγωγή της 3-MP που αποτελεί το κύριο υπόστρωμα της 3-MST [67]. Ουσιαστικά αναστέλλει συνολικά έναν μεγάλο αριθμό ενζύμων που εξαρτώνται από την PLP, όπως για

παράδειγμα τις GOT-1 και GOT-2 (aspartate aminotransferase) μειώνοντας την μεταφορά δοτών ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια [68-70].

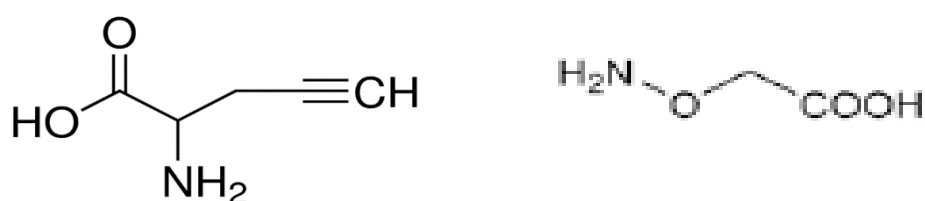
Παρ' όλα αυτά το AOAA παραμένει ο πιο ισχυρός αναστολέας του ενζύμου και γι' αυτό τον λόγο χρησιμοποιείται ευρύτατα στις περισσότερες *in vitro* και *in vivo* εργασίες που σχετίζονται με την CBS. Χαρακτηριστικό της ισχύος του AOAA είναι το IC₅₀ του σε απομονωμένη CBS, που ανέρχεται στα 8,5μM, ενώ άλλοι παλαιότεροι αναστολείς της CBS, όπως η trifluoroalanine και η hydroxylamine χαρακτηρίζονται από IC₅₀ μόλις στα 66μM και 278μM αντίστοιχα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός πως το AOAA είναι στην πραγματικότητα ακόμα πιο ισχυρός αναστολέας της CSE, αφού η ίδια μελέτη συγκρίνει τα IC₅₀ και για τα δυο ένζυμα και παρουσιάζει τιμή για την CSE μόλις στο 1,1μM [66].

Η σύνθεση περισσότερο εκλεκτικών αναστολέων της CBS αποτελεί μια σημαντική πρόκληση αν λάβουμε υπόψη την σημασία που έχει η υπερέκφραση του ενζύμου σε διάφορες μορφές καρκίνου, όπως παρουσιάστηκε σε παραπάνω ενότητα. Το μόριο 1,6-dimethyl-pyrimido[5,4-e]-1,2,4-triazine-5,7(1H,6H)-dione (NSC67078) αναφέρεται ως ένας τέτοιος αναστολέας που όμως αναστέλλει ισχυρά και την CSE [71]. Επιπλέον υπάρχουν μελέτες που έχουν αναζητήσει μέσω σάρωσης βιβλιοθηκών πιθανούς αναστολείς του ενζύμου, με τα αποτελέσματα να έχουν αναδείξει κλινικώς χρησιμοποιούμενα φάρμακα όπως την βενσεραζίδη (έναν αναστολέα της καρβοξυλάσης της ντοπαμίνης) και το διουρητικό αμιλορίδη ως αναστολείς της CBS [72, 73].

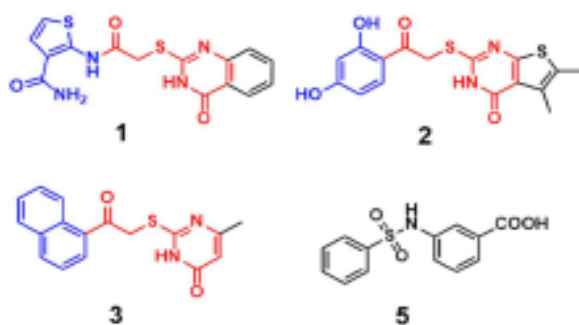
Τέλος στην περίπτωση της 3-MST πρέπει να τονιστεί πως μέχρι προσφάτως δεν υπήρχαν καθόλου εκλεκτικοί αναστολείς του ενζύμου, εκτός χημικών ανάλογων του φυσιολογικού υποστρώματος 3MP με ασθενή ικανότητα σύνδεσης με το ενεργό κέντρο. Αυτή η έλλειψη περιόρισε σημαντικά και την δυνατότητα μελέτης των μοριακών και φυσιολογικών λειτουργιών της 3-MST. Το 2017 δημοσιεύεται επιστημονική μελέτη που παρουσιάζει έναν αριθμό συνθετικών μορίων που λειτουργούν ως αναστολείς της 3-MST, σε συγκεντρώσεις της τάξης των μM σε *in vitro* συνθήκες. Οι ενώσεις προέκυψαν από δοκιμασία υψηλής σάρωσης 174118 ενώσεων. Κοινό δομικό χαρακτηριστικό και απαραίτητο για την φαρμακολογική δράση των μορίων είναι ένας αρωματικός δακτύλιος carbonyl-S-pyrimidone. Σε καλλιέργεια κυττάρων HEK293 που υπερέκφραζαν την 3-MST, το μόριο 2-(4-hydroxy-6-methylpyrimidin-2-yl)sulfanyl-1-naphthalen-1-yl-ethan-1-one παρουσίαζε πολύ ισχυρή ανασταλτική δράση και υψηλή εκλεκτικότητα έναντι της 3-MST, χωρίς να έχει καμία επίδραση στην CBS και την CSE [74].

Στην μελέτη γίνεται προσπάθεια να παρουσιαστεί και ο μοριακός μηχανισμός δράσης των συγκεκριμένων αναστολέων. Κρυσταλλογραφία του συμπλέγματος της 3-MST με 2 από τους νέους

αναστολείς έδειξε πως ο αρωματικός δακτύλιος αναπτύσσει ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τον C248 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Σε αυτό το σημείο υπάρχει κατάλοιπο κυστεΐνης που είναι σουλφυδρυλιωμένο κατά την σύνδεση με τον προσδέτη. Η μελέτη υποθέτει ότι ο αναστολέας ουσιαστικά αναστέλλει το δεύτερο στάδιο της παραγωγής πυρροσταφυλικού και υδροθείου, δηλαδή την μεταφορά ενός ατόμου θείου από την σουλφυδρυλιωμένη κυστεΐνη σε έναν χημικό δέκτη θείου που θα σουλφυδρυλιωθεί [74].



Εικόνα 16: Χημικές δομές των αναστολέων PAG και AOAA αντίστοιχα (6)



Εικόνα 17 : Χημικές δομές αναστολέων της 3-MST [74]

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός εργασίας

Το H_2S αποτελεί ένα αέριο μόριο με μεγάλη σημασία για την κυτταρική σηματοδότηση, αφού εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες και σχετίζεται με την ανάπτυξη πολλών παθολογικών μηχανισμών. Παρ' ότι υπάρχει αυξημένη ερευνητική δραστηριότητα στα πεδία των βιολογικών, βιοχημικών και φαρμακολογικών ιδιοτήτων των αέριων σηματοδοτικών μορίων, εξακολουθούν να υπάρχουν πολλά κενά ως προς την πλήρη κατανόηση της βιολογίας του H_2S και την ανάπτυξη νέων φαρμάκων για την φαρμακολογική παρέμβαση στα μονοπάτια που επηρεάζει το αέριο. Στην παρούσα εργασία, σκοπός ήταν να μελετήσουμε αν η εξωγενής χορήγηση H_2S προκαλεί μεταβολές στην ενδογενή παραγωγή του αερίου σε ένα βιολογικό σύστημα (*in vitro* ή *in vivo*) και αν στην περίπτωση του H_2S ισχύει η γενική τάση της ανάδρομης αρνητικής ρύθμισης, που ορίζει πως η αύξηση των επιπέδων ενός μεσολαβητή προκαλεί συνήθως μείωση στην ενεργότητα και την έκφραση των ενζύμων που τον παράγουν. Ιδιαίτερα επικεντρωθήκαμε στην συσχέτιση της δράσης των γρήγορων δοτών H_2S με την ενδογενή παραγωγή του αερίου.

Επιπλέον, επιδιώξαμε να ερευνήσουμε αν η αλλαγή που συντελείται στις οδούς παραγωγής H_2S μετά την εξωγενή χορήγηση H_2S , σχετίζεται με τις φαρμακολογικές δράσεις του δότη σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Ουσιαστικά γνωρίζοντας ότι οι γρήγοροι δότες H_2S διατηρούν ή εμφανίζουν κλινικές εκδηλώσεις για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την χορήγησή τους, μας απασχόλησε η πιθανότητα η παρατεταμένη τους δράση να οφείλεται στην ικανότητα των δοτών Na_2S και $NaHS$ να αυξάνουν την ενδογενή παραγωγή του αερίου. Για αυτό τον σκοπό επικεντρωθήκαμε στην δράση του εξωγενώς χορηγούμενου H_2S στον πολλαπλασιασμό των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων.

Τέλος μελετήσαμε την αλληλεπίδραση των δύο αερίων NO και H_2S σε ενδοθηλιακά κύτταρα, με σκοπό να αποσαφηνίσουμε αν η ενδογενής παραγωγή H_2S επηρεάζεται από τα επίπεδα του ενδογενούς NO . Έτσι ερευνήσαμε αν η φαρμακολογική αναστολή της ενδογενούς παραγωγής του NO προκαλεί μεταβολή στην έκφραση των ενζύμων της ενδογενούς παραγωγής του H_2S .

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Πειραματικό πρωτόκολλο in vitro

Χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικοί τύποι για τους σκοπούς της εργασίας. Συγκεκριμένα εργαστήκαμε σε ενδοθηλιακά κύτταρα εγκεφάλου μυών (bEnd.3) και σε λεία μυϊκά κύτταρα αορτής αρουραίων (A7r5).

Για τα ενδοθηλιακά κύτταρα bEnd3 πραγματοποιήθηκαν τα εξής πειράματα:

Πείραμα 1: Προσδιορισμός της έκφρασης των ενζύμων παραγωγής H_2S μετά από χορήγηση Na_2S

- Συνολική διάρκεια θεραπείας 48ώρες
- Στρώσιμο κυττάρων σε 6 well (200000 κύτταρα/φρεάτιο) και ανάπτυξη στον incubator για 16 ώρες.
- Χορήγηση θειούχου άλατος Na_2S σε συγκεντρώσεις 1μM, 10μM, 100μM
- Επαναχορήγηση Na_2S στις 24 ώρες.
- Λύση και συγκομιδή κυττάρων και προσδιορισμός της έκφρασης των CSE, CBS, 3-MST με western blot.

Πείραμα 2: Προσδιορισμός της έκφρασης των ενζύμων παραγωγής H_2S μετά από φαρμακολογική αναστολή της eNOS

- Συνολική διάρκεια θεραπείας 48 ώρες
- Στρώσιμο κυττάρων σε 6 well (200000 κύτταρα/φρεάτιο) και ανάπτυξη στον incubator για 16 ώρες.
- Χορήγηση του αναστολέα της eNOS L-NAME σε συγκέντρωση 1mM
- Λύση και συγκομιδή κυττάρων και προσδιορισμός έκφρασης των CSE, CBS, 3-MST με western blot.

Για τα λεία μυϊκά κύτταρα A7r5 πραγματοποιήθηκαν τα εξής πειράματα:

Πείραμα 1: Προσδιορισμός της έκφρασης των ενζύμων παραγωγής H_2S μετά από χορήγηση Na_2S

- Συνολική διάρκεια θεραπεία 48ώρες
- Στρώσιμο κυττάρων σε 6 well (100000 κύτταρα/φρεάτιο) και ανάπτυξη στον incubator για 16 ώρες.

- Χορήγηση θειούχου άλατος Na_2S σε συγκεντρώσεις 1 μM , 10 μM , 100 μM
- Επαναχορήγηση Na_2S στις 24 ώρες.
- Λύση και συγκομιδή κυττάρων και προσδιορισμός έκφρασης των CSE, CBS και 3-MST με western.

Πείραμα 2: Προσδιορισμός με μέθοδο MTT του πολλαπλασιασμού των A7r5 μετά από φαρμακολογική παρέμβαση στα επίπεδα του H_2S

- Στρώσιμο κυττάρων σε 96 well (2000 κύτταρα/φρεάτιο) και επώαση στον incubator για 16 ώρες.
- Χρόνος επώασης 48 ώρες
- Πραγματοποιήθηκαν οι εξής μελέτες:
 - i) Μελέτη του πολλαπλασιασμού των κυττάρων μετά από χορήγηση Na_2S σε δόσεις 10 μM , 50 μM , 100 μM , 500 μM , 1mM. Επανάληψη δόσης στις 24 ώρες
 - ii) Σύγκριση του πολλαπλασιασμού ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και σε ομάδες που έχει χορηγηθεί a) 100 μM Na_2S b) 1mM αναστολέα της CSE PAG c) Na_2S 100 μM και μετά από 1ώρα συγχορήγηση PAG 1mM
 - iii) Σύγκριση του πολλαπλασιασμού ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και σε ομάδες που έχει χορηγηθεί a) 100 μM Na_2S b) 100 μM AOAA c) 500 μM AOAA d) 800 μM AOAA e) 1mM AOAA f) Na_2S 100 μM και μετά από 1ώρα συγχορήγηση AOAA 100 μM g) Na_2S 100 μM και μετά από 1ώρα συγχορήγηση AOAA 500 μM h) Na_2S 100 μM και μετά από 1ώρα συγχορήγηση AOAA 800 μM i) Na_2S 100 μM και μετά από 1ώρα συγχορήγηση AOAA 1mM

2.2 Μέθοδοι in vitro

Στην συγκεκριμένη ενότητα θα περιγράψουμε τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των κυττάρων, την προετοιμασία των πειραμάτων, την συγκομιδή τους με σκοπό την ανοσοαποτύπωση κατά western, την μελέτη του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με προσδιορισμό MTT.

2.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Για την καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων απαιτούνται εξειδικευμένοι χώροι εργασίας, που ονομάζονται δωμάτια κυτταρικής καλλιέργειας. Έτσι επιτυγχάνονται άσηπτες συνθήκες, για τη αποφυγή μολύνσεων των καλλιεργειών. Οι χώροι αυτοί φέρουν κατάλληλο εξοπλισμό, όπως θάλαμο νηματικής ροής (hood), επωαστικούς κλιβάνους με σταθερή παροχή διοξειδίου του άνθρακα (CO₂), υδατόλουτρο με αποστειρωμένο νερό, φυγόκεντρο κ.α Τα κύτταρα καλλιεργούνται μέσα σε φλάσκες ή σε επιφάνεια τριβλίου καλλιέργειας (petri dish) πάντα μέσα στο hood.

Αρχικά πραγματοποιείται ξεπάγωμα των κυττάρων που βρίσκονται αποθηκευμένα σε υγρό άζωτο. Το vial με τα κύτταρα μεταφέρεται στο υδατόλουτρο στους 37°C. Στην συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται μαζί με καλλιεργητικό μέσο (medium) που περιέχει τις θρεπτικές ουσίες των κυττάρων, σε φλάσκα T-75, αφού πρώτα γίνει φυγοκέντριση στα 12000rpm. Λαμβάνουμε υπόψη ότι κατά τη κατάψυξη των κυττάρων χρησιμοποιείται διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) ως κρυσταλλοσταθμιστικό σε συγκέντρωση 5-10%, αφού δεν ευνοεί την απότομη δημιουργία κρυστάλλων που θα κατέστρεφαν τον κυτταρικό σκελετό και τις μεμβράνες. Παρ' όλα αυτά είναι πολύ τοξικό για τα κύτταρα. Έτσι η φυγοκέντριση και η αραίωση σε φρέσκο medium αποσκοπεί στην απομάκρυνση του DMSO για την σωστή ανάπτυξη των κυττάρων.

Όταν η πυκνότητα ενός δοχείου καλλιέργειας κυττάρων προσεγγίζει το 90-100% πρέπει να απομακρυνθούν τουλάχιστον τα μισά κύτταρα για να μην υπάρξει αναστολή της ανάπτυξής τους και θάνατος. Τα κύτταρα δηλαδή ανακαλλιεργούνται κάθε φορά που οι φλάσκες έχουν μεγάλο αριθμό κυττάρων. Η διαδικασία ανακαλλιέργειας χαρακτηρίζεται ως θρυψινοποίηση. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα και κάθε θρυψινοποίηση αντιστοιχεί σε ένα πέρασμα (passage):

1. Αναρρόφηση του θρεπτικού
2. Έκπλυση με Dulbecco 's Phosphate Buffered Saline (PBS 1 X). Πραγματοποιούνται τουλάχιστον δύο επαναλήψεις.

3. Προσθήκη 1 ml trypsin 1 και επώαση σε επωαστήρα (incubator) για 10' ή μέχρι να γίνει πλήρης αποκόλληση των κυττάρων.
4. Προσθήκη 2 ml θρεπτικού μέσου (medium) που περιέχει ορό για απενεργοποίηση της θρυψίνης.
5. Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 5 λεπτά.
6. Απομάκρυνση του υπερκείμενου με serological pipet και επαναιώρηση με νέο θρεπτικό μέσο με καλό πιπετάρισμα για σπάσιμο των συσσωματωμάτων.
7. Κατάλληλος όγκος από το εναιώρημα των κυττάρων, μεταφέρεται σε καλλιεργητική επιφάνεια και συμπληρώνεται ο αντίστοιχος όγκος medium ώστε
8. Έλεγχος στο μικροσκόπιο (ομοιόμορφη κατανομή, απουσία συσσωματωμάτων) και τοποθέτηση της φλάσκας ή του petrit dish στον επωαστήρα (incubator) σε 5% CO₂, 37°C. Όλες οι διαδικασίες που αφορούν κύτταρα, πραγματοποιούνται μέσα στο hood

Βάσει των παραπάνω τα bEnd.3 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM Low Glucose (1g/L) με περιεκτικότητα 10% Fetal Bovine Serum (FBS). Στο καλλιεργητικό υλικό είχε προστεθεί L-glutamine, σε κατάλληλο όγκο ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 2mM, αλλά και μίγμα αντιβιοτικών που περιείχε 10000 U/mL Penicillin και 10mg/mL Streptomycin για την αποφυγή ανάπτυξης βακτηρίων στην καλλιέργεια. Η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε επωαστή με θερμοκρασία σταθερή στους 37°C και περιεκτικότητα αέρα σε διοξείδιο του άνθρακα 5% CO₂. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι αρκετά γρήγορος. Γι' αυτό απαιτείται ανανέωση medium κάθε μέρα και ανακαλλιέργεια κάθε 2-3 μέρες. Επίσης η ανακαλλιέργεια γινόταν με λόγο 1/6.

Τα A7r5 καλλιεργήθηκαν σε DMEM High Glucose (4,5g/L) ομοίως με προσθήκη 10% FBS, L-glutamine και Penicillin/ Streptomycin. Ο πολλαπλασιασμός τους είναι πιο αργός συγκριτικά με τα ενδοθηλιακά. Η ανανέωση medium γινόταν κάθε 2 ημέρες και η ανακαλλιέργεια κάθε 4-5 ημέρες με λόγο 1/3.

2.2.2 Μέτρηση και στρώσιμο των κυττάρων

Το στρώσιμο σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) με 6x ή 96x wells γίνεται για να προστεθούν ουσίες και κατόπιν συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος να μετρηθεί η κυτταρική απόκριση σε συγκεκριμένο φαρμακολογικό ερέθισμα. Κατά τη διαδικασία λοιπόν του μετρήματος του κυτταρικού πληθυσμού, ξεκινάμε με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης.

