



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Θέμα: Ο ρόλος του υδρόθειου ( $H_2S$ ) στην απόκριση των λείων μυϊκών  
κυττάρων των αεραγωγών στην υποξία.**

Νταρούτσου Ειρήνη  
Ιατρός

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Παρασκευά Ευφροσύνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα
- Χατζηευθυμίου Αποστολία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Φυσιολογία.

Λάρισα, Οκτώβριος 2016



**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCE**  
**FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN**  
**“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**MASTER THESIS**  
**The role of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in the response of airway smooth muscle**  
**cells in hypoxia.**

**Ntaroutsou Eirini**  
**MD**

Advisory Thesis Committee:

- Paraskeva Efrosyni, Associate Professor, Thesis Supervisor
- Hatziefthimiou Apostolia, Associate Professor
- Germanis Anastasios, Professor

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Physiology.

Larissa, October 2016

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος-Ευχαριστίες.....	6
Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
Συντομογραφίες.....	9
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	19
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	19
1.1. Δομή και λειτουργία αναπνευστικού συστήματος.....	19
1.2. Το αμυντικό σύστημα των πνευμόνων.....	20
1.3. Παθήσεις του αναπνευστικού.....	22
1.3.1. Άσθμα.....	22
1.3.2. Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια.....	23
1.3.3. Πνευμονική υπέρταση.....	26
1.4. Αναδιαμόρφωση αεραγωγών.....	26
1.5. Ο ρόλος των ΛΜΚ στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών.....	27
1.5.1. Φυσιολογική λειτουργία των ΛΜΚ και πλαστικότητα.....	29
1.5.2. Σύσπαση των ΛΜΚΑ.....	31
1.6. Υποξία και φλεγμονή στους αεραγωγούς.....	33
1.7. Η απόκριση των κυττάρων στην υποξία και η κλινική σημασία των HIFs.....	33
1.8. Οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIFs.....	35
1.9. Η ρύθμιση του HIF-1α.....	37
1.9.1. Η ρύθμιση του HIF-1α από το O <sub>2</sub> .....	37
1.9.2. Η ρύθμιση του HIF-1α ανεξάρτητη από το O <sub>2</sub> .....	38
1.10. Η ρύθμιση εισόδου του HIF-1α στον πυρήνα.....	39
1.11. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α.....	40
1.12. Η αλληλεπίδραση του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες.....	41
1.13. Η κλινική σημασία των HIFs.....	43
1.14. Το H <sub>2</sub> S ως αεροδιαβιβαστής.....	44
1.15. Ένζυμα παραγωγής και αναστολείς του H <sub>2</sub> S.....	45
1.16. Δότες H <sub>2</sub> S.....	50
1.17. Μοριακοί μηχανισμοί δράσης του H <sub>2</sub> S και παραδείγματα.....	50
1.18. Αλληλεπίδραση συστημάτων αεροδιαβιβαστών και ρύθμιση αυτών από το H <sub>2</sub> S.....	53
1.19. Δράσεις του H <sub>2</sub> S.....	57
1.19.1. Δράσεις του H <sub>2</sub> S σε συστήματα.....	58
1.19.2. H <sub>2</sub> S και ΛΜΚΑ.....	62
1.20. Διαγνωστική και θεραπευτική σημασία του H <sub>2</sub> S.....	64
1.21. H <sub>2</sub> S και υποξία.....	65
1.21.1. Επίδραση του HIF-1α στην παραγωγή και δράση του H <sub>2</sub> S.....	69
1.21.2. Επίδραση του H <sub>2</sub> S στα επίπεδα και τη δράση του HIF-1α.....	70
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	71
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	72
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	72
3.1. Καλλιέργεια ΛΜΚ.....	72
3.2. Έναρξη καλλιιεργειών.....	72
3.3. Κατεργασία των κυττάρων.....	72
3.4. Παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τα ΛΜΚ.....	73
3.5. Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης κυτταρικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Bradford.....	73
3.6. Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE.....	74
3.6.1. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	78
3.6.2. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting).....	79