Μετά την επαναδιαλυτοποίηση που στην περίπτωση της μέτρησης πρέπει να είναι ακριβής ακολουθείται η μέθοδος της αιματοκυτταρομετρίας Neubauer. Σε ειδικό αιματοκυτταρόμετρο μεταφέρονται 10μL από το ελαιώρημα των κυττάρων. Στο μικροσκόπιο εστιάζουμε στα τεταρτημόρια και μετράμε τα κύτταρα που βρίσκονται μέσα στα τετράγωνα πλέγματα των τεταρτημορίων. Το πρωτόκολλο για την μέτρηση ορίζει ότι τα κύτταρα που αγγίζουν τα ανώτερα και τα αριστερά όρια πρέπει να μετρηθούν, σε αντίθεση με τα κύτταρα που αγγίζουν τα κατώτερα και τα δεξιά όρια των τετραγώνων, τα οποία δεν θα πρέπει να ληφθούν υπόψη. Ο συνολικός αριθμός κυττάρων που μετρήθηκαν πολλαπλασιάζεται με 2500 και βρίσκουμε το αριθμό κυττάρων/mL.

Έπειτα, για να υπολογιστούν τα ml από το επαναδιαλυτοποιημένο κυτταρικό ίζημα της φυγοκέντρωσης που θα αραιωθούν και έχοντας ήδη υπολογίσει ανάλογα με το τι θα κάνουμε μετά, το συνολικό πληθυσμό που χρειαζόμαστε, κάνουμε το εξής: «διαιρούμε τα κύτταρα που θέλουμε με τα κύτταρα που έχουμε». Η διαίρεση αυτή μας δίνει τον όγκο που πρέπει να πάρουμε από το falcon που περιέχει τα κύτταρα, προκειμένου να συνεχιστεί η πειραματική διαδικασία η οποία επιτελείται. Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα που περισεύουν συνήθως επιστρέφονται για ανακαλλιέργεια για επόμενο πείραμα ή πάγωμα.

Τέλος, μετά την τοποθέτηση των κυττάρων εντός των πηγαδιών, το plate κλείνει και γίνεται μία περιφερική κίνηση προκειμένου να είναι ομοιόμορφη η κατανομή των κυττάρων εντός των πηγαδιών. Προσοχή, να μην γίνεται έντονη ανακίνηση, διότι λόγω στατικού ηλεκτρισμού και δύνης τα κύτταρα τείνουν να συγκροτούν συσσωματώματα στο κέντρο. Πριν, τοποθετηθούν στον επωαστικό κλίβανο, εξετάζεται η εικόνα τους μικροσκοπικά.

2.2.3 Συγκομιδή των κυττάρων και παρασκευή κυτταρικού διαλύματος

Η συγκομιδή των κυττάρων γίνεται με προσθήκη 200μL διαλύματος λύσης σε κάθε κελί του 6-well plate, όπου έχει γίνει προηγουμένως η 48ωρη επώαση των κυττάρων. Μετά από 15 λεπτά οι κυτταρικές μεμβράνες έχουν διαλυθεί, γίνεται μηχανική συγκομιδή των κυττάρων με χρήση cell scraper και το περιεχόμενο των κελιών συλλέγεται σε tube. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 20 min, στις 13000 rpm, στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρωση λαμβάνεται το υπερκείμενο που περιέχει διαλυμένες τις πρωτεΐνες του δείγματος και συλλέγεται σε νέο tube. Το υπερκείμενο ονομάζεται κυτταρικό διάλυμα (lysate) και μπορεί να αποθηκευτεί στους -80°C και να χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα.

2.2.4 MTT assay

Η μέθοδος MTT είναι μια χρωματομετρική δοκιμασία που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων [75]. Βασίζεται στην ικανότητα των οξειδοαναγωγικών ενζύμων που εξαρτώνται από το νικοτιναμιδο-αδενο-φωσφορικό δινουκλεοτίδιο (NADPH) να ανάγουν το τετραζόλιο της χρωστικής MTT στην αδιάλυτη φορμαζάνη, η οποία έχει μωβ χρώμα. Τα μεταβολικώς ενεργά κύτταρα μπορούν να ανάγουν το τετραζόλιο σε αδιάλυτους στο νερό κρυστάλλους φορμαζάνης, με αφυδρογονάσες που εκφράζονται στα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων, αλλά και με άλλους αναγωγικούς παράγοντες και ένζυμα που εντοπίζονται σε άλλα οργανίδια, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο [76]. Στην μέθοδο MTT μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθεται ένα διάλυμα διαλυτοποίησης stop solution (διμεθυλοσουλφοξειδίου ή διάλυμα οξινισμένης αιθανόλης ή διάλυμα του απορρυπαντικού δωδεκυλοθεικού νατρίου σε αραιό υδροχλωρικό οξύ) για τη διάλυση της αδιάλυτης φορμαζάνης σε ένα έγχρωμο διάλυμα. Η απορρόφηση αυτού του χρωματισμένου διαλύματος μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με μέτρηση σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος (συνήθως μεταξύ 500 και 600 nm) με φασματοφωτόμετρο.

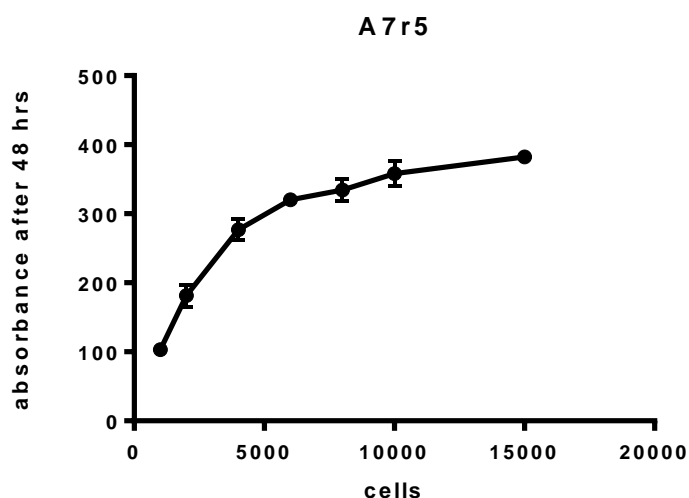
Η μέθοδος MTT είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την ανάλυση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αλλά και της βιωσιμότητας. Το πλεονέκτημα της ανάλυσης MTT είναι ότι αποτελεί εύκολη και αξιόπιστη μέθοδο για τις δοκιμές πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξικότητας, ενώ το μειονέκτημα είναι ότι η μετατροπή σε κρυστάλλους φορμαζάνης εξαρτάται από τον μεταβολικό ρυθμό και τον αριθμό των μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα πολλές παράμετροι να μεταβάλλουν το αποτέλεσμα [77].

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στο εργαστήριο περιλάμβανε τα εξής βήματα:

Τα κύτταρα στρώνονται σε 96well. Έχουμε 6 replicates για κάθε ομάδα. Έπειτα από 18 ώρες παραμονής των κυττάρων στον incubator, πραγματοποιούμε το αντίστοιχο treatment με τον αναστολέα ή τον δότη H_2S που έχουμε επιλέξει.

Ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων μελετήθηκε για διάστημα 48 ωρών. Σε κάθε well στρώσαμε αρχικά 2000 cells. Ο αριθμός προέκυψε από καμπύλη που συσχετίζει την απορρόφηση με τον αριθμό των κυττάρων μετά από 48 ώρες πολλαπλασιασμού. Αρχικά στρώσαμε κύτταρα σε συγκεντρώσεις 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000, 15000 cells/well. Η λογική είναι πως ο αριθμός των κυττάρων πρέπει να αυξάνεται τόσο κατά την διάρκεια του πειράματος, ώστε να μην γίνεται confluent σε κύτταρα κάθε κελί και εμποδίζει την ανίχνευση με την μέθοδο MTT, σημαντικών αλλαγών που προκλήθηκαν από την χορήγηση. Έτσι επιλέγουμε συγκέντρωση 2000

κύτταρα/φρεάτιο που συμπεριλαμβάνεται στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης, και όχι στο πλατό που διαμορφώνεται μετά τις 6000 cells/well.



Εικόνα 18 : Καμπύλη αναφοράς απορρόφησης / αριθμού κυττάρων στις 48 ώρες πολλαπλασιασμού των A7r5

Το αντιδραστήριο MTT προστέθηκε στο καλλιεργητικό μέσο για 2 ώρες πριν το τέλος των 48 ωρών. Το MTT υπάρχει σε stock. Αρχικά έχει διαλυθεί σε ύδωρ για ενέσιμη χορήγηση σε αναλογία 50mg/10ml, φιλτράρεται και διατηρείται σε σκοτεινό σημείο (φωτοευαίσθητο αντιδραστήριο) στους -20°C . Η συγκέντρωση του είναι κατάλληλη, ώστε τελικά μέσα σε κάθε φρεάτιο για την πραγματοποίηση της αντίδρασης να έχουμε συγκέντρωση 5mg/ml.

Μετά το πέρας αυτού του διαστήματος και αφού έχουν σχηματιστεί οι κρύσταλλοι φορμαζάνης εφαρμόσαμε μία παραλλαγή της μεθόδου. Αντί για την προσθήκη stop solution, με προσοχή απομακρύναμε με πιπέτα το καλλιεργητικό υλικό (Medium), και στην συνέχεια διαλύσαμε τους κρυστάλλους που έμειναν αδιάλυτοι μέσα στα κελιά, σε ίση ποσότητα ισοπροπανόλης. Η παραλλαγή προσφέρεται για την ταχύτερη διάλυση των κρυστάλλων φορμαζάνης, εφόσον μένουν σταθεροί στον πυθμένα του φρεατίου και δεν υπάρχει απώλεια κατά την απομάκρυνση του Medium.

2.3 Πειράματα in vivo

Σε συνέχεια των in vitro πειραμάτων προχωρήσαμε την μελέτη μας με in vivo πειράματα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε ως πειραματόζωα μύες (ποντίκια) C57BL/6 στους οποίους χορηγήθηκε ο γρήγορος δότης H_2S , Na_2S .

2.3.1 Πρωτόκολλο πειραματόζωων

- Η συνολική διάρκεια του πειράματος είναι 24 ώρες με επαναχορήγηση του δότη στις 12 ώρες.
- Η δόση Na_2S που χρησιμοποιήθηκε είναι $1\mu\text{mol/Kg}$ σε κάθε χορήγηση.
- Με την ολοκλήρωση της 24ωρης χορήγησης του δότη ακολούθησε ευθανασία των ζώων, δειγματοληψία και ομογενοποίηση των ιστών.

2.3.2 Μέθοδοι in vivo

- Χορήγηση δότη με ενδοπεριτονιακή ένεση ανά 12 ώρες, με συνολικό χρόνο 24 ώρες.
- Με την ολοκλήρωση των 24 ωρών τα πειραματόζωα θυσιάζονται με αυχενική εξάρθρωση [45] με την χρήση κατάλληλων εργαλείων (νυστέρι, ψαλίδι, λαβίδες). Γίνεται τομή από την κάτω κοιλιακή χώρα ως και τον θώρακα, ώστε να προχωρήσουμε στην δειγματοληψία των οργάνων που θέλουμε να μελετήσουμε.
- Τα όργανα που ελήφθησαν, η καρδιά, οι πνεύμονες, το ήπαρ και οι νεφροί ψύχονται άμεσα σε υγρό άζωτο και φυλάσσονται στους -80°C .

2.3.3 Ομογενοποίηση ιστών

- Ολόκληρος ο ιστός ομογενοποιείται για 20s με την χρήση ηλεκτρικού εμβόλου και ιδιικού ρυθμιστικού διαλύματος λύσης ($1\text{mL}/1\text{mg}$ ιστού).
- Ακολουθεί φυγοκέντριση στα 13000rpm για 15 λεπτά, στους 4°C
- Περισυλλέγεται το υπερκείμενο που περιέχει τις πρωτεΐνες των ιστών και φυλάσσεται στους -80°C έως ότου γίνει η ανάλυση με Western blot assay.

2.4 Σύσταση του διαλύματος λύσης

- 1% TritonX100: Μη ιοντικός επιφανειοδραστικός παράγοντας υπεύθυνος για την καταστροφή των λιπιδικών μεμβρανών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των δια-μεμβρανικών πρωτεϊνών.
- 20 mM Tris pH 7,4-7,6: Εξασφαλίζει συνθήκες παρόμοιες με το περιβάλλον του σώματος ρυθμίζοντας το pH.
- 150 mM NaCl: Αναστέλλει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών
- 50 mM NaF: Αναστολέας φωσφατάσης ώστε να μην χωνευτεί το δείγμα.
- 1 mM EDTA: Χηλικός παράγοντας συμπλοκοποίησης ιόντων Ca^{2+} με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση ενζύμων του κυττάρου που απαιτούν την ύπαρξή του για να δράσουν
- 1 mM EGTA: Χηλικός παράγοντας συμπλοκοποίησης ιόντων Ca^{2+}
- 1 mM Glycerolphosphatase : Συναγωνιστική δράση με τη φωσφατάση ώστε η τελευταία να μην επηρεάσει της αναλυόμενες πρωτεΐνες.
- 1% SDS: Φορτίζει τις πρωτεΐνες αρνητικά ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση. Επιφανειοδραστικό.
- 100 mM PMSF και 20 μl Protease phosphatase inhibitor cocktail [78]

2.5 Ανοσοαποτύπωση Western

Κάθε πρωτεΐνη αποτελείται από αμινοξέα συνδεδεμένα μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Τα αντισώματα έχουν την ιδιότητα να συνδέονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες πρωτεϊνών, οι οποίες χαρακτηρίζονται με τον όρο επίτοπα. Επειδή η αλληλουχία των αμινοξέων διαφοροποιείται σε διαφορετικές πρωτεΐνες, τα αντισώματα μπορούν να αναγνωρίσουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες, εντός ομάδας πολλών. Η αναλυτική τεχνική Western Blot μας δίνει την δυνατότητα να ανιχνεύσουμε μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη σε κυτταρικά διαλύματα, καθώς και να ποσοτικοποιήσουμε την έκφρασή της [78]. Μετά την συγκομιδή των κυττάρων και την ομογενοποίηση των ιστών η διαδικασία είναι περίπου κοινή και για κύτταρα και ιστούς. Παρουσιάζονται αναλυτικά τα βήματα της μεθόδου:

2.5.1 Καμπύλη αναφοράς Lowry και παρασκευή δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Ο προσδιορισμός της υπάρχουσας πρωτεΐνης αναφοράς με τη χρήση της μεθόδου Lowry, μετρώντας την απορρόφηση. Μέσω της καμπύλης αναφοράς (συγκέντρωση συναρτήσει απορρόφησης) γίνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων στην αναλύμενη πρωτεΐνη, ώστε αυτά στη συνέχεια να υποστούν την κατάλληλη αραίωση για να έχουν όλα την ίδια συγκέντρωση. Έτσι εξασφαλίζουμε ότι στο κάθε κελί της προς ηλεκτροφόρηση γέλης θα φορτώσουμε την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης αναφοράς, οπότε τα αποτελέσματα θα είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους. Επίσης εξασφαλίζουμε ότι θα φορτωθεί ποσότητα πρωτεΐνης η οποία θα είναι εντός των ορίων ανίχνευσης του πρωτογενούς αντισώματος. Σημειώνεται ότι στους ιστούς συχνά τα δείγματα είναι πολύ πυκνά και χρειάζονται επιπλέον αραίωση πριν την μέτρηση της συνολικής πρωτεΐνης, ώστε να έχουν ποσότητα που να βρίσκεται μέσα στο εύρος της καμπύλης αναφοράς.

Στη συνέχεια με τη χρήση κατάλληλου υπολογιστικού φύλλου αναμειγνύονται για κάθε δείγμα κατάλληλες ποσότητες πρωτεΐνης-ομογενοποιημένου δείγματος, αραιωτικού διαλύματος λύσης και Daves buffer (4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0,004% bromophenylblue, 0.125 M Tris/HCl), το οποίο είναι απαραίτητο για την αρνητική φόρτιση των πρωτεϊνών και την διάσπαση των δισουλφιδικών ομοιοπολικών δεσμών. Ακολουθεί θέρμανση για 10 λεπτά στους 100°C ώστε να αποδιαταχθεί η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών. Τα δείγματα που προκύπτουν είναι έτοιμα για ηλεκτροφόρηση.

2.5.2 Ηλεκτροφόρηση

Όταν εφαρμοστεί τάση κατά μήκος της γέλης, οι πρωτεΐνες μεταναστεύουν σε αυτή με διαφορετικές ταχύτητες με κινητήριο δύναμη το φορτίο. Η διαφορετική ταχύτητα ανάπτυξης της κάθε πρωτεΐνης έχει σαν αποτέλεσμα αυτές να χωρίζονται σε ζώνες βάσει του μοριακού βάρους. Σε δύο κωνικές φιάλες ή σε δύο πλαστικά falcons παρασκευάζονται δύο πηκτές ακρυλαμιδίου διαφορετικής σύστασης, το running/separating gel όπου θα πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών και το stacking gel όπου θα δημιουργηθούν κελιά και θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Τα δυο gel διαφέρουν στην συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου, αλλά και στην συγκέντρωση των συστατικών και το PH του buffer που χρησιμοποιείται. Συγκεκριμένα τα αρχικά stock των δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων είναι 4X Tris-Cl /SDS resolving gel buffer pH 8,8 και 4X Tris-Cl/SDS stacking gel buffer pH 6,8 αντίστοιχα. Για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια TEMED (N,N,N,N-tetramethylethylenediamine) και APS (Ammoniumpersulfate) 10%. Το running gel τοποθετείται με πιπέτα στις πλάκες μέχρι του επιθυμητού ύψους άμεσα μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων πολυμερισμού. Έπειτα συμπληρώνουμε με d.H₂O μέχρι το πάνω μέρος της πλάκας, για να επιτύχουμε σωστό σχηματισμό του gel. Στη συνέχεια, ολοκληρώνουμε την προετοιμασία του stacking gel προσθέτοντας ομοίως στην κωνική το TEMED και το APS και με τη χρήση της πιπέτας το βάζουμε αμέσως στις πλάκες (πολυμερίζεται ταχύτερα από το running gel). Αφού τις γεμίσουμε, τοποθετούμε με προσοχή τα χτενάκια για να σχηματιστούν τα κελιά.

Επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός με διακύμανση του ποσοστού ακρυλαμιδίου στη γέλη του running gel με κριτήριο το μέγεθος της πρωτεΐνης που θέλουμε να προσδιορίσουμε. Έτσι μεταβάλλουμε την αναλογία ακρυλαμιδίου/dH₂O. Έτσι για προσδιορισμό πρωτεϊνών με μέγεθος μέχρι 60 kDa επιλέγουμε α=9-12% ακρυλαμιδίου, για προσδιορισμό πρωτεϊνών με μέγεθος 60 kDa-85 kDa επιλέγουμε α=8-10% και για το προσδιορισμό πρωτεϊνών 85 kDa-140 kDa επιλέγουμε α=7,5% ακρυλαμιδίου. Τα μοριακά βάρη των ενζύμων παραγωγής H₂S είναι 62 kD για την CBS, 45 kD για την CSE και 33 kD για την 3-MST. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν gel 10% και 12%. Το Stacking gel έχει σταθερή σύσταση κι ανεξάρτητη από το είδος των προσδιοριζόμενων πρωτεϊνών. Εμείς χρησιμοποιήσαμε συγκέντρωση 4%.

Ακολούθως, φέρνουμε τα δείγματα σε πάγο καθώς και τον ιχνηθέτη (marker). Ο marker είναι ένα μείγμα πρωτεϊνών με ορισμένα μοριακά βάρη, διαθέσιμο στο εμπόριο. Είναι έγχρωμος και διαμορφώνει ορατές μπάντες που μας βοηθούν να αναγνωρίσουμε τις πρωτεΐνες που αναπτύσσονται στα δείγματά μας. Όταν πήξει το stacking gel βγάζουμε με προσοχή τα χτενάκια. Βγάζουμε τις πλάκες από το στατώ και τα τοποθετούμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με την μικρή πλάκα προς

την εσωτερική πλευρά. Γεμίζουμε το κενό ανάμεσα στις πλάκες με Running Buffer 1X, το οποίο φτιάχνουμε αραιώνοντας 100ml (10X Running Buffer) σε 900ml dH₂O. Είναι σημαντικό να προσέξουμε η συσκευή να είναι πάντα γεμάτη με Running buffer 1x μέχρι να καλύπτεται το τέλος της μεγάλης πλάκας.

Εγχέουμε το running buffer με σύριγγα μέσα σε κάθε κελί, ώστε να απομακρυνθεί όσο ακρυλαμίδιο δεν πολυμερίστηκε. Έπειτα, εγχέουμε με πιπέτα τον marker στο πρώτο κελί της κάθε γέλης και στη συνέχεια τα δείγματα διαδοχικά στα επόμενα κελιά. Η ποσότητα (μl) του κάθε δείγματος έχει υπολογιστεί από πριν με βάση την πρωτεΐνη που μετρήσαμε στην lowry. Η τοποθέτηση των δειγμάτων θα πρέπει να γίνεται με ακρίβεια, ώστε να έχουμε σε όλα τα κελιά την ίδια ποσότητα πρωτεϊνών.

Αφού ολοκληρώσουμε την τοποθέτηση των δειγμάτων, αρχίζουμε την ηλεκτροφόρηση. Επιλέγουμε 75V μέχρι τη στιγμή που θα δούμε τον marker να εισέλθει από το stacking gel στο separating /running gel, ώστε να εξασφαλίσουμε ότι το σύνολο των πρωτεϊνών θα εισαχθεί ταυτόχρονα στο running gel. Στη συνέχεια ηλεκτροφορούμε στα 120V μέχρι του επιθυμητού διαχωρισμού, ο οποίος εξαρτάται από το μέγεθος της πρωτεΐνης που θέλουμε να προσδιορίσουμε.

2.5.3 Διαδικασία μεταφοράς πρωτεϊνών στην μεμβράνη

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης βγάζουμε προσεκτικά την μία κασέτα από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσπαθούμε να την ανοίξουμε με τη βοήθεια της σπάτουλας, χωρίς να σπάσει το gel. Αποκόπτουμε με τη σπάτουλα από τα gel το μέρος του stacking gel. Με προσοχή, ξεκολλάμε και επωάζουμε τη γέλη που περιέχει τις ηλεκτροφορημένες πρωτεΐνες, σε transfer buffer ίδιας συστάσεως με αυτό που θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά. Η επώαση διαρκεί για 10 λεπτά με στόχο να εξισορροπήσουμε τη διαφορά pH και SDS μεταξύ running buffer και transfer buffer. Επωάζουμε την μεμβράνη PVDF (προτιμάται στο συγκεκριμένο πείραμα συγκριτικά με την νιτροκυτταρίνη, διότι έχουμε εντοπίσει μειωμένη ανίχνευση θορύβου) σε μεθανόλη για 5 λεπτά, ώστε να ενεργοποιηθεί και να είναι σε θέση να δεσμεύσει τις πρωτεΐνες που έχουν ηλεκτροφορηθεί και υπάρχουν στη γέλη. Έπειτα επωάζουμε τη μεμβράνη PVDF με 1X Transfer Buffer για 5 λεπτά, ώστε να έχω ομαλή μετάβαση στο επόμενο περιβάλλον.

Στη συνέχεια, βάζουμε στην μαύρη επιφάνεια στις κασέτες του transportation το σφουγγάρι, αφού το έχουμε πρώτα διαβρέξει με transfer buffer. Αφού τα gels επωαστούν για 10 λεπτά στο transfer buffer, με ένα κομμάτι διηθητικό χαρτί το οποίο επίσης έχουμε διαβρέξει με transfer buffer,

ανασηκώνουμε το gel ώστε τελικά να μεταφερθεί ολόκληρο πάνω στο χαρτί χωρίς να διαρραγεί. Στην συνέχεια τοποθετούμε την PVDF και με τη βοήθεια της πιπέτας βρέχουμε την μεμβράνη και τοποθετούμε από πάνω της διηθητικό χαρτί, το οποίο έχουμε επίσης διαβρέξει με transfer buffer. Με ένα γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα διατρέχουμε την μεμβράνη για να φύγουν τυχόν φυσαλίδες. Τέλος, τοποθετούμε από πάνω και άλλο βρεγμένο σφουγγάρι, κλείνουμε την κασέτα και την τοποθετούμε στη συσκευή μεταφοράς με τη μαύρη πλευρά προς τη μαύρη πλευρά της συσκευής. Τέλος πραγματοποιούμε τη διαδικασία του transportation για 1,5 h σε πάγο στα 100 V.

2.5.4 Διαδικασία μετά την μεταφορά στην μεμβράνη

Όταν τελειώσει το transportation ελέγχουμε αν έχει μεταφερθεί ο marker στη μεμβράνη. Αν αυτό δεν έχει συμβεί, πιθανότατα για κάποιο λόγο δεν έγινε το transportation γι' αυτό δεν πρέπει να μετακινήσουμε το gel από τη μεμβράνη και να επαναλάβουμε το transportation. Αν το transportation έχει γίνει επιτυχώς, ανοίγουμε την κασέτα, αφαιρούμε το σφουγγαράκι και το πρώτο διηθητικό χαρτί και παίρνουμε τη μεμβράνη του PVDF μαζί με το Gel χωρίς να τα διαχωρίσουμε (με το PVDF να είναι προς τα κάτω) και κόβουμε περιμετρικά το PVDF με οδηγό το Gel ώστε η μεμβράνη να είναι παράλληλη με τις μπάντες. Στη συνέχεια αφού αφαιρέσουμε το Gel από τη μεμβράνη, την προσανατολίζουμε ώστε να κοιτάμε την πλευρά του PVDF η οποία ήταν σε επαφή με το gel, ώστε οι μπάντες του marker να είναι από τη λεπτότερη (πάνω) προς την παχύτερη (κάτω) και κόβουμε την πάνω αριστερή γωνία, οπότε με αυτό τον τρόπο τοποθετώντας πάντα το κόψιμο πάνω αριστερά είμαστε σίγουροι για το ποια είναι η πλευρά του PVDF στην οποία έγινε η μεταφορά. Ετοιμάζουμε το TBS-Tween. Αναμιγνύουμε 100ml από το 10xTBS με 900ml dH₂O και 2ml Tween 20. Έπειτα ετοιμάζουμε το Blocking Buffer. Είναι σημαντικό να αποκλείσουμε τις περιοχές της μεμβράνης που δεν έχουν πρωτεΐνες για να μειώσουμε την σύνδεση των πρωτογενών αντισωμάτων εκεί. Για τα δύο gel διαλύουμε 2g Milk σε 40ml TBS-Tween. Επωάζουμε στο Blocking Buffer για 1h. (για παρασκευή του 10xTBS χρησιμοποιούμε 80g NaCl, 30g Tris, ddH₂O έως το 1L και ρυθμίζεται το pH στο 7,4). Η διαδικασία αυτή έχει στόχο την πρόληψη αλληλεπιδράσεων μεταξύ της μεμβράνης και του αντισώματος που χρησιμοποιείται. Έτσι, όταν το αντίσωμα προστίθεται, επισυνάπτει μόνο τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες-στόχους (παρεμπόδιση της μη-ειδικής σύνδεσης). Αφού περάσει η μία ώρα, πετάμε το Blocking Buffer και πλένουμε 3 φορές από 5min με TBS-Tween. Οι πλύσεις αυτές, που επαναλαμβάνονται και σε επόμενα στάδια είναι απαραίτητες για να απομακρύνουν αδέσμευτα αντιδραστήρια. Ανεπαρκείς πλύσεις καθιστούν το background έντονο,

ενώ εκτεταμένες πλύσεις, μπορούν να μειώσουν την ευαισθησία λόγω έκλουσης του αντισώματος ή/και του αντιγόνου από τη μεμβράνη.

Ετοιμάζουμε έπειτα το Primary Antibody-PrAb χρησιμοποιώντας: 5μl PrAb, 5ml TBS/Tween, 2,5mL 25% NaN₃ 1:1000 αραιώση. Επωάζουμε με το πρωτογενές αντίσωμα (Primary Antibody) over night στους 4°C. Το Primary Antibody μπορεί να χρησιμοποιηθεί τρεις φορές (λόγω του συντηρητικού NaN₃ που περιέχει) γι' αυτό μετά τη χρήση του δεν το πετάμε αλλά το φυλάμε στους -20°C. Την επόμενη μέρα μετά το τέλος της επώασης του Primary Antibody επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία έκπλυσης 2 φορές από 10 λεπτά με TBS-Tween. Ετοιμάζουμε το δευτερογενές αντίσωμα (Secondary Antibody). Για 2 gel σε 10ml TBS-Tween προσθέτουμε συνήθως 5μl από το Sec Antibody. Θέλουμε αραιώση 1:2000. Για κάθε πρωτογενές γνωρίζουμε ποιο δευτερογενές αντίσωμα θα χρησιμοποιήσουμε ανάλογα με την προέλευση του πρωτογενούς (rabbit, mouse, human, rat, goat). Επωάζουμε το δευτερογενές αντίσωμα για 2 ώρες. Σημειώνουμε ότι στα πειράματα μας, για να μειώσουμε το έντονο background και τις πολλές μη ειδικές μπάντες που έδιναν τα αντισώματα της CBS και της CSE, χρησιμοποιήσαμε Blocking Buffer 5% για την αραιώση του πρωτογενούς και του δευτερογενούς αντισώματος, και όχι απλό TBS-Tween.

Στη συνέχεια επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία έκπλυσης με TBS-Tween για 3 φορές από 15 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθεί η συνολική ποσότητα NaN₃, το οποίο καταστρέφει μέρος των αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας. Στη συνέχεια προετοιμάζουμε το σκοτεινό θάλαμο. Μετά την ολοκλήρωση των εκπλύσεων βγάζουμε από το ψυγείο τα δύο διαλύματα Pierce ECL Western Blotting Substrate. Τα αναμιγνύουμε σε αναλογία 50/50. Για μια μεμβράνη προετοιμάζουμε 2ml, δηλαδή 1ml από το καθένα και επωάζουμε για 5 λεπτά. Σε ορισμένες περιπτώσεις για την ενίσχυση του σήματος μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε και το αντίστοιχο μείγμα ECL Femto της ίδιας εταιρίας, σε αραιώση 1/10 με το κοινό ECL.

2.5.5 Εμφάνιση

Ανοίγουμε το κουτί της φωτογραφίας και τοποθετούμε τις μεμβράνες. Κόβουμε φιλμ και τα τοποθετούμε πάνω από τις μεμβράνες μέσα στον σκοτεινό θάλαμο. Κλείνουμε το κουτί και χρονομετρούμε. Έπειτα βγάζουμε το φιλμ και το τοποθετούμε στο μηχάνημα Optimax x-Ray Film Processor που περιέχει το developer και το fixer. Ανάλογα με το σήμα που είδαμε επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία χρονομετρώντας εκ νέου. Για κάθε πρωτεΐνη χρειάζεται άλλος χρόνος εμφάνισης. Αν το σήμα είναι πολύ έντονο μπορεί να χρειαστεί να το αφήσουμε ένα ή μερικά μόνο δευτερόλεπτα,

ενώ αν το σήμα είναι πολύ ασθενές μπορεί να χρειαστεί να το αφήσουμε μέχρι και 15 λεπτά. Οι μεμβράνες φυλάσσονται στο ψυγείο στους 4 °C για το ενδεχόμενο του stripping.

2.5.6 Stripping

Η διαδικασία που θα περιγράψουμε στη συνέχεια μας δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε τις ίδιες μεμβράνες, είτε για να αλλάξουμε αντίσωμα, είτε για να μετρήσουμε την ολική ή τη φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη. Η δυνατότητα αυτή είναι πολύ σημαντική, καθώς παρέχει οικονομία στη κατανάλωση των δειγμάτων, αλλά και στο χρόνο. Κάθε μεμβράνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί τρεις φορές. Ξεκινάμε τη διαδικασία πλένοντας τις μεμβράνες τρεις φορές με dH₂O. Στη συνέχεια επωάζουμε τις μεμβράνες σε ένα διάλυμα Stripping Buffer (σύνσταση: 7,6g Tris, 20,0g SDS, 1000 ml H₂O, pH~6,8), το οποίο αναμειγνύεται με 2-mercaptoethanol 98% (αναλογία 50mL/350μL). Η επώαση διαρκεί 20-30 λεπτά στους 56°C. Ακολουθούν τρεις 15λεπτες πλύσεις με TBS-Tween. Στη συνέχεια φτιάχνουμε Blocking Buffer (για τα δύο gel: 1.5ml Milk σε 30ml TBS-Tween), και επωάζουμε για 30 λεπτά. Επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία πλυσίματος και επωάσεων με τα αντισώματα που έχουμε επιλέξει, όπως περιγράφηκε παραπάνω, ενώ τέλος θα ακολουθήσει η εμφάνιση στο σκοτεινό θάλαμο.

2.6 Ποσοτικοποίηση και στατιστική ανάλυση

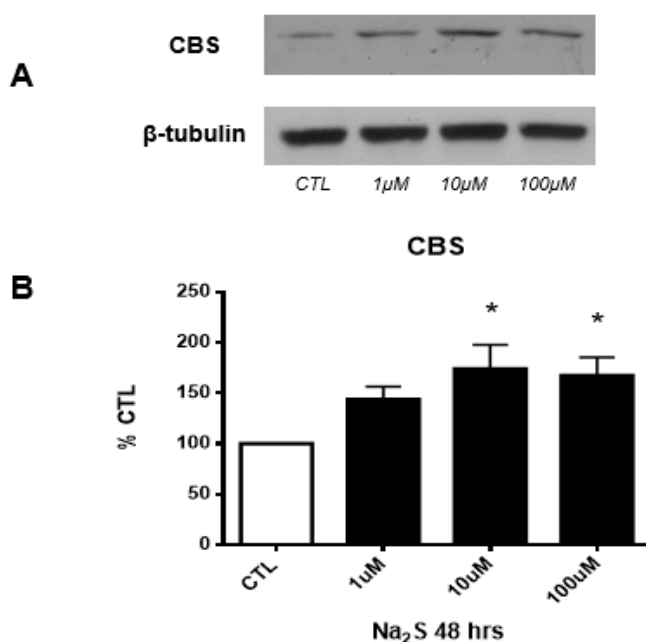
Η ποσοτικοποίηση των κηλίδων από την μέθοδο western πραγματοποιήθηκε με την χρήση του υπολογιστικού προγράμματος ImageJ. Στην μέθοδο MTT η ποσοτικοποίηση του χρωματισμένου διαλύματος έγινε σε φασματοφωτόμετρο (Tecan Genios Plate Reader) σε δύο μήκη κύματος 595nm και 750nm. Στην συνέχεια η εξαγωγή των αποτελεσμάτων, σε ποσοστά επί τις εκατό ως προς τις ομάδες ελέγχου, έγινε σε υπολογιστικά φύλλα excel.

Η επεξεργασία των γραφημάτων και η στατιστική ανάλυση έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism 6. Στα πειράματα που συγκρίθηκαν μόνο δύο ομάδες πραγματοποιήθηκε μη παραμετρικό t-test κατά Mann-Whitney, εφόσον υπήρχε μικρός αριθμός δειγμάτων και μη κανονική κατανομή. Για την σύγκριση περισσότερων ομάδων πραγματοποιήθηκε One Way Anova, όπου για μικρό αριθμό δειγμάτων (n=3 ή n=4) πραγματοποιήθηκε μη παραμετρικό τεστ Kruskal Wallis με post-hoc test πολλαπλών συγκρίσεων (Dunn's), ενώ για μεγάλα δείγματα με κανονική κατανομή πραγματοποιήθηκε παραμετρική One Way Anova με post-hoc test πολλαπλών συγκρίσεων (Tukey's).

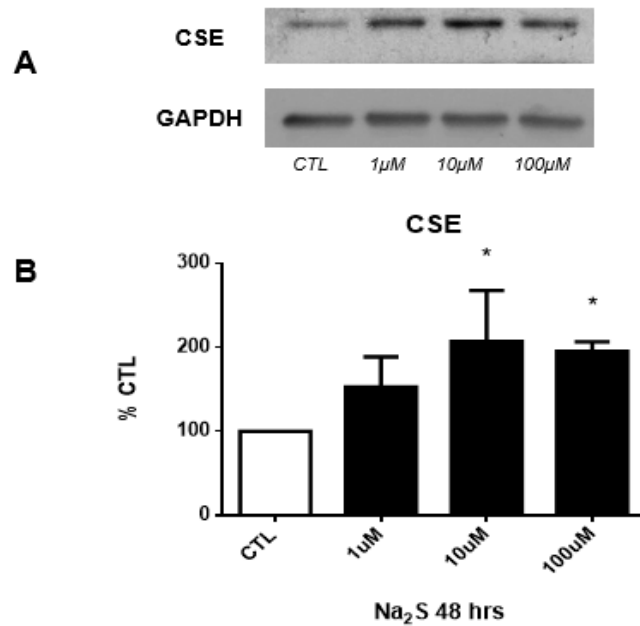
3. Αποτελέσματα

3.1 Έκφραση των ενζύμων παραγωγής H₂S μετά την χορήγηση Na₂S σε ενδοθηλιακά κύτταρα bEnd.3.

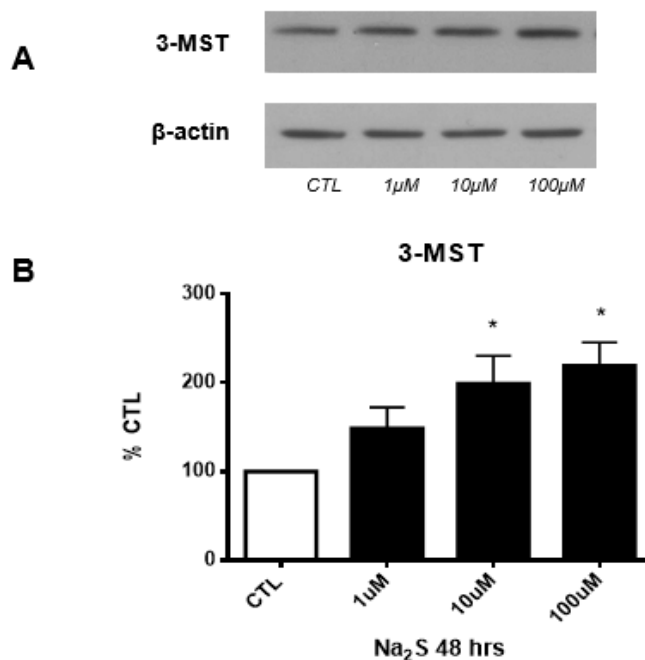
Σε καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων bEnd3 μελετήσαμε την επίδραση του γρήγορου δότη Na₂S στην έκφραση των ενζύμων παραγωγής H₂S, CBS, CSE, και 3-MST. Ο δότης χορηγήθηκε σε συγκεντρώσεις 1μM, 10μM και 100μM και προσδιορίστηκε η έκφραση των ενζύμων στις 48 ώρες επώασης των κυττάρων με ανοσοαποτύπωση western. Επειδή το Na₂S, όπως παρουσιάστηκε εκτενώς στο γενικό μέρος της εργασίας διαμορφώνει υψηλές συγκεντρώσεις H₂S μόνο για τα πρώτα 30 λεπτά και έπειτα απομακρύνεται, επαναχορηγήθηκε στις 24 ώρες. Παρατηρήσαμε αύξηση στην έκφραση και των 3 ενζύμων παραγωγής υδρόθειου και μάλιστα εξαρτώμενη από την δόση, αφού παρατηρήθηκε μόνο στις συγκεντρώσεις 10μM και 100μM.