3.7. Μελέτη ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό.....	81
3.8. Πειράματα μέτρησης της ανταποκρισιμότητας των ΛΜΚ στην ACh.....	83
3.9. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	84
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	85
4.1. Επίδραση εξωγενούς χορηγούμενου H <sub>2</sub> S στην επαγωγή του HIF-1α στα ΛΜΚΑ.....	85
4.1.1. Επίδραση του γρήγορου δότη του H <sub>2</sub> S, NaHS στην επαγωγή του HIF-1α στα ΛΜΚΑ... ..	85
4.1.2. Επίδραση του γρήγορου δότη του H <sub>2</sub> S, GYY4137 στην επαγωγή του HIF-1α στα ΛΜΚΑ. ....	89
4.2. Επίδραση της αναστολής της παραγωγής του ενδογενούς H <sub>2</sub> S στην επαγωγή του HIF-1α σε ΛΜΚΑ.....	92
4.3. Επίδραση του δότη GYY4137 στην απόκριση των ΛΜΚΑ σε ACh σε συνθήκες υποξίας.....	94
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	97
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	101

## Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας, του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών <<Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής>>. Σε αυτό το σημείο αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Πρωτίστως, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Παρασκευά Ευφροσύνη για τη βοήθεια που μου προσέφερε στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας και για την αгаστή συνεργασία. Επιμέρους, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την καθοδήγησή της, την υπομονή της και την ενθάρρυνσή της καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος αλλά και για την υπομονή της στη διόρθωση της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής μου: την καθηγήτρια του εργαστηρίου Φυσιολογίας κ. Χατζηευθυμίου για την αρωγή της στα μαθήματα και την αποδοχή της, καθώς και τον Διευθυντή του Μεταπτυχιακού προγράμματος Καθηγητή Ανοσολογίας κ. Α. Γερμενή, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στο ΜΠΣ <<Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής>>.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω τη μεταδιδάκτορα κ. Σταματίου Ροδόπη για την άψογη συνεργασία στα πειράματα των συσπάσεων, την υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Φυσιολογίας κ. Ελένη-Αναστασία Τριανταφύλλου για την εκμάθηση των πειραματικών τεχνικών και την υποστήριξή της, αλλά και όλους τους διδάσκοντες καθηγητές των μαθημάτων Βιοφυσική Μεμβρανών (Εργαστήριο Φυσιολογίας) και Κυτταρική ομοιοστασία και γονιδιακή έκφραση (Εργαστήριο Βιοχημείας) για τις γνώσεις τους.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας και Βιοχημείας για τη βοήθειά τους και την καλή συνεργασία όλη τη διάρκεια του χρόνου. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον κ. Μακαντάση για τη βοήθειά του σε τεχνικά θέματα αλλά και την κ. Νούτσου για τη γραμματειακή υποστήριξη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη συμπαράστασή τους καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ΛΜΚ είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση του τόνου των αεραγωγών και μπορούν να ρυθμίσουν τη μεταφορά του  $O_2$  και την ομοιοστασία. Αυτά τα κύτταρα έχουν πλαστικότητα στην απόκρισή τους σε εξωτερικά ερεθίσματα, δεν είναι τελικώς διαφοροποιημένα και αποτελούν έναν από τους βασικούς παίκτες στην αναδιαμόρφωση και τη φλεγμονή των αεραγωγών σε χρόνιες αναπνευστικές νόσους.

Είναι γνωστό ότι η φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε υποξία και αντίστροφα. Ο HIF-1 είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας που διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία. Παρουσία οξυγόνου η α υπομονάδα του HIF υδροξυλιώνεται από ειδικές προλυλ-υδροξυλάσες (PHDs) και αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα, ενώ στην υποξία οι PHDs αναστέλλονται και η πρωτεΐνη HIF-1α σταθεροποιείται. Εκτός από την υποξία, ο HIF επάγεται από αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, ορμόνες και άλλες ικές πρωτεΐνες, μέσω της ενεργοποίησης ενδοκυττάρων σηματοδοτικών οδών. Επιπρόσθετα, αναφέρθηκε ότι ο πιο πρόσφατα χαρακτηρισμένος αέριος διαβιβαστής μετά το NO και το CO, το  $H_2S$  μπορεί να ρυθμίσει τον HIF.