*Εικόνα 19: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου φαίνεται η επίδραση του δότη Na₂S στην έκφραση του ενζύμου CBS στα κύτταρα bEnd.3, μετά από 48 ώρες επώασης. Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα κηλίδων για την έκφραση της CBS και της πρωτεΐνης ελέγχου της ίσης φόρτωσης των δειγμάτων, β -tubulin Β) Γράφημα ποσοτικοποίησης της CBS, όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των λόγων CBS/ β -tubulin, που έχουν εκφραστεί ως επί τοις εκατό ποσοστά της ομάδας ελέγχου. n=3, *p<0,05*



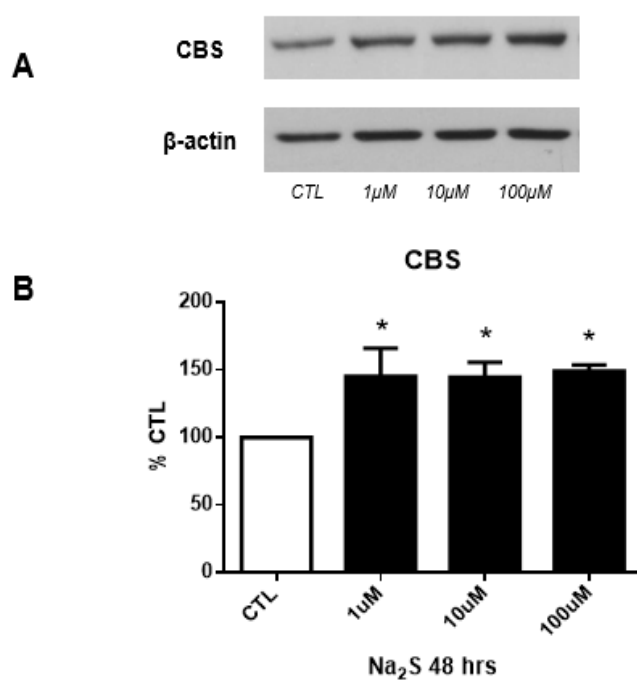
Εικόνα 20: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου φαίνεται η επίδραση του δότη Na_2S στην έκφραση του ενζύμου CSE στα κύτταρα bEnd.3, μετά από 48 ώρες επώασης. **A)** Αντιπροσωπευτική εικόνα κηλίδων για την έκφραση της CSE και της πρωτεΐνης ελέγχου της ίσης φόρτωσης των δειγμάτων, GAPDH **B)** Γράφημα ποσοτικοποίησης της CSE, όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των λόγων CSE/GAPDH, που έχουν εκφραστεί ως επί τοις εκατό ποσοστά της ομάδας ελέγχου. $n=3$, $*p<0,05$



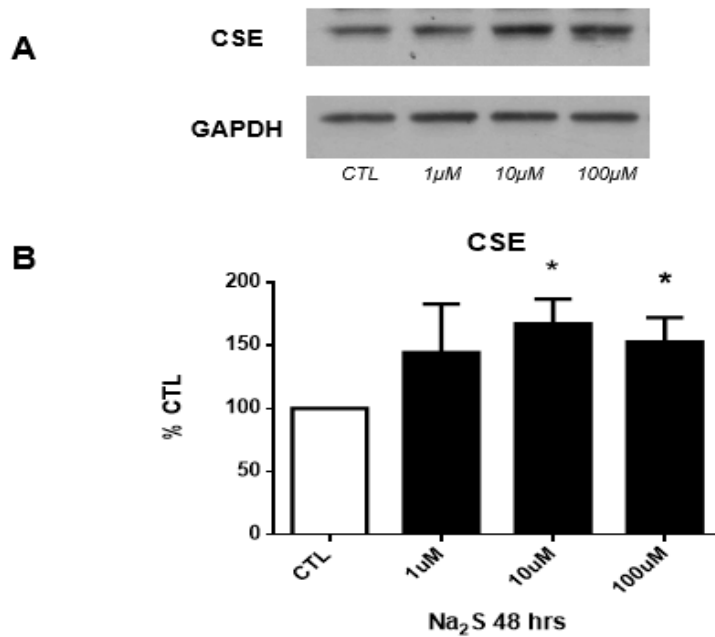
Εικόνα 21: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου φαίνεται η επίδραση του δότη Na_2S στην έκφραση του ενζύμου 3-MST στα κύτταρα bEnd.3, μετά από 48 ώρες επώασης. **A)** Αντιπροσωπευτική εικόνα κηλίδων για την έκφραση της 3-MST και της πρωτεΐνης ελέγχου της ίσης φόρτωσης των δειγμάτων, β -actin **B)** Γράφημα ποσοτικοποίησης της 3-MST, όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των λόγων 3-MST/ β -actin, που έχουν εκφραστεί ως επί τοις εκατό ποσοστά της ομάδας ελέγχου. $n=3$, $*p<0,05$

3.2 Έκφραση των ενζύμων παραγωγής H₂S μετά την χορήγηση Na₂S σε λεία μυϊκά κύτταρα A7r5.

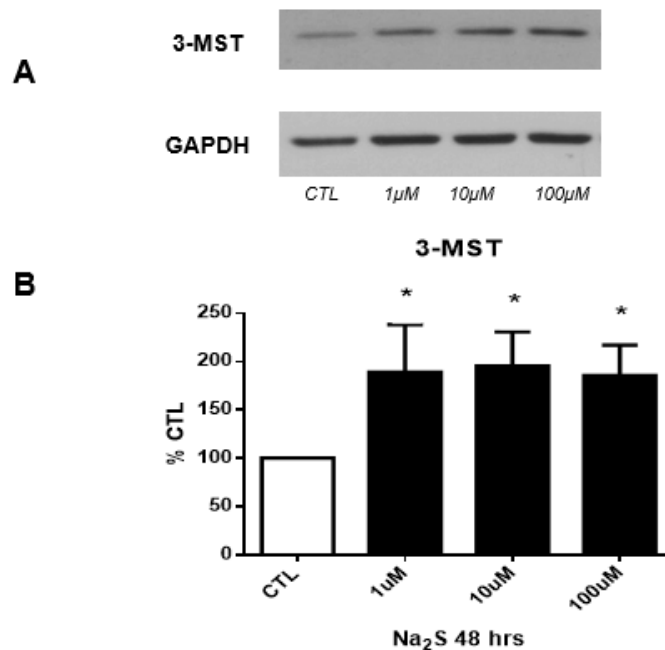
Σε καλλιέργεια λείων μυϊκών κυττάρων μελετήσαμε την επίδραση του γρήγορου δότη Na₂S στην έκφραση των ενζύμων παραγωγής H₂S, CBS, CSE, και 3-MST. Ο δότης χορηγήθηκε σε συγκεντρώσεις 1μM, 10μM και 100μM όπως και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, και προσδιορίστηκε η έκφραση των ενζύμων στις 48 ώρες επώασης των κυττάρων με western. Ομοίως το Na₂S, επαναχορηγήθηκε στις 24 ώρες. Παρατηρήσαμε αύξηση στην έκφραση και των 3 ενζύμων παραγωγής υδρόθειου. Η CBS και η 3-MST αυξήθηκαν σε όλες τις χορηγούμενες συγκεντρώσεις, ενώ η CSE αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά στις συγκεντρώσεις 10μM και 100μM.



Εικόνα 22: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου φαίνεται η επίδραση του δότη Na₂S στην έκφραση του ενζύμου CBS στα κύτταρα A7r5, μετά από 48 ώρες επώασης. A) Αντιπροσωπευτική εικόνα κηλίδων για την έκφραση της CBS και της πρωτεΐνης ελέγχου της ίσης φόρτωσης των δειγμάτων, β-actin B) Γράφημα ποσοτικοποίησης της CBS, όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των λόγων CBS/β-actin που έχουν εκφραστεί ως επί της εκατό ποσοστά τοις ομάδας ελέγχου. n=3, *p<0,05



Εικόνα 23: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου φαίνεται η επίδραση του δότη Na₂S στην έκφραση του ενζύμου CSE στα κύτταρα A7r5, μετά από 48 ώρες επώασης. **A)** Αντιπροσωπευτική εικόνα κηλίδων για την έκφραση της CSE και της πρωτεΐνης ελέγχου της ίσης φόρτωσης των δειγμάτων, GAPDH **B)** Γράφημα ποσοτικοποίησης της CSE, όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των λόγων CSE/GAPDH, που έχουν εκφραστεί ως επί τοις εκατό ποσοστά της ομάδας ελέγχου. n=3, *p<0,05



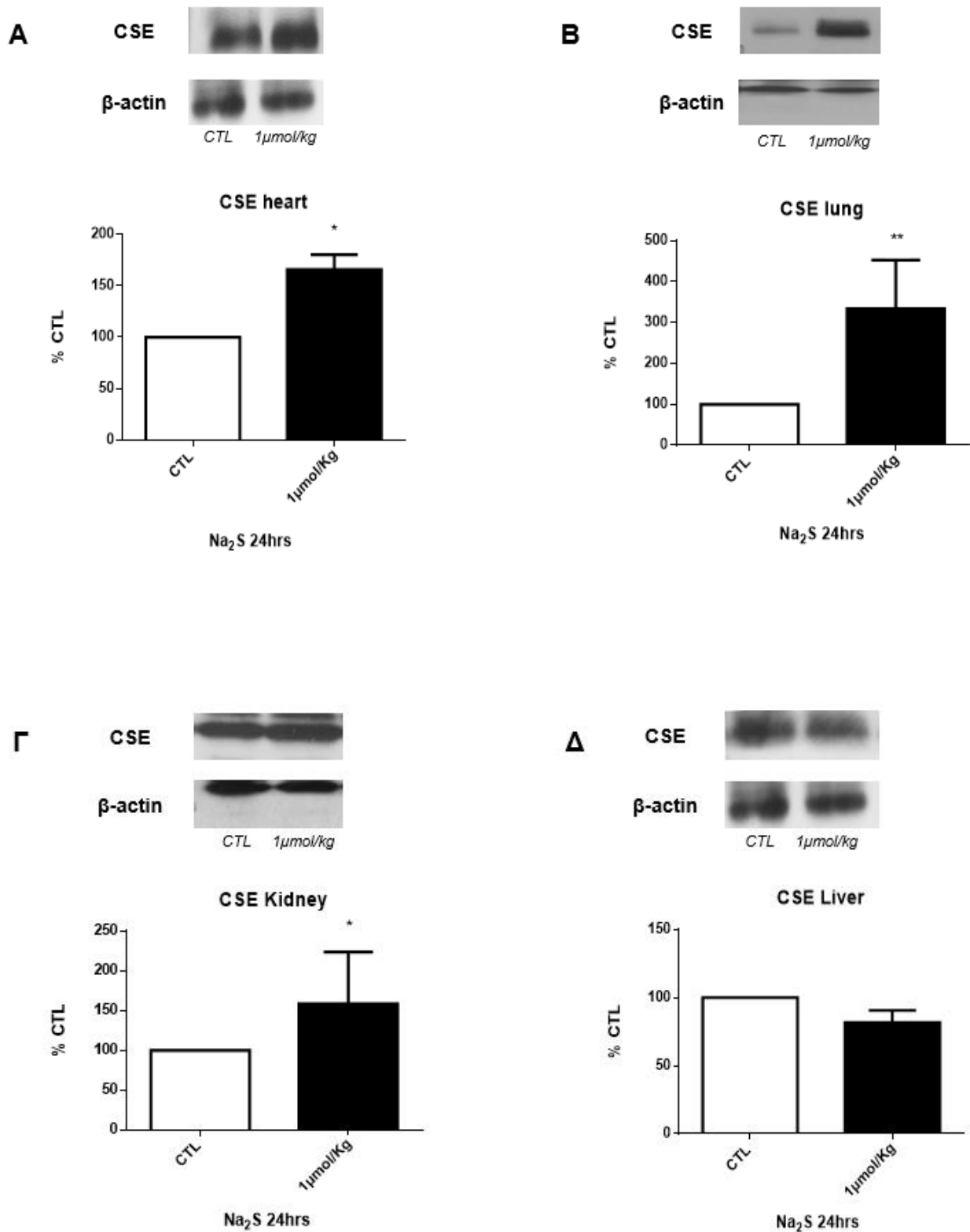
Εικόνα 24: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου φαίνεται η επίδραση του δότη Na₂S στην έκφραση του ενζύμου 3-MST στα κύτταρα A7r5, μετά από 48 ώρες επώασης. **A)** Αντιπροσωπευτική εικόνα κηλίδων για την έκφραση της 3-MST και της πρωτεΐνης ελέγχου της ίσης φόρτωσης των δειγμάτων, GAPDH **B)** Γράφημα ποσοτικοποίησης της 3-MST, όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των λόγων 3-MST/GAPDH, που έχουν εκφραστεί ως επί τοις εκατό ποσοστά της ομάδας ελέγχου. n=3, *p<0,05

3.3 Έκφραση των ενζύμων παραγωγής H₂S σε διάφορους ιστούς μετά από χορήγηση Na₂S σε μύες C57BL/6

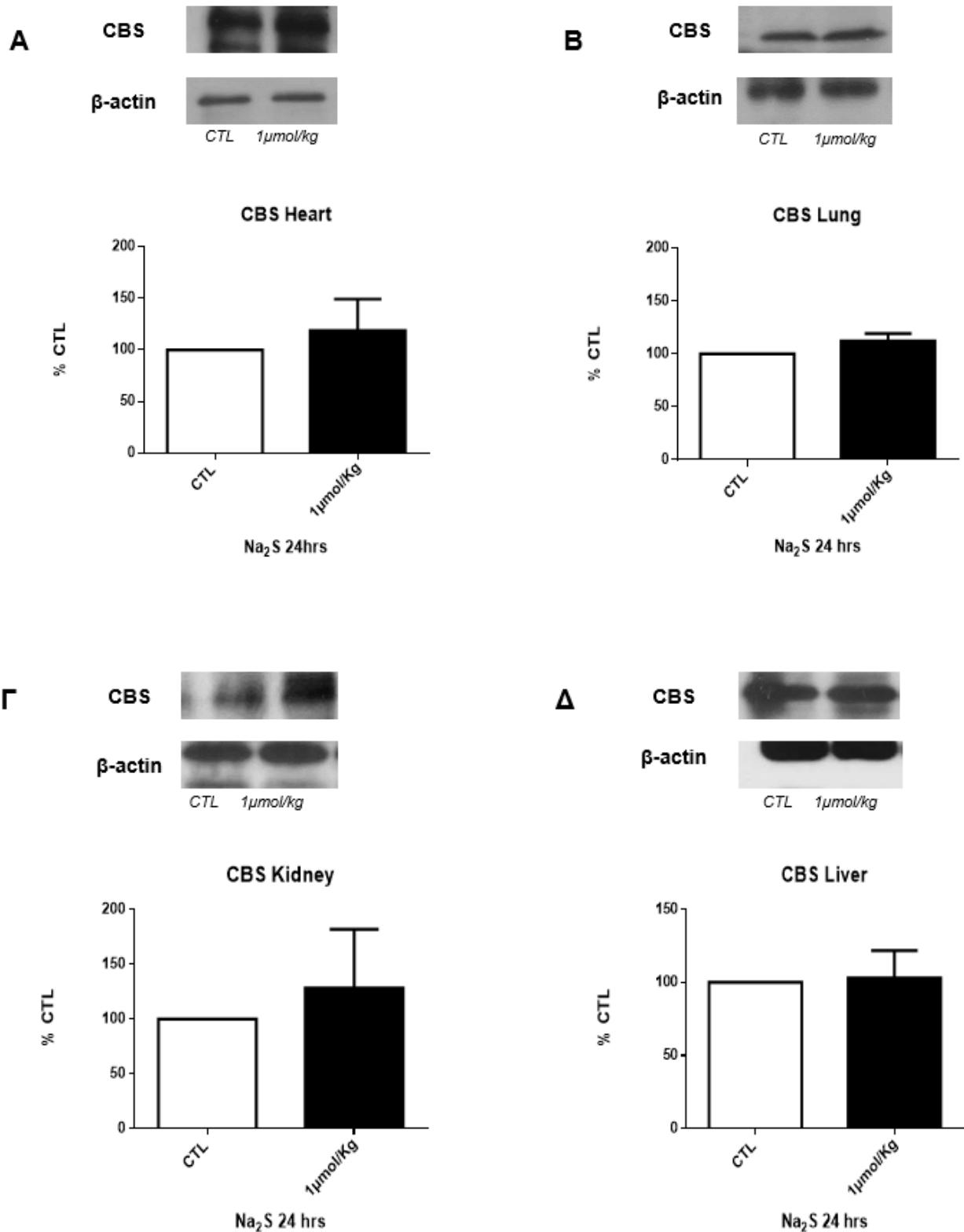
Η αύξηση που παρατηρήσαμε στους δυο κυτταρικούς τύπους στην έκφραση των ενζύμων παραγωγής H₂S μετά την χορήγηση θειούχου άλατος μας ώθησε στον σχεδιασμό αντίστοιχου in vivo πειράματος με σκοπό την διερεύνηση ανάλογης συμπεριφοράς της ενδογενούς παραγωγής μετά από χορήγηση H₂S εξωγενώς.

Τα αποτελέσματα που ακολουθούν προέκυψαν μετά από ανάλυση με western blot δειγμάτων από ιστούς 8 ποντικών C57BL/6, οι οποίοι χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, ελέγχου και ζώων που χορηγήθηκε Na₂S. Στα ζώα της δεύτερης ομάδας είχε χορηγηθεί Na₂S με ενδοπεριτονιακή στιγμιαία ένεση σε δόση 1 μmol/kg. Στις 12 ώρες πραγματοποιήθηκε επαναχορήγηση της ίδιας δόσης θειούχου άλατος. Μετά από 24 ώρες τα ζώα θυσιάστηκαν και απομονώθηκε η καρδιά, οι πνεύμονες, το ήπαρ και οι νεφροί.

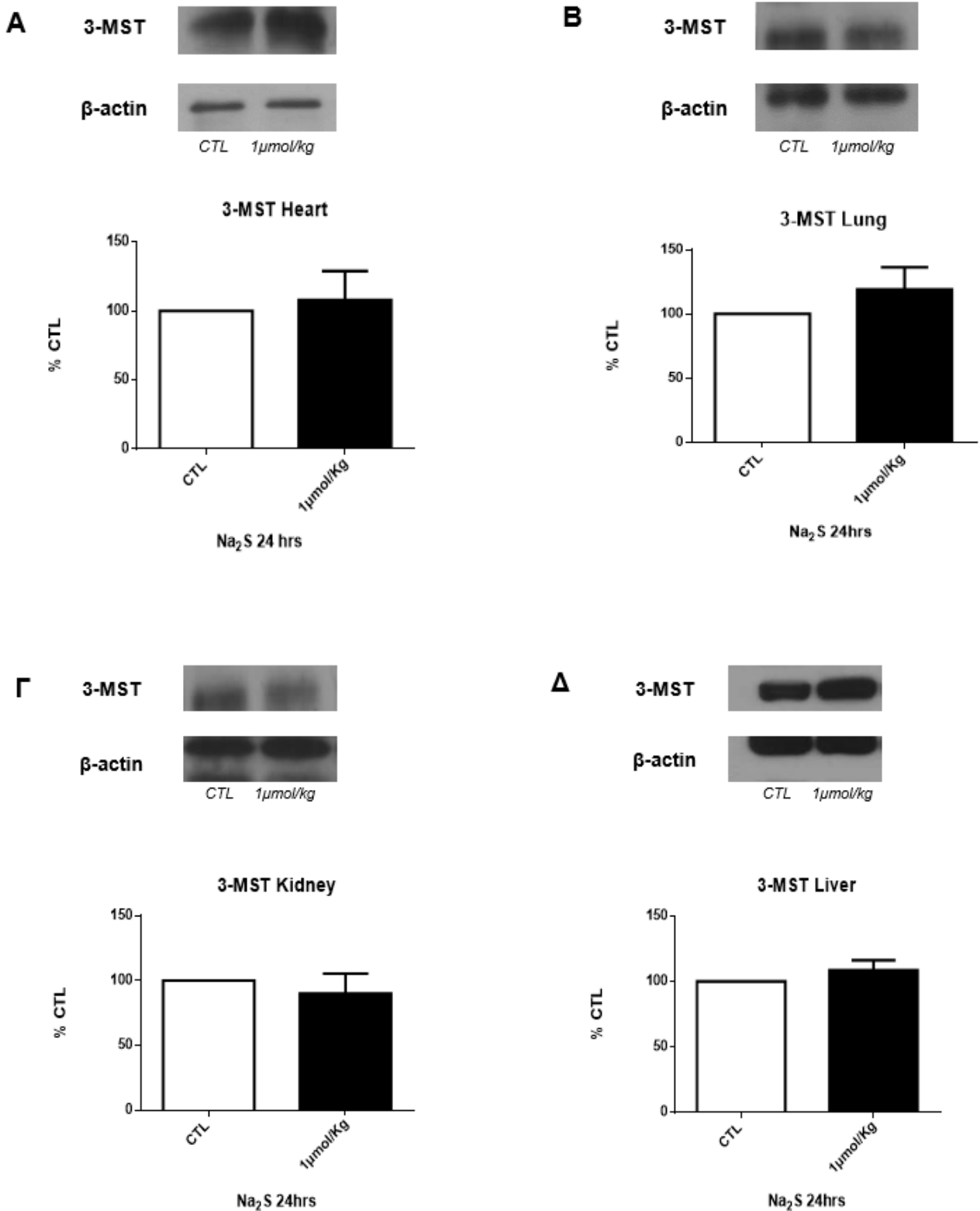
Τα δεδομένα μας παρατίθενται παρακάτω ανά ένζυμο στους διαφορετικούς ιστούς. Παρατηρήσαμε αύξηση στην έκφραση της CSE η οποία είναι στατιστικά σημαντική στην καρδιά, στους πνεύμονες και στους νεφρούς. Στο ήπαρ φαίνεται μια τάση για μείωση της έκφραση, που όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Η έκφραση της CBS δεν φαίνεται να επηρεάζεται στατιστικά σε κανέναν ιστό, αν και υπάρχει μικρή αυξητική τάση στην καρδιά, στους πνεύμονες και στους νεφρούς. Τέλος η έκφραση της 3-MST παρουσιάζει παρόμοια τάση με την CBS, χωρίς να παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή.



Εικόνα 24: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου φαίνεται η επίδραση του δότη Na_2S στην έκφραση του ενζύμου CSE σε ιστούς μύων C57BL/6, 24 ώρες μετά την χορήγηση. Φαίνονται οι αντιπροσωπευτικές εικόνες κηλίδων για την έκφραση της CSE και της πρωτεΐνης ελέγχου της ίσης φόρτωσης των δειγμάτων, β -actin. Τα γραφήματα ποσοτικοποίησης της CSE, σχεδιάστηκαν βάσει των μέσων τιμών των λόγων CSE/ β -actin και έχουν εκφραστεί ως επί τοις εκατό ποσοστά της ομάδας ελέγχου. Α) έκφραση CSE στην καρδιά Β) έκφραση CSE στους πνεύμονες Γ) έκφραση CSE στους νεφρούς Δ) έκφραση CSE στο ήπαρ $n=4$, * $p<0,05$



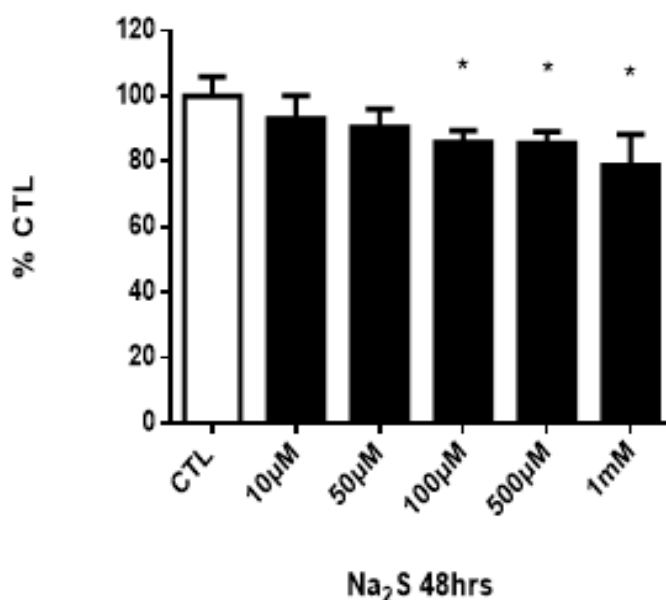
Εικόνα 25: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου φαίνεται η επίδραση του δότη Na_2S στην έκφραση του ενζύμου CBS σε ιστούς μύων C57BL/6, 24 ώρες μετά την χορήγηση. Φαίνονται οι αντιπροσωπευτικές εικόνες κηλίδων για την έκφραση της CBS και της πρωτεΐνης ελέγχου της ίσης φόρτωσης των δειγμάτων, β -actin. Τα γραφήματα ποσοτικοποίησης της CBS, σχεδιάστηκαν βάσει των μέσων τιμών των λόγων CBS/ β -actin και έχουν εκφραστεί ως επί τοις εκατό ποσοστά της ομάδας ελέγχου. Α) έκφραση CBS στην καρδιά Β) έκφραση CBS στους πνεύμονες Γ) έκφραση CBS στους νεφρούς Δ) έκφραση CBS στο ήπαρ $n=4$, $*p<0,05$



Εικόνα 25: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου φαίνεται η επίδραση του δότη Na_2S στην έκφραση του ενζύμου 3-MST σε ιστούς μύων C57BL/6, 24 ώρες μετά την χορήγηση. Φαίνονται οι αντιπροσωπευτικές εικόνες κηλίδων για την έκφραση της 3-MST και της πρωτεΐνης ελέγχου της ίσης φόρτωσης των δειγμάτων, β -actin. Τα γραφήματα ποσοτικοποίησης της 3-MST, σχεδιάστηκαν βάσει των μέσων τιμών των λόγων 3-MST/ β -actin και έχουν εκφραστεί ως επί τοις εκατό ποσοστά της ομάδας ελέγχου. Α) έκφραση 3-MST στην καρδιά Β) έκφραση 3-MST στους πνεύμονες Γ) έκφραση 3-MST στους νεφρούς Δ) έκφραση 3-MST στο ήπαρ $n=2$, $*p<0,05$

3.4 Πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων μετά την χορήγηση θειούχου άλατος

Επώασαμε λεία μυϊκά κύτταρα και μελετήσαμε τον πολλαπλασιασμό τους μετά από χορήγηση Na_2S με την μέθοδο MTT. Το Na_2S χορηγήθηκε σε συγκεντρώσεις 10 μM , 50 μM , 100 μM , 500 μM , 1mM. Το πείραμα διήρκεσε 48 ώρες με επαναχορήγηση του άλατος στις 24 ώρες. Παρατηρήσαμε μικρή μείωση στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων μετά την δόση των 100 μM .

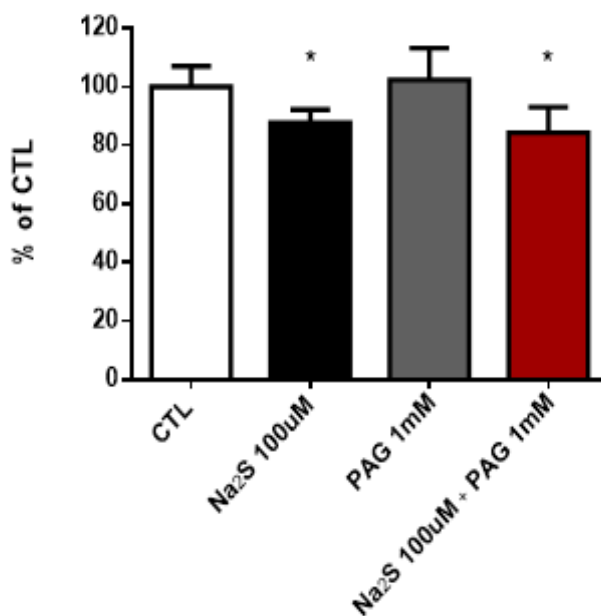


Εικόνα 26 : Αποτελέσματα MTT για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων A7r5 μετά την χορήγηση Na_2S σε συγκεντρώσεις 10 μM , 50 μM , 100 μM , 500 μM , 1mM. Στο γράφημα η ποσοτικοποίηση έχει γίνει με μετατροπή των απορροφήσεων που μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο στα 595nm και στα 750nm, σε λόγους επί τοις εκατό, της διαφοράς των απορροφήσεων (595nm-750nm) κάθε δείγματος, προς τον μέσο όρο των απορροφήσεων της ομάδας ελέγχου. n=16, p*<0,05

3.5 Πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων μετά την συγχορήγηση θειούχου άλατος και αναστολέα της CSE

Ο PAG είναι ισχυρός αναστολέας της CSE. Χρησιμοποιήθηκε σε βιβλιογραφική δόση 1mM και δεν προκάλεσε αλλαγές στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων χορηγούμενος μόνος του. Χορηγήθηκε σε πολύ υψηλή δόση σε σύγκριση με άλλους αναστολείς λόγω της μικρής διαπερατότητας του μορίου από την κυτταρική μεμβράνη.

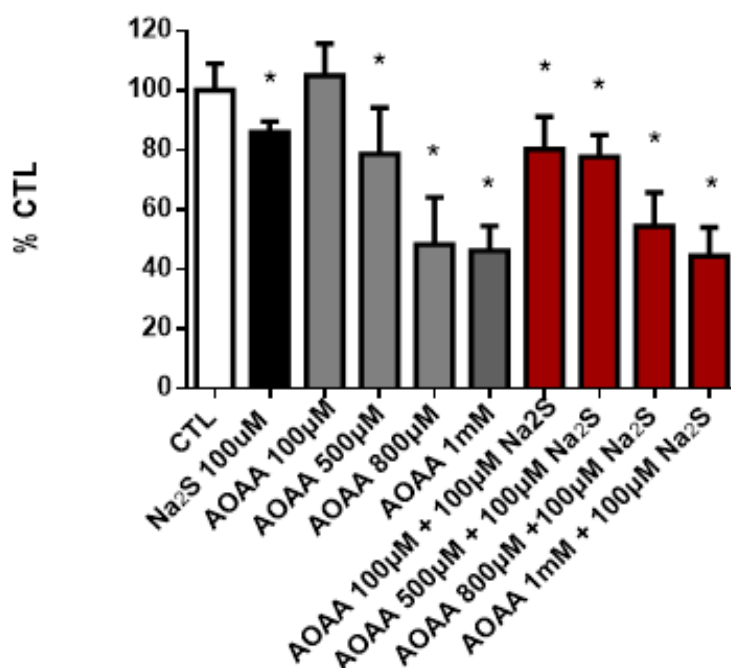
Ο PAG χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να μελετήσουμε αν η συγχορήγηση με τον δότη Na_2S σε συγκέντρωση 100 μM θα επηρεάσει την φαρμακολογική αναστολή του πολλαπλασιασμού που προκαλεί το εξωγενές H_2S . Παρατηρήσαμε ότι δεν μεταβλήθηκε σημαντικά η μείωση του πολλαπλασιασμού που προκαλεί ο δότης χορηγούμενος μόνος του. Άρα το αποτέλεσμα πιθανόν υποδεικνύει πως ο PAG, και η αναστολή της CSE σε συνήθεις συγκεντρώσεις δεν επηρεάζει την δράση του δότη. Συμπερασματικά η αύξηση στην έκφραση της CSE που προκαλεί το Na_2S στις 48 ώρες, δεν σχετίζεται με την ικανότητα του δότη να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό σε αυτό το διάστημα.



Εικόνα 27 : Αποτελέσματα MTT για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων A7r5 μετά την χορήγηση δότη Na_2S , την χορήγηση αναστολέα της CSE PAG και την συγχορήγηση των δύο φαρμάκων. Η συγχορήγηση δεν αναστρέφει την αναστολή του πολλαπλασιασμού που προκαλεί ο δότης. Στο γράφημα η ποσοτικοποίηση έχει γίνει με μετατροπή των απορροφήσεων που μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο στα 595nm και στα 750nm, σε λόγους επί τοις εκατό, της διαφοράς των απορροφήσεων (595nm-750nm) κάθε δείγματος, προς τον μέσο όρο των απορροφήσεων της ομάδας ελέγχου. $n=16, p^*<0,05$

3.6 Πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων μετά την συγχορήγηση θειούχου άλατος και ΑΟΑΑ

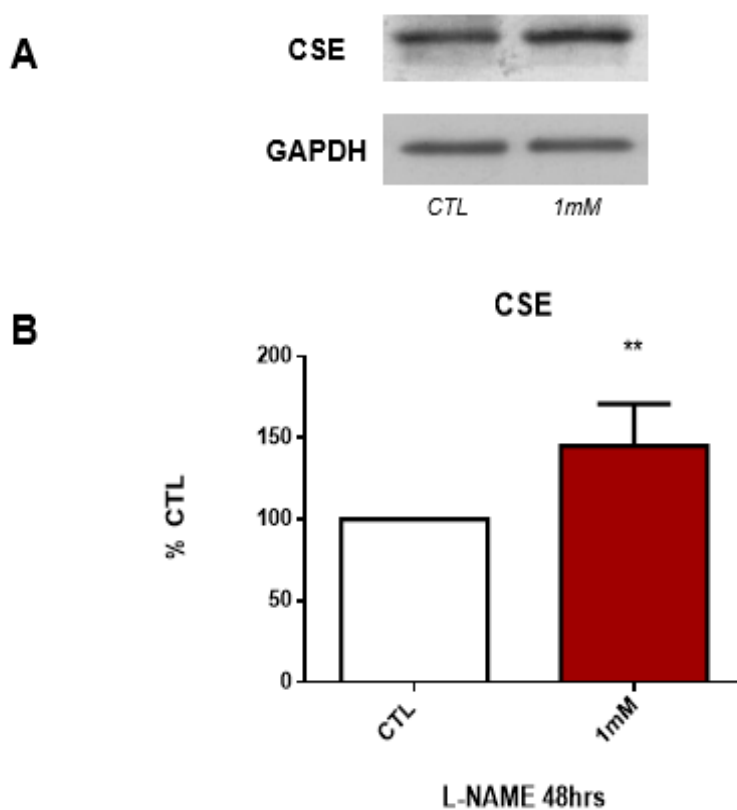
Μελετήσαμε την επίδραση του μικτού αναστολέα της CBS και της CSE, ΑΟΑΑ, στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων A7r5. Χορηγήσαμε τον αναστολέα σε συγκεντρώσεις 100μM, 500μM, 800μM και 1mM. Η χρήση του ΑΟΑΑ οδηγεί μείωση του πολλαπλασιασμού σε συγκέντρωση ΑΟΑΑ πάνω των 500μM (ισχυρή αναστολή CBS). Πιθανόν οι συγκεντρώσεις αυτές αρχίζουν να γίνονται τοξικές για το κύτταρο. Στην συνέχεια επιλέχθηκε να μελετηθεί η συγχορήγηση Na₂S με τον ΑΟΑΑ, ώστε να ερευνήσουμε αν ο μεικτός αναστολέας αναιρεί την μείωση του πολλαπλασιασμού που προκαλεί ο δότης. Από το διάγραμμα φαίνεται ότι σε συγχορήγηση Na₂S και ΑΟΑΑ, η αναστολή που προκαλείται στην CBS και την CSE δεν αντιστρέφει την μείωση του πολλαπλασιασμού που προκαλεί το Na₂S, σε καμία από τις χορηγούμενες δόσεις. Επίσης η μείωση στις ομάδες συγχορήγησης δεν διαφέρει από την μείωση του πολλαπλασιασμού που προκαλεί ο αναστολέας μόνος του σε μεγάλες συγκεντρώσεις.