Στο παρελθόν το  $H_2S$  θεωρούνταν ως ένα επιβλαβές μόριο κυρίαρχο στην ατμόσφαιρα, όμως πλέον γνωρίζουμε ότι συντίθεται και ενδογενώς. Το ενδογενές  $H_2S$  συμμετέχει σε μία πληθώρα φυσιολογικών διεργασιών, όπως η ρύθμιση του αγγειακού τόνου και της αρτηριακής πίεσης, η νευροπροστασία και η αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Η κύρια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που επάγεται από το  $H_2S$  είναι η σουλφυδρίωση (η σουλφυδρυλίωση) και μέσω αυτής εμπλέκεται σε μια πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών.

Γι' αυτό το λόγο, μελετήσαμε τη δράση του  $H_2S$  στην απόκριση των ΛΜΚΑ στην υποξία, μιμούμενη με  $CoCl_2$ , χρησιμοποιώντας γρήγορο (NaHS) και αργό δότη (GYY4137) του  $H_2S$ , αλλά και τον αναστολέα του ενζύμου σύνθεσής του, της CSE (PPG). Τα πρώιμα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τόσο το ενδογενώς παραγόμενο, όσο και το εξωγενώς χορηγούμενο  $H_2S$  κατέχει μικρή επίδραση στην επαγωγή της πρωτεΐνης του HIF-1α. Επιπροσθέτως, διερευνήσαμε την επίδραση του εξωγενώς χορηγούμενου δότη του  $H_2S$  (GYY4137) στη συσπαστική απόκριση των ΛΜΚΑ, προκληθείσα από την ACh, σε συνθήκες υποξίας και αποδείχθηκε ότι το  $H_2S$  μείωσε ήπια την *in vitro* σύσπαση των ΛΜΚΑ σε υποξία.

Λέξεις κλειδιά: ΛΜΚΑ,  $H_2S$ , HIF-1, υποξία, σύσπαση

## Abstract

Airway Smooth muscle cells (ASM) are responsible for the conservation of the bronchiomotor tone of airways and can regulate O<sub>2</sub> delivery and homeostasis. These cells have plasticity in their response to external stimuli, since they are not finally differentiated cells and are one of the basic players in remodeling and infection of chronic airway diseases.

It is known that infection can lead to hypoxia and vice versa. HIF-1 $\alpha$  is a hetero-dimerized transcription factor, that has a master regulatory role in hypoxia. In the presence of oxygen, its  $\alpha$  subunit is hydroxylated by specific prolyl-hydroxylases (PHDs) and degraded in the proteasome, while in hypoxia PHDs are inhibited and HIF-1 $\alpha$  protein is stabilized. Except for hypoxia, HIF is induced by GFs, cytokines, hormones and other viral proteins, through the activation of intracellular signaling pathways. Additionally, it was reported that the most recently described gas transmitter after the NO and CO, the H<sub>2</sub>S can regulate HIF.

In the past, H<sub>2</sub>S was regarded as a noxious molecule predominantly present in the atmosphere, but now we know that it is also synthesized endogenously. The endogenous H<sub>2</sub>S participates in a variety of physiological processes, such as regulation of vascular tone and blood pressure, neuroprotection and antioxidant activity. The main post-translational modification induced by H<sub>2</sub>S is sulfhydration (or persulfidation) and thereby engages in a plethora of signaling pathways.