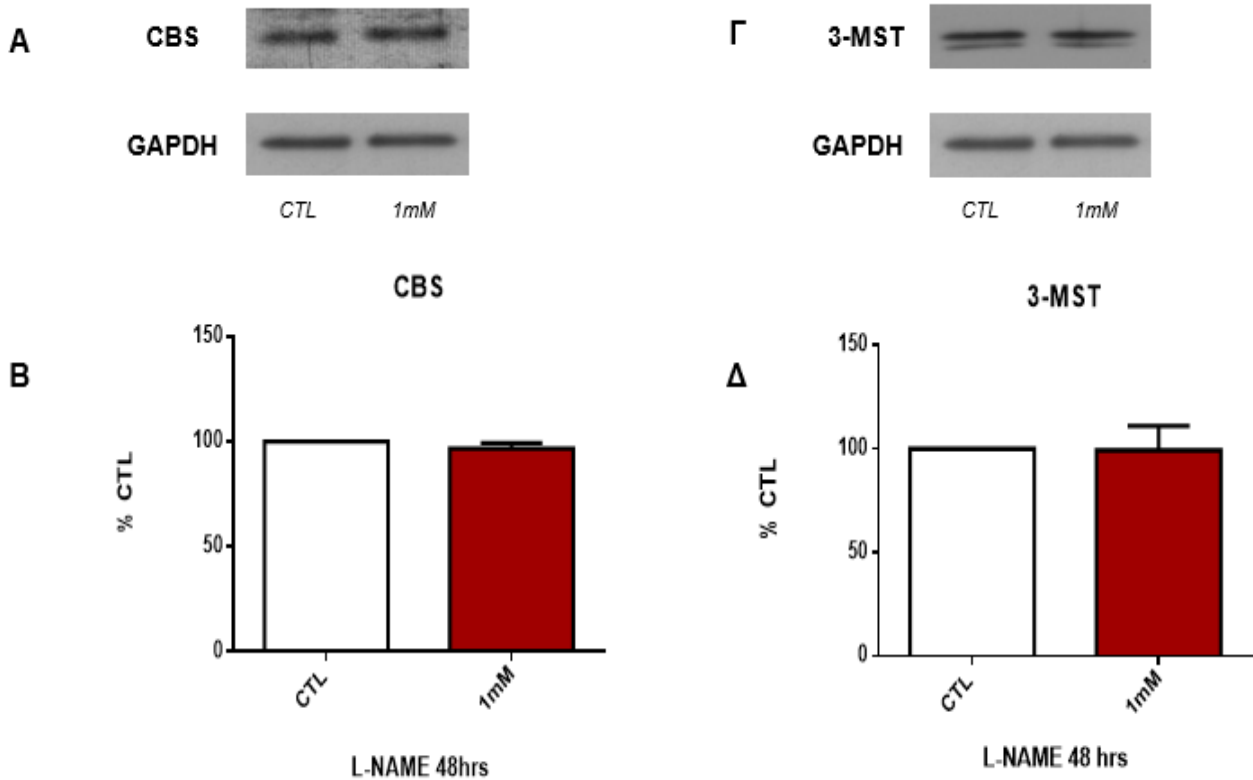
Εικόνα 28 : Αποτελέσματα MTT για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων A7r5 μετά την χορήγηση δότη Na₂S, την χορήγηση μεικτού αναστολέα της CSE και της CBS ΑΟΑΑ και την συγχορήγηση των δύο φαρμάκων. Η συγχορήγηση δεν αναστρέφει την αναστολή του πολλαπλασιασμού που προκαλεί ο δότης. Στο γράφημα η ποσοτικοποίηση έχει γίνει με μετατροπή των απορροφήσεων που μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο στα 595nm και στα 750nm, σε λόγους επί τοις εκατό της διαφοράς των απορροφήσεων (595nm-750nm) κάθε δείγματος, προς τον μέσο όρο των απορροφήσεων της ομάδας ελέγχου. Αν και παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και τις υπόλοιπες συνθήκες, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες συγχορήγησης και στον δότη. n=16, p* < 0,05

3.7 Έκφραση των ενζύμων παραγωγής H₂S μετά την χορήγηση αναστολέα της eNOS σε ενδοθηλιακά κύτταρα bEnd.3.

Σε καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων bEnd.3 ερευνήσαμε αν επηρεάζεται η έκφραση των ενζύμων παραγωγής H₂S μετά από αναστολή της ενδογενούς παραγωγής NO. Χορηγήθηκε ο αναστολέας της eNOS L-NAME σε συγκέντρωση 1μM. Μετά από 48 ώρες προσδιορίσαμε με ανοσοαποτύπωση western, τις μεταβολές στην έκφραση της CSE, της CBS και της 3-MST. Παρατηρήσαμε ότι η αναστολή της eNOS προκάλεσε αύξηση στην έκφραση της CSE, ενώ δεν επηρέασε καθόλου την έκφραση των άλλων δύο ενζύμων. Άρα εντοπίσαμε μια νέα συσχέτιση ανάμεσα στην ενδογενή παραγωγή NO και H₂S.



Εικόνα 29: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου φαίνεται η επίδραση του αναστολέα L-NAME στην έκφραση του ενζύμου CSE στα κύτταρα bEnd.3, μετά από 48 ώρες επώασης. Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα κηλίδων για την έκφραση της CSE και της πρωτεΐνης ελέγχου της ίσης φόρτωσης των δειγμάτων, GAPDH Β) Γράφημα ποσοτικοποίησης της CSE, όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των λόγων CSE/GAPDH, που έχουν εκφραστεί ως επί τοις εκατό ποσοστά της ομάδας ελέγχου. n=5, *p<0,05



Εικόνα 30: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου φαίνεται η επίδραση του δότη Na_2S στην έκφραση των ενζύμων CBS και 3-MST στα κύτταρα bEnd.3, μετά από 48 ώρες επώασης. **A)** Αντιπροσωπευτική εικόνα κηλίδων για την έκφραση της CBS και της πρωτεΐνης ελέγχου της ίσης φόρτωσης των δειγμάτων, GAPDH **B)** Γράφημα ποσοτικοποίησης της CBS, όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των λόγων CBS/GAPDH, που έχουν εκφραστεί ως επί τοις εκατό ποσοστά της ομάδας ελέγχου. $n=3$, $*p<0,05$ **Γ)** Αντιπροσωπευτική εικόνα κηλίδων για την έκφραση της 3-MST και της πρωτεΐνης ελέγχου της ίσης φόρτωσης των δειγμάτων, GAPDH **Δ)** Γράφημα ποσοτικοποίησης της 3MST, όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των λόγων 3-MST/GAPDH, που έχουν εκφραστεί ως επί τοις εκατό ποσοστά της ομάδας ελέγχου. $n=3$, $*p<0,05$

4. Συζήτηση

Το H_2S αποτελεί το νεότερο αέριο μόριο μεταγωγής σήματος. Όπως φανερώνει το σύνολο των πληροφοριών και των επιστημονικών δεδομένων που παρατίθενται στο γενικό μέρος της εργασίας, η βαθύτερη μελέτη των ιδιοτήτων του και των βιολογικών μηχανισμών στους οποίους εμπλέκεται θα μπορούσε να εμπλουτίσει τις γνώσεις μας σχετικά με τις φυσιολογικές διεργασίες και την παθοφυσιολογία των νόσων. Μπορεί επίσης να αποτελέσει πεδίο εφαρμογής νέων θεραπευτικών στρατηγικών και ανάπτυξης νέων φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία μας απασχόλησε η συσχέτιση της εξωγενούς χορήγησης H_2S με την ενδογενή παραγωγή του αερίου. Συγκεκριμένα μελετήσαμε πως επηρεάζεται η έκφραση των τριών ενζύμων που παράγουν H_2S μετά την χορήγηση γρήγορου ανόργανου δότη H_2S . Παρατηρήσαμε ότι τόσο στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όσο και στα λεία μυϊκά κύτταρα η χορήγηση θειούχου άλατος προκάλεσε αύξηση στην έκφραση και των τριών ενζύμων. Αντίστοιχα σε καρδιά, πνεύμονα και νεφρό ποντικού παρατηρήσαμε αύξηση στην έκφραση της CSE, ενώ τα επίπεδα των άλλων δυο ενζύμων έμειναν σταθερά. Στο ήπαρ δεν υπήρξε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή, γεγονός που αναδεικνύει πως η μεταβολή της ενδογενούς παραγωγής H_2S μετά από εξωγενή χορήγηση του αερίου διαφέρει ανάλογα με τον ιστό του ζώου.

Η συγκεκριμένη ιδιότητα των δοτών H_2S είναι ιδιαίτερη, αφού συνήθως στην πλειονότητα των σηματοδοτικών μορίων, παρατηρείται μετά από μία μεγάλη αύξηση των επιπέδων του διαβιβαστή στον οργανισμό, ελάττωση της έκφρασης ή της ενεργότητας των ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις παραγωγής του. Μέχρι σήμερα υπήρχαν ερευνητικές ομάδες που είχαν παρατηρήσει παρόμοια συμπεριφορά με αύξηση της ενδογενούς παραγωγής, μετά από χορήγηση άλλων δοτών H_2S σε κύτταρα, αλλά και ιστούς ζώων. Όμως ποτέ δεν έχει γίνει κάποια συστηματική προσπάθεια μελέτης του φαινομένου. Αντιθέτως η επίδραση του εξωγενώς χορηγούμενου NO στην έκφραση της eNOS είναι αρκετά καλά προσδιορισμένη και ακολουθεί την παραπάνω γενική φαρμακολογική αρχή. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι η χορήγηση NO σε ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και σε ζώα να προκαλεί μείωση στην έκφραση και την ενεργότητα της eNOS, όπως και στην έκφραση του γονιδίου της eNOS σε ιστούς όπως το μυοκάρδιο και οι πνεύμονες [79, 80]

Αρχικά το φαινόμενο της αύξησης της έκφρασης της CSE μετά από εξωγενή χορήγηση υδροθείου, έχει προταθεί από σειρά μελετών ως ένας βασικός μηχανισμός δράσης των φυσικών δοτών του σκόρδου και των ημισυνθετικών παραγώγων τους. Ενδεικτικά η ομάδα των Chuah et al σε μελέτη που ασχολήθηκε με τις καρδιοπροστατευτικές δράσεις του ημισυνθετικού δότη SAC παρατήρησε αυξημένη έκφραση της CSE στο μυοκάρδιο αρουραίων, αλλά και στο πλάσμα, μετά

την χορήγηση του δότη. Μάλιστα η συγχορήγηση του ειδικού αναστολέα της CSE (PAG) ακύρωσε τις ευεργετικές ιδιότητες που προκαλούσε η SAC στην έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου [81].

Επιπλέον τρεις μελέτες ασχολήθηκαν με τον μηχανισμό δράσης των φυσικών δοτών H_2S του σκόρδου σε διάφορα μοντέλα παθολογικών καταστάσεων. Οι Chen et al μελέτησαν την επίδραση του DATS στην χρόνια ηπατοπάθεια και συγκεκριμένα στο αλκοολικό λιπώδες ήπαρ (AFL). Ασχολήθηκαν κυρίως με τον μηχανισμό της φαρμακολογικής δράσης του DATS στην ελάττωση του οξειδωτικού στρες. Για να προσομοιάσουν την νόσο επώασαν ηπατοκύτταρα (LO2) σε αιθανόλη και χρησιμοποίησαν αρουραίους όπου εφάρμοσαν ενδογαστρική έγχυση αλκοόλης. Στην συνέχεια χορηγήθηκε ο δότης H_2S . Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι ο δότης πράγματι μείωσε τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών, ενώ παρουσίασε και αντιαποπτωτικές ιδιότητες. Στα ηπατοκύτταρα προκάλεσε μείωση της έκφρασης της αποπτωτικής Bax, αλλά και της κασπάσης -3 που είχε διεγερθεί από τη αλκοόλη, ενώ προκάλεσε και ρύθμιση της έκφρασης προς τα πάνω για της αντιαποπτωτική Bcl-2. Επιπλέον παρατήρησαν ότι ο DATS αύξησε την έκφραση της CSE, αλλά και της CBS, και μάλιστα εξαρτώμενα από την δόση. Η χορήγηση του δότη πραγματοποιήθηκε μετά την χορήγηση αλκοόλης και η σύγκριση πραγματοποιήθηκε με την ομάδα όπου συστηματικά χορηγούταν μόνο αιθανόλη, στην οποία η έκφραση των ενζύμων παραγωγής H_2S παρατηρείται μειωμένη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [82].

Στο καρδιαγγειακό σύστημα ο δότης DATS προκαλεί αντίστοιχα αποτελέσματα. Σε καρδιομυοκύτταρα H9c2 που επωάζονταν σε καλλιεργητικό υλικό με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη, αλλά και σε ιστό καρδιάς αρουραίων που έπασχαν από διαβήτη αποδείχθηκε ότι η έκφραση της CSE είναι μειωμένη, ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται η έκφραση της Akt. Η θεραπεία με DATS μείωσε την απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων και αύξησε την έκφραση της CSE. Μάλιστα ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η αναστολή της CSE με συγχορήγηση PAG ή με την χρησιμοποίηση siRNA, αναστέλλει τις καρδιοπροστατευτικές δράσεις του δότη, υποδηλώνοντας πως η αύξηση της ενδογενούς παραγωγής μετά την χορήγηση του δότη σχετίζεται με κάποιες από τις φαρμακολογικές ιδιότητες του μορίου [83].

Σημαντικά δεδομένα παρέχονται και για την επίδραση των φυσικών δοτών H_2S στο νεφρό. Οι Iciek et al έδειξαν πως ανάμεσα στους δότες DAS, DADS, DATS οι δύο τελευταίοι προκάλεσαν αύξηση στην έκφραση της CSE, αλλά και των σουλφυδίων στο νεφρό ποντικών, μετά από ενδοπεριτοναϊκή επαναλαμβανόμενη χορήγηση. Το αποτέλεσμα αυτό θεωρήθηκε συνέπεια του

γεγονότος ότι η CSE καταλύει αντιδράσεις που παράγουν σουλφυδρυλιωμένα παράγωγα αμινοξέων, όπως η θειοκυστεΐνη [84].

Άλλο παράδειγμα αποτελεί η εργασία των Menget et al που αφορά την υπερτροφία του μυοκαρδίου. Στην συγκεκριμένη πάθηση έχει παρατηρηθεί μειωμένη έκφραση της CSE και αύξηση του μεταγραφικού παράγοντα KLF-5 (Kruppel-like factor 5). Αρουραίοι ηλικίας 12 βδομάδων θεραπεύτηκαν με GYY4137 που χορηγήθηκε σε συγκεντρώσεις 10mg/kg, 25mg/kg, 50mg/kg με μια ενέσιμη χορήγηση κάθε μέρα για συνολικό διάστημα 4 βδομάδων. Με μέθοδο western blot και real time PCR αποδείχθηκε ότι το GYY4137, δηλαδή ένας αργός οργανικός δότης H_2S , άσκησε ευεργετική επίδραση έναντι της υπερτροφίας του μυοκαρδίου, μειώνοντας την έκφραση του KLF-5 και αυξάνοντας την έκφραση της CSE [85].

Οι παραπάνω εργασίες αποτέλεσαν πηγή προβληματισμού για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας με στόχο την αποσαφήνιση των μεταβολών που προκαλεί η εξωγενής χορήγηση H_2S στην έκφραση των ενζύμων που το παράγουν, σε κυτταρικούς πληθυσμούς αλλά και ζώα. Η διαφορά στον σχεδιασμό του πειραματικού πρωτοκόλλου της παρούσας εργασίας έγκειται στο γεγονός πως σε όλες τις προηγούμενες εργασίες χρησιμοποιήθηκαν οργανικοί δότες H_2S , και κυρίως τα φυσικά συστατικά του σκόρδου. Γνωρίζοντας ότι το Na_2S και το $NaHS$ είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιημένοι δότες H_2S στην βιβλιογραφία, αποφασίσαμε να μελετήσουμε συστηματικά την επίδραση των δοτών H_2S με ταχύ ρυθμό απελευθέρωσης, στα ένζυμα παραγωγής H_2S , με χορήγηση θειούχων αλάτων. Αυτό το εγχείρημα δεν αναφέρεται ξανά στην βιβλιογραφία. Η επιλογή αυτή βασίστηκε επιπλέον στην ιδιότητα των θειούχων αλάτων να εμφανίζουν τις φαρμακολογικές τους δράσεις και να τις διατηρούν για μεγάλο διάστημα μετά την χορήγηση, σε συνδυασμό με την ταχεία απέκκρισή τους από το βιολογικό σύστημα. Η διέγερση της ενδογενούς παραγωγής H_2S μετά την χορήγηση του ανόργανου δότη πιθανόν να δίνει μια απάντηση στο παραπάνω φαινόμενο. Δηλαδή η αύξηση στην έκφραση των ενζύμων που παρατηρήσαμε στους δύο κυτταρικούς τύπους και τους ιστούς των ποντικών, πιθανόν αποτελεί μέρος της φαρμακολογικής δράσης του γρήγορου δότη.

Μία δεύτερη διαφορά είναι πως το πρωτόκολλο της παρούσας εργασίας αφορά υγιή ζώα και κύτταρα. Δεν επιδιώξαμε να συσχετίσουμε αυτή την τάση αύξησης της έκφρασης των ενζύμων παραγωγής H_2S με κάποιο παθολογικό μοντέλο, όπως γίνεται σε όλες τις μελέτες που προαναφέρθηκαν. Προσπαθήσαμε να εντοπίσουμε πως μεταβάλλεται η έκφραση μετά την χορήγηση H_2S γενικά κατά την φυσιολογική λειτουργία. Έτσι μπορούμε κατ' αρχάς να προσδιορίσουμε αν το φαινόμενο αφορά αποκλειστικά παθολογικές καταστάσεις, όπου υπάρχει ανεπιθύμητη μείωση της

έκφρασης των ενζύμων παραγωγής H_2S , ή αν προκύπτει ως αποτέλεσμα σηματοδοτικών μονοπατιών που επεμβαίνει το εξωγενές H_2S φυσιολογικά.

Επίσης πρέπει να τονίσουμε ότι σε όλες τις παραπάνω εργασίες γίνεται αναφορά για αύξηση στην έκφραση μόνο της CSE. Όμως τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι στους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς έχουμε αύξηση όλων των ενζύμων. Αντίστοιχα στα *in vivo* υπάρχει συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Επίσης στα πειράματά μας δεν φάνηκε καμία αλλαγή στην έκφραση των ενζύμων στο ήπαρ. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα δεν είναι αναγκαστικά σε αντίθεση με το άρθρο των Chen et al. [82] που παρουσιάστηκε προηγουμένως, και εντοπίζει αύξηση στην έκφραση των ενζύμων σε ηπατοκύτταρα και σε ήπαρ αρουραίων. Πιθανόν να παίζει ρόλο το διαφορετικό είδος πειραματόζωου ή το γεγονός πως η παραπάνω μελέτη γίνεται σε μοντέλο προσομοίωσης παθολογικής κατάστασης με έλλειψη της CSE, και όχι σε υγιές ζώο .

Στην συνέχεια επιδιώξαμε να μελετήσουμε πιο συγκεκριμένα σε *in vitro* συνθήκες αν η διέγερση της ενδογενούς παραγωγής που δείξαμε ότι προκαλεί ο δότης είναι υπεύθυνη για τις φαρμακολογικές ιδιότητες του δότη. Γι' αυτό τον σκοπό ξεχωρίσαμε και μελετήσαμε μια σημαντική φαρμακολογική ιδιότητα των θειούχων αλάτων, που είναι πολύ χαρακτηριστική για τα λεία μυϊκά κύτταρα και αναλύεται εκτενώς στην βιβλιογραφία. Το H_2S αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και επάγει την απόπτωσή τους, όπως παρουσιάζεται και στο γενικό μέρος της εργασίας. Υπάρχουν πολλοί προτεινόμενοι μηχανισμοί. Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά εργασίες που αποδεικνύουν την συγκεκριμένη ιδιότητα, η οποία επιβεβαιώνεται στην εργασία μας, αφού παρατηρήσαμε μικρές μειώσεις στον πολλαπλασιασμό των A7r5 μετά την χορήγηση γρήγορου δότη. Μάλιστα η μείωση ήταν εξαρτώμενη από την δόση και εμφανίστηκε για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100μM δότη.

Ένα παράδειγμα μας δίνει παλαιότερη μελέτη σε λεία μυϊκά κύτταρα αορτής ανθρώπου, που έδειξε πως σε υψηλές συγκεντρώσεις του αερίου, επηρεάζεται η οδός των MAPK κινασών, αφού έχει παρατηρηθεί αυξημένη φωσφορυλίωση των ERK κινασών. Παράλληλα στην μελέτη εντοπίστηκε διέγερση του σχηματισμού κασπάσης-3, που οδήγησε σε απόπτωση τα λεία μυϊκά κύτταρα [86].