For this reason, we investigated the effect of H<sub>2</sub>S in ASMCs in response to the hypoxia mimetic CoCl<sub>2</sub>, using the fast (NaHS) and slow donor (GYY4137) of H<sub>2</sub>S and the inhibitor of its synthesis, the inhibitor of the enzyme CSE (PPG). Our early results suggest that both the endogenously produced and the exogenously administered H<sub>2</sub>S holds little effect on the induction of HIF-1 $\alpha$  protein. Moreover, we investigated the effect of the exogenously administered donor of H<sub>2</sub>S (GYY4137) on the contractile response of ASMCs, induced by ACh, under hypoxic conditions and it was proved that the H<sub>2</sub>S lowered gently the *in vitro* contraction of ASMCs in hypoxia.

Key words: ASMCs, H<sub>2</sub>S, HIF-1, hypoxia, contraction

## Συντομογραφίες

ΛΜΚ: Λεία Μυϊκά Κύτταρα

ΛΜΚΑ: Λεία Μυϊκά Κύτταρα Αεραγωγών

ΧΑΠ: χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια

ΣΔ: σακχαρώδης διαβήτης

ΣΔ II: σακχαρώδης διαβήτης τύπου II

Κ.Α.: καρδιακή ανεπάρκεια

ΚΝΣ: κεντρικό νευρικό σύστημα

ΑΕΕ: αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο

ΕΝΥ: εγκεφαλονωτιαίο υγρό

ΓΕΣ: γαστρεντερικό σύστημα

ΜΣΑΦ: μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη

ΜΦ: μακροφάγα

O<sub>2</sub> (oxygen): οξυγόνο

pO<sub>2</sub> (partial pressure of oxygen): μερική πίεση οξυγόνου

H<sub>2</sub>S (hydrogen sulfide): υδρόθειο

SMC (smooth muscle cells): λεία μυϊκά κύτταρα

ASMC (airway smooth muscle cells): λεία μυϊκά κύτταρα αεραγωγών

HIF (hypoxia inducible Factor): παράγοντας επαγόμενος από την υποξία

PHD (prolyl-hydroxylases): προλυλ-υδροξυλάσες

CO (carbon oxide): μονοξείδιο του άνθρακα

NO (nitrogen oxide): μονοξείδιο του αζώτου

NOS (NO synthase): συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου

iNOS (inducible NOS): επαγωγίμη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου

nNOS (neuronal NOS): νευρωνική συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου

eNOS (endothelial NOS): ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου

ACh (acetylcholine): ακετυλοχολίνη

Atr (atropine): ατροπίνη

CSE (cystathione-γ-lyase): λύαση της γ-κυσταθειονίνης

CBS (cystathione-β-synthase): συνθάση της β-κυσταθειονίνης

3-MST (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase): σουλφουρτρανσφεράση του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού

Th (T helper cells): Τα βοηθητικά κύτταρα

Ig (immunoglobulin): ανοσοσφαιρίνη

ECM (extracellular matrix): εξωκυττάρια μήτρα



IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ): ιντερφερόνη- $\gamma$

TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ): παράγοντας νέκρωσης όγκων- $\alpha$

RANTES/CCL5 : regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted

CAMs (cell adhesion molecules): μόρια προσκόλλησης

RSV (respiratory syncytial virus): αναπνευστικός συγκυτιακός ιός

VEGF (vascular endothelial growth factor): αυξητικός παράγοντας αγγειακού ενδοθηλίου

ERK : extracellular signal-regulated kinases

ALI (acute lung injury): οξεία πνευμονική βλάβη

VILI (ventilator-induced lung injury): βλάβη πνεύμονα σχετιζόμενη με αναπνευστήρα

bHLH-PAS : basic Helix-Loop-Helix – Per-ARNT-Sim

HRE (hypoxia response elements): στοιχεία απόκρισης στην υποξία

TAD (transactivation domain): περιοχή τρανς-ενεργοποίησης

CBP : CREB-binding protein

Ref-1/APE1 (apurinic endonuclease): απουρινική ενδονουκλεάση

ODD (oxygen-dependent-degradation-domain): επικράτεια αποδόμησης εξαρτώμενη από το οξυγόνο

ARNT : Aryl hydrocarbon Nuclear Translocator

AHR : Aryl Hydrocarbon Receptor

OCT-4/POU5F1 (octamer-binding transcription factor-4): μεταγραφικός παράγοντας-4 προσδεδεμένος σε οκταμερές

IPAS (inhibitory PAS domain protein): ανασταλτική πρωτεΐνη PAS περιοχής

pVHL : protein von Hippel-Lindau

FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1): ανασταλτικός παράγοντας HIF-1

DMOG (dimethylglyoxalylglycine): διμεθυλ-οξαλ-γλυκίνη

DFX (desferioxamine): Δεσφεριοξαμίνη

NLS (nuclear localization signal): σήμα πυρηνικού εντοπισμού

ARD1: Arrest Defective-1 protein

CRM1/exportin 1 (chromosome region maintenance 1): εξπορτίνη 1

GSK-3 (glycogen synthase kinase-3): κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου-3

SUMO : small ubiquitin-like modifier

MBP (major basic protein): μείζονα βασική πρωτεΐνη

ECP (eosinophil cationic protein): κατιονική πρωτεΐνη ηωσινόφιλων

NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B): πυρηνικός παράγοντας  $\kappa$ B

FEV<sub>1</sub> (forced expiratory volume 1): βίαια εκπνεόμενος όγκος 1

CRP (C-reactive protein): ενεργός πρωτεΐνη C

Hsp90 (heat shock protein 90): πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90

Myc/sp1 (specificity protein 1): πρωτεΐνη ειδικότητας 1

cGMP (cyclic guanosine monophosphate): κυκλική φωσφορική γουανοσίνη

ATP (adenosine triphosphate): τριφωσφορική αδενοσίνη

cAMP (cyclic adenosine monophosphate): κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη

AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase): πρωτεϊνική κινάση της ενεργοποιημένης 5-μονοφωσφορικής αδενοσίνης

HO-2 (heme oxygenase-2): οξυγενάση της αίμης-2

NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate): δινουκλεοτιδική φωσφορική αδενίνη του νικοτιναμιδίου

NOX2 (NADPH oxidase): οξειδάση του NADPH

NaHS (sodium hydrosulfide): υδροθειούχο νάτριο

Na<sub>2</sub>S (sodium sulfide): θειούχο νάτριο

Sod2 (superoxide dismutase 2): δισμουτάση του υπεροξειδίου 2

DNMT (DNA methyltransferase): μεθυλοτρανσφεράση του DNA

DNA (deoxyribonucleic acid): δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

cDNA (complementary DNA): συμπληρωματικό DNA

RNA (ribonucleic acid): ριβονουκλεϊκό οξύ

mRNA (messenger RNA): αγγελιοφόρο RNA

siRNA (small interfering RNA): μικρό παρεμβαλλόμενο RNA

EDRF (endothelium-derived relaxing factor): παράγοντας χάλασης εκ του ενδοθηλίου

EGFR (epidermal growth factor receptor): υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα

TGF-β (transforming growth factor-β): αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης-β

PDE (phosphodiesterase): φωσφοδιεστεράση

HPV (hypoxic pulmonary vasoconstriction): υποξική πνευμονική αγγειοσύσπαση

GPCRs (G-protein coupled receptors): υποδοχείς συζευγμένοι με G πρωτεΐνες

RhoA (Ras homolog gene family, member A): μέλος της οικογένειας ομόλογων γονιδίων Ras

RhoGEFs (Rho guanine nucleotide exchange factor): παράγοντας ανταλλαγής γουανινικού νουκλεοτιδίου των Rho πρωτεϊνών

MLCK (myosin light chain kinase): κινάση ελαφράς αλυσού μυοσίνης

MLCP (myosin light chain phosphatase): φωσφατάση ελαφράς αλυσού μυοσίνης

IP<sub>3</sub> (inositol triphosphate): τριφωσφορική ινοσιτόλη

PIP<sub>2</sub> (phosphatidylinositol biphosphate): διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη

Insp3R (inositol triphosphate receptor): υποδοχέας τριφωσφορικής ινοσιτόλης

CPI-17 (cytosolic protein inhibitor 17): αναστολέας κυτοσολικής πρωτεΐνης 17

MHC (myosin heavy chain): βαριά αλυσίδα μυοσίνης

PLPC (phospholipase C): φωσφολιπάση C

DAG (diacylglycerol): διακυλογλυκερόλη

PDGF (platelet-derived growth factor): αυξητικός παράγων εκ των αιμοπεταλίων

FGF (fibroblast growth factor): αυξητικός παράγων ινοβλαστών

MAPK (mitogen-activated protein kinases): πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα

PI3K (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase): κινάση της 4,5-διφωσφορικής-5-φωσφατιδυλοϊνσιτόλης

Akt (protein kinase B): πρωτεϊνική κινάση B

ROS (reactive oxygen species): ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

TLR : toll-like receptor

A2BAR (A2B adenosine receptor): A2B υποδοχέας αδενοσίνης

Amf.B (amphotericin B): αμφοτερικίνη B

SQR (succinate co-enzyme Q reductase): αναγωγή του σουκινικού συνενζύμου Q

TRPV (transient receptor potential cation channels): υποδοχέας-διάυλος παροδικού δυναμικού κατιόντων

TSP (transulfuration pathway): μονοπάτι τρανσουλφορυλίωσης

MDA (malondialdehyde): μαλονυδιαλδεΐδη

FRGS (free radical generating system): σύστημα γένεσης ελευθέρων ριζών

PPG (propargyl-glycine): προπαργυλ-γλυκίνη

Bcl-2 (B-cell lymphoma 2): πρωτεΐνη B κυτταρικού λεμφώματος 2

GFR (glomerular filtration rate): ρυθμός σπειραματικής διήθησης

DAO : D-amino acidoxidase

CAT (cysteine aminotransferase): αμινοτρανσφεράση της κυστεΐνης

LTP (long-term potential): μακράς διάρκειας δυναμικό

GABA (gamma aminobutyric acid): γ-αμινοβουτυρικό οξύ

LPS (lipopolysaccharite): λιποπολυσακχαρίτης

SAM (S-adenosylmethionine): S-αδενοσυλμεθειονίνη

TSMT (thiol-S-methyltransferase): θειολ-S-μεθυλοτρανσφεράση

GADPH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase): αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης

TR (thiosulfide reductase): αναγωγή θειοσουλφιδίων

MPTP (mitochondrial permeability transition pore): μιτοχονδριακός πόρος μετάβασης διαπερατότητας

IRF-1 (interferon regulatory factor-1): ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερόνης-1

TFAM (transcription factor A, mitochondrial): μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας

GSH (glutathione): γλουταθειόνη

Keap1 : Kelch like ECH associated protein 1

Nrf2/NFE2L2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

rps3 (ribosomal protein S3): ριβοσωμική πρωτεΐνη S3

NMDA (N-methyl-D-aspartate): N-μεθυλ-D-ασπαρτικό

BAL (bronchoalveolar lavage): βρογχοπνευμονικό έκπλυμα

Atf (activating transcription factor ): μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποίησης

EMT (epithelial-mesenchymal transition): μετάβαση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα

PTP1B (protein-tyrosine phosphatase 1B): πρωτεϊνική τυροσινική φωσφατάση 1B

PERK : (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase

UPR (unfolded protein response): απόκριση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών

eIF2α (eukaryotic initiation factor 2α): ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης 2α