Μια δεύτερη αναφερόμενη μελέτη, ασχολήθηκε με την επίδραση του εξωγενώς χορηγούμενου H_2S σε αρουραίους, με χρήση S-Diclofenac. Κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η S-Diclofenac επάγει την απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων παρεμβαίνοντας στον κυτταρικό κύκλο, και μειώνοντας σημαντικά την φάση G1, μέσω ενεργοποίησης κάποιων κύκλινο-

εξαρτώμενων κινασών (CDKs), ενώ παράλληλα αύξησε την συγκέντρωση των πρωτεϊνικών μορίων p53, p21, p53AIP1 και Bax που αποτελούν σημαντικές προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες [87].

Πιο πρόσφατη μελέτη σε λεία μυϊκά κύτταρα πρότεινε ότι, το H₂S μειώνει την έκφραση ενός μορίου ρύθμισης του πολλαπλασιασμού, την Brg1 και την μετάφραση άλλων γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των Pcnα, Ntf3 και Pdgfa. Τα συγκεκριμένα γονίδια λαμβάνουν μέρος στον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων, μέσω της οδού Ras/Erk/MAPK, που ενεργοποιείται από την ενδοθηλίνη-1. Λαμβάνοντας υπόψη τα μέχρι τότε δεδομένα για την επίδραση του H₂S στο μονοπάτι των MAPK κινασών, κατέληξε στο συμπέρασμα, πως η αναστολή του πολλαπλασιασμού των VSMCs, συνδέεται με παρέμβαση εν μέρη σε επιγενετικούς μηχανισμούς και συγκεκριμένα στην αναστολή της πρωτεΐνης ρύθμισης Brg1 [88].

Επιπλέον είναι γνωστή η ικανότητα του εξωγενώς χορηγούμενου H₂S να επεμβαίνει στην ομοιόσταση του Ca²⁺ σε νευρώνες, ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και καρδιομυοκύτταρα. Σουλφυδρυλιώνει υπόλοιπα κυστεΐνης σε κάποιους από τους τύπους των διαπερατών διαύλων ασβεστίου και πυροδοτεί σειρά βιολογικών μεταβολών. Υπάρχουν δεδομένα που συσχετίζουν την ικανότητα του H₂S να επεμβαίνει στην ομοιόσταση του ασβεστίου με την αναστολή του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων [89]. Οι Wang et al έδειξαν ότι οι υποδοχείς CaSR (calcium-sensing receptors) που βρίσκονται στον παραθυροειδή αδένα και αντιλαμβάνονται μεταβολές στην συγκέντρωση των εξωκυττάρου ασβεστίου, ρυθμίζοντας την απελευθέρωση παραθορμόνης, παίζουν ρόλο στην διέγερση της ενδογενούς παραγωγής του H₂S. Η εργασία πραγματοποιήθηκε σε A7r5 και έδειξε ότι η χορήγηση αγωνιστή των CaSR προκάλεσε αύξηση στην έκφραση της CSE και ανέστειλε την ενεργοποίηση των ERK κινασών. Στην συγκεκριμένη μελέτη υπάρχει αντιστοιχία με τα αποτελέσματά μας. Με μέθοδο MTT έδειξαν πως το θειούχο άλας NaHS μείωσε τον πολλαπλασιασμό των A7r5 εξαρτώμενα από την δόση, με στατιστικά σημαντική μείωση σε συγκεντρώσεις 200μM, 300μM και 500μM [90].

Παράλληλα άλλη μελέτη υποστηρίζει ότι το H₂S επεμβαίνει στον πολλαπλασιασμό των A7r5, αλλά όχι μέσω των διαύλων ασβεστίου T-type και την ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου. Ομοίως και σε αυτή τη μελέτη ο αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε για την χορήγηση NaHS με MTT και φάνηκε μείωση του πολλαπλασιασμού στα 100μM δόση [91].

Στην συνέχεια ερευνήσαμε τι θα συμβεί αν μετά την χορήγηση δότη H₂S αναστείλουμε φαρμακολογικά κάποιο από τα ένζυμα παραγωγής του. Το ερώτημά μας ήταν αν θα μεταβληθεί η μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων που προκαλεί η αρχικά υψηλή συγκέντρωση H₂S μετά

από 48 ώρες; Αρχικά χρησιμοποιήσαμε τον αναστολέα του ενζύμου CSE, PAG ο οποίος δεν επηρέασε τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, αλλά και σε συγχορήγηση με τον δότη δεν μετέβαλλε την μείωση του πολλαπλασιασμού που προκαλεί ο δότης μόνος του. Στην συνέχεια χρησιμοποιήσαμε τον ΑΟΑΑ με την λογική της ταυτόχρονης αναστολής της CBS και της CSE. Και σε αυτό το πείραμα δεν εντοπίσαμε μεταβολή στον πολλαπλασιασμό μετά την συγχορήγηση, σε σχέση με την επίδραση του δότη ή του αναστολέα όταν χορηγούνται μόνοι τους. Εν κατακλείδι από αυτή την σειρά πειραμάτων φαίνεται πως η ικανότητα του δότη Na_2S να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των A7r5 στα $100\mu\text{M}$, δεν προκύπτει από την ιδιότητα του να αυξάνει την έκφραση των ενζύμων παραγωγής του H_2S .

Επιπρόσθετα παρατηρώντας την φαρμακολογική συμπεριφορά των αναστολέων, πρέπει να αναφερθεί ότι το γεγονός πως η PAG δεν προκάλεσε αλλαγές στον πολλαπλασιασμό των A7r5 δεν μπορεί να ερμηνευτεί υποθέτοντας ότι η CSE γενικά δεν παίζει ρόλο στον πολλαπλασιασμό. Πιθανόν σχετίζεται με τον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, αλλά και τον συγκεκριμένο αναστολέα στην δόση που χρησιμοποιήθηκε. Βιβλιογραφικά έχει παρατηρηθεί παλαιότερα ότι η υπερέκφραση της CSE ανταγωνίζεται τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης της ERK και της αυξορύθμισης του αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών $p21^{\text{cip/WAK-1}}$ [92]. Επιπλέον η μεγάλη μείωση του πολλαπλασιασμού που παρατηρείται σε υψηλές δόσεις ΑΟΑΑ ($800\mu\text{M}$ και 1mM) πιθανόν υποδηλώνει ότι σε αυτές τις συγκεντρώσεις και στα συγκεκριμένα κύτταρα ο ΑΟΑΑ αναστέλλει και άλλες βιοχημικές οδούς, εκτός της ισχυρής αναστολής των ενζύμων του H_2S . Έχει προαναφερθεί ότι ο αναστολέας δεν παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση και μπορεί να αναστείλει μεγάλο αριθμό ενζύμων που εξαρτώνται από την PLP [70]

Πληροφορίες για την δράση των συγκεκριμένων αναστολέων συλλέχθηκαν από πρόσφατα δημοσιευμένο άρθρο για την επίδραση των αναστολέων στον πολλαπλασιασμό. Το άρθρο αναφέρεται σε καρκινικά κύτταρα [93]. Για την αναστολή της προκαλούμενης από CSB και CSE παραγωγής H_2S , τα κύτταρα HCT116 υποβλήθηκαν σε αγωγή με το μεικτό αναστολέα CBS/ CSE (ΑΟΑΑ). Το ΑΟΑΑ άσκησε μία εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HCT116 στις υψηλότερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (100 και $300\mu\text{M}$), αλλά ελαφρά αυξημένο πολλαπλασιασμό στη χαμηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε ($30\mu\text{M}$). Το PAG χρησιμοποιήθηκε λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας για το CSE απέτυχε όμως να επηρεάσει τον πολλαπλασιασμό των HCT116. Στο συγκεκριμένο πείραμα δεν έχουν κάνει συγχορήγηση αναστολέα και δότη. Άρα φαίνεται ότι σε καρκινικά κύτταρα η αναστολή κάποιων ενζύμων με υψηλές συγκεντρώσεις αναστολέα προκαλεί μείωση στον πολλαπλασιασμό και η χορήγηση εξωγενώς H_2S , προκαλεί επίσης μείωση του πολλαπλασιασμού, ενώ μικρή αύξηση στην

έκφραση των ενζύμων ευνοεί τον πολλαπλασιασμό. Ομοίως με το παραπάνω άρθρο εντοπίσαμε ότι ο PAG δεν επηρέασε τον πολλαπλασιασμό των A7r5, ενώ ο AOA τον ανέστειλε σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις.

Τέλος παράλληλα με τα παραπάνω ασχοληθήκαμε με την αλληλεπίδραση των δύο αερίων H₂S και NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ώστε να ερευνήσουμε αν η ενδογενής παραγωγή NO επηρεάζει την ενδογενή παραγωγή H₂S. Βρέθηκε ότι η φαρμακολογική αναστολή της eNOS με το L-NAME αύξησε την έκφραση της CSE, ενώ δεν επηρέασε την έκφραση των άλλων δύο ενζύμων.

Πληθώρα άρθρων αναφέρεται στο συγκεκριμένο ζήτημα, ενώ υπάρχει σημαντική απόκλιση και αντιφατικότητα μεταξύ των αποτελεσμάτων [23]. Κατ' αρχάς ήδη έχει προαναφερθεί η ικανότητα του H₂S στο αγγειακό ενδοθήλιο να διεγείρει την παραγωγή NO, λόγω αύξησης της φωσφορυλίωσης και της S-σουλφονυλίωσης της eNOS και του διμερισμού της [36]. Επίσης έχει αναφερθεί η ικανότητα των θειούχων αλάτων συγκριτικά με τους αργούς οργανικούς δότες H₂S να διεγείρουν την φωσφορυλίωση και την έκφραση της eNOS. Άλλες μελέτες έχουν δείξει διαφορετικά αποτελέσματα. Σε HUVEC η χορήγηση 100μM NaHS προκάλεσε αυξημένη φωσφορυλίωση της eNOS στα 30 λεπτά και αύξηση στην παραγωγή NO, όμως αύξησε ελάχιστα τη έκφραση του ενζύμου στις 36 ώρες, χωρίς το αποτέλεσμα να είναι στατιστικά σημαντικό [94]. Σε άλλο άρθρο, δότες H₂S μείωσαν σε απομονωμένες αρτηρίες αρουραίων και σε HUVECs, την έκφραση και φωσφορυλίωση της eNOS στην Ser1177, την πρόσληψη L-αργινίνης, και άρα την σύνθεση του NO [95]. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι η ομάδα των Kloesch et al μετά από χορήγηση NaHS και GYY4137 σε ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής γουρουνιού υποστηρίζει πως δεν υπάρχει άμεση επίδραση της εξωγενούς χορήγησης H₂S στην έκφραση και την ενεργοποίηση της eNOS. Εντόπισε πως το εξωγενές H₂S ανταγωνίζεται την παραγωγή NO μόνο μέσω των αποθηκών Ca²⁺ [96].

Από την άλλη και το NO μπορεί να αναστείλει την ενεργοποίηση της CSE, επάγοντας την νιτροζυλίωση του ενζύμου [19]. Ακόμα το NO, ίσως αυξάνει την πρόσληψη κυστεΐνης από το κύτταρο, αυξάνοντας εμμέσως την παραγωγή H₂S [97]. Επιπλέον σε διαγονιδιακά ζώα (ποντίκια) με έλλειψη CSE παρατηρήθηκε αυξημένο οξειδωτικό stress, που συνοδεύτηκε από μειωμένη έκφραση της eNOS και χαμηλά επίπεδα NO. Στα συγκεκριμένα ζώα επιδεινώθηκε η βλάβη από ισχαιμία /επαναιμάτωση σε μυοκάρδιο και ήπαρ, που όμως διορθώθηκε με χορήγηση NaHS [98]. Αντιθέτως στα αποτελέσματά μας φαίνεται πως η ελάττωση της παραγωγής του ενός αερίου διαβιβαστή προκαλεί αύξηση της παραγωγής του άλλου. Γνωρίζουμε ότι τα δύο αέρια αλληλεπιδρούν μέσω κοινών σηματοδοτικών μονοπατιών για την ρύθμιση βιολογικών λειτουργιών όπως η αγγειογένεση, ο πολλαπλασιασμός και η αρτηριακή πίεση. Πιθανόν το αποτέλεσμά μας να υποδηλώνει μια τάση

“αντιρρόπησής” ώστε να διατηρείται η φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου. Ένα παράδειγμα προσφέρει μελέτη για την έκφραση των ενζύμων παραγωγής των τριών αέριων διαμμβιαστών σε καρωτιδικές πλάκες. Παρατηρείται πως σε σταθεροποιημένες πλάκες ασθενών που λαμβάνουν στατίνες, υπάρχει υψηλή έκφραση της eNOS και αντίστοιχα μειωμένη έκφραση της CSE και της CBS, συγκριτικά με τους ασθενείς με ασταθείς καρωτιδικές πλάκες, όπου οι αναλογίες των ενζύμων είναι αντίστροφες, δηλαδή η CSE και η CBS υπερεκφράζονται, και υπάρχει έλλειψη της eNOS [41].

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προσφέρουν νέα στοιχεία σχετικά με την φαρμακολογία των γρήγορων δοτών H₂S. Αποδείξαμε ότι η χορήγηση θειούχων αλάτων προκαλεί αύξηση στην έκφραση των CBS, CSE και 3-MST, δηλαδή διεγείρει την ενδογενή παραγωγή H₂S σε υγρή ενδοθηλιακά και σε λεία μυϊκά κύτταρα στις 48 ώρες μετά την χορήγηση. Επιπλέον δείξαμε ότι η χορήγηση θειούχου άλατος σε υγιείς μύες προκαλεί αύξηση στην έκφραση της CSE σε καρδιά, πνεύμονες και νεφρό 24 ώρες μετά την χορήγηση. Άρα η αύξηση των επιπέδων του H₂S μετά από ταχεία εξωγενή χορήγηση, προκαλεί μια αύξηση στην ενδογενή παραγωγή H₂S που διατηρεί τα επίπεδα του αέριου διαμμβιαστή αυξημένα και μετά την απομάκρυνση του δότη.

Επιπρόσθετα μελετήσαμε την ικανότητα του Na₂S να παρεμβαίνει στον πολλαπλασιασμό των A7r5. Δείξαμε ότι το Na₂S αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Όμως η ικανότητα του δότη να μειώνει τον πολλαπλασιασμό των A7r5 δεν συνδέεται με την προκαλούμενη αύξηση της έκφρασης της CBS και της CSE. Η διέγερση της ενδογενούς παραγωγής, που εκφράζεται με αύξηση στην έκφραση των τριών ενζύμων μετά από χορήγηση δότη Na₂S, που διαπιστώσαμε με τις WB στα λεία μυϊκά κύτταρα, δεν αποτελεί παράγοντα που σχετίζεται με τις βιολογικές λειτουργίες του δότη, τουλάχιστον ως αναφορά τον πολλαπλασιασμό. Άρα το Na₂S επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό με άλλους μηχανισμούς επεμβαίνοντας στον κυτταρικό κύκλο και στα αποπτωτικά μονοπάτια, όπως παρουσιάζεται εκτενώς στην βιβλιογραφία.

Τέλος προσδιορίσαμε την αλληλεπίδραση NO και H₂S στα ενδοθηλιακά κύτταρα bEnd.3. Δείξαμε ότι η φαρμακολογική αναστολή της eNOS προκαλεί αύξηση στην έκφραση της CSE. Άρα η ελάττωση των επιπέδων του ενδογενούς NO προκαλεί αύξηση στην έκφραση της CSE στον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, ομοίως με την εξωγενή χορήγηση του H₂S.

6. Βιβλιογραφία

1. Marshall T, Dorman D, Gardner D, Adeshina F: **Provisional Advisory Levels (PALs) for hydrogen sulfide (H₂S)**. *Inhalation toxicology* 2009, **21** Suppl 3:56-72.
2. Szabo C: **Gaseotransmitters:New Frontiers for Translational Science**. *Sci Transl Med* 2010, **2**(59ps54).
3. Abe K, Kimura H: **The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator**. *The journal of Neuroscience* 1996, **16**:1066-1071.
4. Papapetropoulos A, Whiteman M, Cirino G: **Pharmacological tools for hydrogen sulphide research: a brief, introductory guide for beginners**. *British Journal of Pharmacology* 2015, **172**(6):1633–1637.
5. Whiteman M, Le Trionnaire S, Chopra M, Fox B, Whatmore J: **Emerging role of hydrogen sulfide in health and disease: critical appraisal of biomarkers and pharmacological tools**. *Clinical science* 2011, **121**(11):459-488.
6. Szabo C, Papapetropoulos A: **International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H₂S Levels: H₂S Donors and H₂S Biosynthesis Inhibitors**. *Pharmacological reviews* 2017, **69**(4):497-564.
7. Singh S, Banerjee R: **PLP-dependent H(2)S biogenesis**. *Biochimica et biophysica acta* 2011, **1814**(11):1518-1527.
8. Kabil O, Banerjee R: **Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling**. *Antioxid Redox Signal* 2014, **20**(5):770-782.
9. Shibuya N, Kimura H: **Production of hydrogen sulfide from d-cysteine and its therapeutic potential**. *Frontiers in endocrinology* 2013, **4**:87.
10. Ereno-Orbea J, Majtan T, Oyenarte I, Kraus JP, Martinez-Cruz LA: **Structural insight into the molecular mechanism of allosteric activation of human cystathionine beta-synthase by S-adenosylmethionine**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014, **111**(37):E3845-3852.
11. Dziegielewska M, Holtze S, Vole C, Wachter U, Menzel U, Morhart M, Groth M, Szafranski K, Sahm A, Sponholz C *et al*: **Low sulfide levels and a high degree of cystathionine beta-synthase (CBS) activation by S-adenosylmethionine (SAM) in the long-lived naked mole-rat**. *Redox biology* 2016, **8**:192-198.
12. Sun Q, Collins R, Huang S, Holmberg-Schiavone L, Anand GS, Tan CH, van-den-Berg S, Deng LW, Moore PK, Karlberg T *et al*: **Structural basis for the inhibition mechanism of human cystathionine gamma-lyase, an enzyme responsible for the production of H(2)S**. *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**(5):3076-3085.
13. Nagahara N, Yoshii T, Abe Y, Matsumura T: **Thioredoxin-dependent enzymatic activation of mercaptopyruvate sulfurtransferase. An intersubunit disulfide bond serves as a redox switch for activation**. *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(3):1561-1569.
14. Karlberg T, Collins R, Arrowsmith CH, Berglund H, Bountra C, Edwards AM, Flodin S, Flores A, Graslund S, Hammarstrom M *et al*: **Human 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase**. Structural Genomics Consortium. 2010

15. Kimura H: **Signaling molecules: hydrogen sulfide and polysulfide.** *Antioxid Redox Signal* 2015, **22**(5):362-376.
16. Kolluru GK, Shen X, Bir SC, Kevil CG: **Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection.** *Nitric oxide : biology and chemistry* 2013, **35**:5-20.
17. Sen N: **Functional and Molecular Insights of Hydrogen Sulfide Signaling and Protein Sulfhydration.** *Journal of molecular biology* 2017, **429**(4):543-561.
18. Iciek M, Kowalczyk-Pachel D, Bilaska-Wilkosz A, Kwiecien I, Gorny M, Wlodek L: **S-sulfhydration as a cellular redox regulation.** *Bioscience reports* 2015, **36**(2).
19. Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, Steppan J, Jung SM, Bhunia AK, Barodka VM, Gazi FK, Barrow RK, Wang R *et al*: **Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels.** *Circulation research* 2011, **109**(11):1259-1268.
20. Fitzgerald R, DeSantiago B, Lee DY, Yang G, Kim JY, Foster DB, Chan-Li Y, Horton MR, Panettieri RA, Wang R *et al*: **H₂S relaxes isolated human airway smooth muscle cells via the sarcolemmal K(ATP) channel.** *Biochemical and biophysical research communications* 2014, **446**(1):393-398.
21. Kanagy N, Szabo C, Papapetropoulos A: **Vascular biology of hydrogen sulfide.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2017, **312**:C537-C549.
22. Qiao W, Chaoshu T, Hongfang J, Junbao D: **Endogenous hydrogen sulfide is involved in the pathogenesis of atherosclerosis.** *Biochemical and biophysical research communications* 2010, **396**(2):182-186.
23. Wang R, Szabo C, Ichinose F, Ahmed A, Whiteman M, Papapetropoulos A: **The role of H₂S bioavailability in endothelial dysfunction.** *Trends in pharmacological sciences* 2015, **36**(9):568-578.
24. Huang S, Li H, Ge J: **A cardioprotective insight of the cystathionine gamma-lyase/hydrogen sulfide pathway.** *International journal of cardiology Heart & vasculature* 2015, **7**:51-57.
25. Szabó C, Papapetropoulos A: **Hydrogen sulphide and angiogenesis: mechanisms and applications.** *British Journal of Pharmacology* 2011, **164**(3).
26. Tao B.B, Liu S.Y, Zhang C.C, Fu W CWJ, Wang Y, Shen Q, Wang M.J, Chen Y, Zhu Y, Y.C. Z: **VEGFR2 functions as an H₂S-targeting receptor protein kinase with its novel Cys1045- Cys1024 disulfide bond serving as a specific molecular switch for hydrogen sulfide actions in vascular endothelial cells.** *Antioxidants & Redox Signaling* 2013, **19**:448–464.
27. Chao C, Zatarain JR, Ding Y, Coletta C, Mrazek AA, Druzhyina N, Johnson P, Chen H, Hellmich JL, Asimakopoulou A *et al*: **Cystathionine-beta-synthase inhibition for colon cancer: Enhancement of the efficacy of aminooxyacetic acid via the prodrug approach.** *Molecular medicine* 2016, **22**.
28. Papapetropoulos A, Pyriochou A, Altaany Z, Yang G, Marazioti A, Zhou Z, Jeschke MG, Branski LK, Herndon DN, Wang R *et al*: **Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(51):21972-21977.

29. Laggner H, Muellner MK, Schreier S, Sturm B, Hermann M, Exner M, Gmeiner BM, Kapiotis S: **Hydrogen sulphide: a novel physiological inhibitor of LDL atherogenic modification by HOCl.** *Free radical research* 2007, **41**(7):741-747.
30. Koike S, Nishimoto S, Ogasawara Y: **Cysteine persulfides and polysulfides produced by exchange reactions with H₂S protect SH-SY5Y cells from methylglyoxal-induced toxicity through Nrf2 activation.** *Redox biology* 2017, **12**:530-539.
31. DeLeon E, Gao Y, Huang E, Olson K: **Garlic oil polysulfides: H₂S- and O₂-independent prooxidants in buffer and antioxidants in cells.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2016, **310**:R1212–R1225.
32. Aghagolzadeh P, Radpour R, Bachtler M, van Goor H, Smith ER, Lister A, Odermatt A, Feelisch M, Pasch A: **Hydrogen sulfide attenuates calcification of vascular smooth muscle cells via KEAP1/NRF2/NQO1 activation.** *Atherosclerosis* 2017, **265**:78-86.
33. Ma Q: **Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity.** *Annual review of pharmacology and toxicology* 2013, **53**:401-426.
34. Szabo C: **Gasotransmitters in cancer: from pathophysiology to experimental therapy.** *Nature reviews Drug discovery* 2016, **15**(3):185-203.
35. Andreadou I, Iliodromitis E, Rassaf T, Schulz R, Papapetropoulos A, Ferdinandy P: **The role of gasotransmitters NO, H₂S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning.** *British Journal of Pharmacology* 2015, **172**:1587–1606
36. Szabo C: **Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2017, **312**:C3–C15.
37. Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu SH, Siau JL, Bhatia M, Moore PK: **Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide.** *Biochemical and biophysical research communications* 2006, **343**(1):303-310.
38. Altaany Z, Ju Y, Yang G, Wang R: **The coordination of S-sulfhydration, S-nitrosylation, and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide.** *Sci Signal* 2014, **7**(342):ra87.
39. Andreadou I, Iliodromitis EK, Szabo C, Papapetropoulos A: **Hydrogen sulfide and PKG in ischemia-reperfusion injury: sources, signaling, accelerators and brakes.** *Basic research in cardiology* 2015, **110**(5):510.
40. You J, Shi X, Liang H, Ye J, Wang L, Han H, Fang H, Kang W, Wang T: **Cystathionine- γ -lyase promotes process of breast cancer in association with STAT3 signaling pathway.** *Oncotarget* 2017, **8**:65677-65686.
41. Sigala F, Efentakis P, Karageorgiadi D, Filis K, Zampas P, Iliodromitis EK, Zografos G, Papapetropoulos A, Andreadou I: **Reciprocal regulation of eNOS, H₂S and CO-synthesizing enzymes in human atheroma: Correlation with plaque stability and effects of simvastatin.** *Redox biology* 2017, **12**:70-81.
42. Szabo C: **Hydrogen sulphide and its therapeutic potential.** *Nature reviews Drug discovery* 2007, **6**(11):917-935.
43. Bouillaud F, Blachier F: **Mitochondria and Sulfide: A Very Old Story of Poisoning, Feeding, and Signaling?** *Antioxid Redox Signal* 2011, **15**:379-391.

44. Ji K, Xue L, Cheng J, Bai Y: **Preconditioning of H₂S inhalation protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by induction of HSP70 through PI3K/Akt/Nrf2 pathway.** *Brain research bulletin* 2016, **121**:68-74.
45. Sun X, Wang W, Dai J, Jin S, Huang J, Guo C, Wang C, Pang L, Wang Y: **A Long-Term and Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury.** *Scientific reports* 2017, **7**(1):3541.
46. Bibli SI, Yang G, Zhou Z, Wang R, Topouzis S, Papapetropoulos A: **Role of cGMP in hydrogen sulfide signaling.** *Nitric oxide : biology and chemistry* 2015, **46**:7-13.
47. Chatzianastasiou A, Bibli SI, Andreadou I, Efentakis P, Kaludercic N, Wood ME, Whiteman M, Di Lisa F, Daiber A, Manolopoulos VG *et al*: **Cardioprotection by H₂S Donors: Nitric Oxide-Dependent and Independent Mechanisms.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2016, **358**(3):431-440.
48. Stubbert D, Prysyazhna O, Rudyk O, Scotcher J, Burgoyne JR, Eaton P: **Protein kinase G Ialpha oxidation paradoxically underlies blood pressure lowering by the reductant hydrogen sulfide.** *Hypertension* 2014, **64**(6):1344-1351.
49. Benavides GA, Squadrito GL, Mills RW, Patel HD, Isbell TS, Patel RP, Darley-Usmar VM, Doeller JE, Kraus DW: **Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(46):17977-17982.
50. Liang D, Wu H, Wong MW, Huang D: **Diallyl Trisulfide Is a Fast H₂S Donor, but Diallyl Disulfide Is a Slow One: The Reaction Pathways and Intermediates of Glutathione with Polysulfides.** *Organic letters* 2015, **17**(17):4196-4199.
51. Rose P, Dymock BW, Moore PK: **GY4137, a novel water-soluble, H₂S-releasing molecule.** *Methods in enzymology* 2015, **554**:143-167.
52. Li L, Whiteman M, Guan YY, Neo KL, Cheng Y, Lee SW, Zhao Y, Baskar R, Tan CH, Moore PK: **Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide.** *Circulation* 2008, **117**(18):2351-2360.
53. Lilyanna S, Peh MT, Liew OW, Wang P, Moore PK, Richards AM, Martinez EC: **GY4137 attenuates remodeling, preserves cardiac function and modulates the natriuretic peptide response to ischemia.** *Journal of molecular and cellular cardiology* 2015, **87**:27-37.
54. Lu S, Gao Y, Huang X, Wang X: **GY4137, a hydrogen sulfide (H₂S) donor, shows potent anti-hepatocellular carcinoma activity through blocking the STAT3 pathway.** *International journal of oncology* 2014, **44**(4):1259-1267.
55. Chitnis MK, Njie-Mbye YF, Opere CA, Wood ME, Whiteman M, Ohia SE: **Pharmacological actions of the slow release hydrogen sulfide donor GY4137 on phenylephrine-induced tone in isolated bovine ciliary artery.** *Experimental eye research* 2013, **116**:350-354.
56. Zhou Z, von Wantoch Rekowski M, Coletta C, Szabo C, Bucci M, Cirino G, Topouzis S, Papapetropoulos A, Giannis A: **Thioglycine and L-thiovaline: biologically active H₂S-donors.** *Bioorganic & medicinal chemistry* 2012, **20**(8):2675-2678.

57. Whiteman M, Perry A, Zhou Z, Bucci M, Papapetropoulos A, Cirino G, Wood M: **Phosphinodithioate and Phosphoramidodithioate Hydrogen Sulfide Donors.** *Handb Exp Pharmacol* 2015, **230**:337-363.
58. Huang CW, Feng W, Peh MT, Peh K, Dymock BW, Moore PK: **A novel slow-releasing hydrogen sulfide donor, FW1256, exerts anti-inflammatory effects in mouse macrophages and in vivo.** *Pharmacological research* 2016, **113**(Pt A):533-546.
59. Montoya LA, Pluth MD: **Organelle-Targeted H₂S Probes Enable Visualization of the Subcellular Distribution of H₂S Donors.** *Analytical chemistry* 2016, **88**(11):5769-5774.
60. Szczesny B, Modis K, Yanagi K, Coletta C, Le Trionnaire S, Perry A, Wood ME, Whiteman M, Szabo C: **AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro.** *Nitric oxide : biology and chemistry* 2014, **41**:120-130.
61. Wu D, Hu Q, Xiong Y, Zhu D, Mao Y, Zhu YZ: **Novel H₂S-NO hybrid molecule (ZYZ-803) promoted synergistic effects against heart failure.** *Redox biology* 2018, **15**:243-252.
62. Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G: **Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346).** *Br J Pharmacol* 2010, **159**(6):1236-1246.
63. Wallace JL: **Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs.** *Trends in pharmacological sciences* 2007, **28**(10):501-505.
64. Shukla N, Rossoni G, Hotston M, Sparatore A, Del Soldato P, Tazzari V, Persad R, Angelini GD, Jeremy JY: **Effect of hydrogen sulphide-donating sildenafil (ACS6) on erectile function and oxidative stress in rabbit isolated corpus cavernosum and in hypertensive rats.** *BJU international* 2009, **103**(11):1522-1529.
65. Huang J, Khan S, O'Brien P: **The glutathione dependence of inorganic sulfate formation from L-or D-cysteine in isolated rathepatocytes.** *Chemico-Biological Interactions* 1998, **110**:189-202.
66. Asimakopoulou A, Panopoulos P, Chasapis CT, Coletta C, Zhou Z, Cirino G, Giannis A, Szabo C, Spyroulias GA, Papapetropoulos A: **Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine beta synthase (CBS) and cystathionine gamma lyase (CSE).** *Br J Pharmacol* 2013, **169**(4):922-932.
67. Flannigan K, Ferraz JP, Wang R, Wallace G: **Enhanced Synthesis and Diminished Degradation of Hydrogen Sulfide in Experimental Colitis: A Site-Specific, Pro-Resolution Mechanism.** *PLoS One* 2013, **8**(7):e71962.
68. Dever JT, Elfarra AA: **L-methionine-dl-sulfoxide metabolism and toxicity in freshly isolated mouse hepatocytes: gender differences and inhibition with aminooxyacetic acid.** *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2008, **36**(11):2252-2260.
69. Sherry AD, Zhao P, Wiethoff AJ, Jeffrey FMH, Mallow CR: **Effects of aminooxyacetate on glutamate compartmentation and TCA cycle kinetics in rat hearts.** *American Physiological Society* 1998, **274**:H591-H599.
70. Módis K, Bos EM, Coletta C, Radermacher P, Calzia E, Papapetropoulos A, Bouillaud F, Goor H, Hellmich MR, Szabo C: **Regulation of mitochondrial bioenergetic function by**

hydrogen sulfide. Part II. Pathophysiological and therapeutic aspects. *British Journal of Pharmacology* 2014, **171**:2123-2146.

71. Zhou Y, Yu J, Lei X, Wu J, Niu Q, Zhang Y, Liu H, Christen P, Gehring H, Wu F: **High-throughput tandem-microwell assay identifies inhibitors of the hydrogen sulfide signaling pathway.** *Chemical communications* 2013, **49**(100):11782-11784.
72. Thorson MK, Majtan T, Kraus JP, Barrios AM: **Identification of cystathionine beta-synthase inhibitors using a hydrogen sulfide selective probe.** *Angewandte Chemie* 2013, **52**(17):4641-4644.
73. Druzhyzna N, Szczesny B, Olah G, Modis K, Asimakopoulou A, Pavlidou A, Szoleczky P, Gero D, Yanagi K, Toro G *et al*: **Screening of a composite library of clinically used drugs and well-characterized pharmacological compounds for cystathionine beta-synthase inhibition identifies benserazide as a drug potentially suitable for repurposing for the experimental therapy of colon cancer.** *Pharmacological research* 2016, **113**(Pt A):18-37.
74. Hanaoka K, Sasakura K, Suwanai Y, Toma-Fukai S, Shimamoto K, Takano Y, Shibuya N, Terai T, Komatsu T, Ueno T *et al*: **Discovery and Mechanistic Characterization of Selective Inhibitors of H₂S-producing Enzyme: 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST) Targeting Active-site Cysteine Persulfide.** *Scientific reports* 2017, **7**:40227.
75. Mosmann T: **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.** *Journal of Immunological Methods* 1983, **65**:55-63.
76. Stockert JC, Blazquez-Castro A, Canete M, Horobin RW, Villanueva A: **MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets.** *Acta histochemica* 2012, **114**(8):785-796.
77. Lu L, Zhang L, Wai MS, Yew DT, Xu J: **Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury.** *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2012, **26**(4):636-644.
78. Liu ZQ, Mahmood T, Yang PC: **Western blot: technique, theory and trouble shooting.** *North American journal of medical sciences* 2014, **6**(3):160.
79. Hua-Huy T, Duong-Quy S, Pham H, Pansiot J, Mercier JC, Baud O, Dinh-Xuan AT: **Inhaled nitric oxide decreases pulmonary endothelial nitric oxide synthase expression and activity in normal newborn rat lungs.** *ERJ open research* 2016, **2**(1).
80. Sheehy AM, Burson AM, Black MS: **Nitric oxide exposure inhibits endothelial NOS activity but not gene expression: a role for superoxide.** *American Physiological Society* 1998:L833-L841.
81. Chuah S, Moore PK, Zhu YZ: **S-allylcysteine mediates cardioprotection in an acute myocardial infarction rat model via a hydrogen sulfide-mediated pathway.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, **293**:H2693-H2701.
82. Chen LY, Chen Q, Zhu XJ, Kong DS, Wu L, Shao JJ, Zheng SZ: **Diallyl trisulfide protects against ethanol-induced oxidative stress and apoptosis via a hydrogen sulfide-mediated mechanism.** *International immunopharmacology* 2016, **36**:23-30.
83. Tsai CY, Wen SY, Shibu MA, Yang YC, Peng H, Wang B, Wei YM, Chang HY, Lee CY, Huang CY *et al*: **Diallyl trisulfide protects against high glucose-induced cardiac**

- apoptosis by stimulating the production of cystathionine gamma-lyase-derived hydrogen sulfide.** *International journal of cardiology* 2015, **195**:300-310.
84. Iciek M, Bilaska-Wilkosz A, Gorny M, Sokolowska-Jezewicz M, Kowalczyk-Pachel D: **The Effects of Different Garlic-Derived Allyl Sulfides on Anaerobic Sulfur Metabolism in the Mouse Kidney.** *Antioxidants* 2016, **5**(4).
 85. Meng G, Xiao Y, Ma Y, Tang X, Xie L, Liu J, Gu Y, Yu Y, Park CM, Xian M *et al*: **Hydrogen Sulfide Regulates Kruppel-Like Factor 5 Transcription Activity via Specificity Protein 1 S-Sulfhydration at Cys664 to Prevent Myocardial Hypertrophy.** *Journal of the American Heart Association* 2016, **5**(9).
 86. Yang G, Sun X, Wang R: **Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004, **18**(14):1782-1784.
 87. Baskar R, Sparatore A, Del Soldato P, Moore PK: **Effect of S-diclofenac, a novel hydrogen sulfide releasing derivative inhibit rat vascular smooth muscle cell proliferation.** *European journal of pharmacology* 2008, **594**(1-3):1-8.
 88. Li L, Liu D, Bu D, Chen S, Wu J, Tang C, Du J, Jin H: **Brg1-dependent epigenetic control of vascular smooth muscle cell proliferation by hydrogen sulfide.** *Biochimica et biophysica acta* 2013, **1833**(6):1347-1355.
 89. Munaron L, Avanzato D, Moccia F, Mancardi D: **Hydrogen sulfide as a regulator of calcium channels.** *Cell calcium* 2013, **53**(2):77-84.
 90. Wang Y, Wang X, Liang X, Wu J, Dong S, Li H, Jin M, Sun D, Zhang W, Zhong X: **Inhibition of hydrogen sulfide on the proliferation of vascular smooth muscle cells involved in the modulation of calcium sensing receptor in high homocysteine.** *Experimental cell research* 2016, **347**(1):184-191.
 91. Elies J, Johnson E, Boyle JP, Scragg JL, Peers C: **H₂S does not regulate proliferation via T-type Ca²⁺ channels.** *Biochemical and biophysical research communications* 2015, **461**(4):659-664.
 92. Yang G, Cao K, Wu L, Wang R: **Cystathionine gamma-lyase overexpression inhibits cell proliferation via a H₂S-dependent modulation of ERK1/2 phosphorylation and p21Cip/WAK-1.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(47):49199-49205.
 93. Olah G, Modis K, Toro G, Hellmich MR, Szczesny B, Szabo C: **Role of endogenous and exogenous nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulfide in HCT116 colon cancer cell proliferation.** *Biochemical pharmacology* 2018, **149**:186-204.
 94. Altaany Z, Yang G, Wang R: **Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells.** *Journal of cellular and molecular medicine* 2013, **17**(7):879-888.
 95. Geng B, Cui Y, Zhao J, Yu F, Zhu Y, Xu G, Zhang Z, Tang C, Du J: **Hydrogen sulfide downregulates the aortic L-arginine/nitric oxide pathway in rats.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007, **293**:R1608–R1618.
 96. Kloesch B, Steiner G, Mayer B, Schmidt K: **Hydrogen sulfide inhibits endothelial nitric oxide formation and receptor ligand-mediated Ca(2+) release in endothelial and smooth muscle cells.** *Pharmacological reports : PR* 2016, **68**(1):37-43.

97. Wang R: **Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?** *FASEB* 2002, **16**.
98. King AL, Polhemus D, Bhushan S, Otsuka H, Kondo K, Nicholson CK, Bradley JM, Islam KN, Calvert JW, Tao Y *et al*: **Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitricoxide dependent.** *PNAS* 2014, **111**:3182–3187.