MPO (myeloperoxidase): μυελοϋπεροξειδάση

COX-2 (cyclooxygenase-2): κυκλοξυγενάση-2

PGL (prostaglandin): προσταγλανδίνη

TFF3 : trefoil factor 3

DNBS (dinitrobenzene sulfonic acid): δινιτροβενζενικό σουλφονικό οξύ

BCA (b-cyano-alanin): β-κυανο-αλανίνη

5-ASA (5-amonosalicylic acid): μεσαλαζίνη

DADS (diallyl disulfide): διαλυλικό δισουλφίδιο

DAS (diallyl sulfide): διαλυλικό σουλφίδιο

DATS (diallyl trisulphide): διαλυλικό τρισουλφίδιο

DATTS (diallyl tetra sulfide): διαλυλικό τετρασουλφίδιο

OVA- (ovalbumin): οβαλβουμίνη

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1): μονοκυτταρική χυμοπροσελκυστική πρωτεΐνη1

TRP (transient receptor potential): υποδοχέας μεταβλητού δυναμικού

SRK (Src family kinase): κινάση οικογένειας Src

ICAM (Intercellular Adhesion Molecule 1): ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1

RNS (reactive nitrogen species): ελεύθερες ρίζες αζώτου

JNK (Janus kinases): κινάσες Ιανού

NAC (N-acetylcysteine): N-ακετυλοκυστεΐνη

GTP (guanosine triphosphate): τριφωσφορική γουανοσίνη

GC (guanyl cyclase): γουανυλική κυκλάση

PKG-1 (protein kinase G type 1): πρωτεϊνική κινάση G τύπου 1  
 sGC (soluble guanylyl cyclase): διαλυτή γουανυλική κυκλάση  
 XO (xanthine oxidase): οξειδάση της ξανθίνης  
 FeNO (fractional exhaled nitric oxide): κλάσμα εκπνεόμενου NO  
 MMPs (matrix metalloproteinases): μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας  
 TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases): ιστικοί αναστολείς μεταλλοπρωτεϊνών  
 PKC/RAF (protein kinase C): πρωτεϊνική κινάση C  
 NH<sub>4</sub> : αμμωνία  
 CH<sub>4</sub>: μεθάνιο  
 SM- $\alpha$ -actin (smooth muscle- $\alpha$ -actin):  $\alpha$ -ακτίνη ΛΜΚ  
 DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's medium  
 FBS (fetal bovine serum): ορός εμβρυϊκού μόσχου  
 PBS : phosphate buffered saline  
 NaCl : χλωριούχο νάτριο  
 KCl: χλωριούχο κάλιο  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (disodium phosphate): δινατριούχο φωσφορικό  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (monopotassium phosphate): φωσφορικό κάλιο  
 DMSO (dimethylsulfoxide): διμεθυλοσουλφοξείδιο  
 PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride): φθοριούχο φαινυλ-μεθυλο-σουλφονύλιο  
 SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
 dH<sub>2</sub>O (distilled water): απεσταγμένο νερό  
 BSA (bovine serum albumine): αλβουμίνη ορού μόσχου  
 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (sodium orthovanadate): ορθοβαναδικό νάτριο  
 DTT (dithiothreitol): διθειοθρεϊτόλη  
 TEMED (tetramethylethylenediamine): τετραμεθυλεθυλενεδιαμίνη  
 APS (ammonium persulfate): υπερθειικό αμμώνιο  
 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid): εθυλενεδιαμινετρετρακετοξικό οξύ  
 HCl (hydrochloride): υδροχλωρίδιο  
 HRP (horseradish peroxidase): υπεροξειδάση χρένου  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hydrogen peroxide): υπεροξείδιο του υδρογόνου  
 ECL (enhanced Chemoluminescence): ενισχυμένη χημειοφωταύγεια  
 FITC (Fluorescein isothiocyanate): ισοθειοκυανική φλουορεσεΐνη  
 Cy3 (cyanine 3): χρώση κυανίνης 3  
 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole): 4,6-διαμιδινό-2-φαινυλινδόλη  
 mA: milliAmper

h: hour  
min: minutes  
mmHg: millimeters of Mercury  
ppm: parts per million  
nM: nanomolar  
mM: millimolar  
 $\mu$ M: micromolar  
cm: centimeter  
mm: millimeter

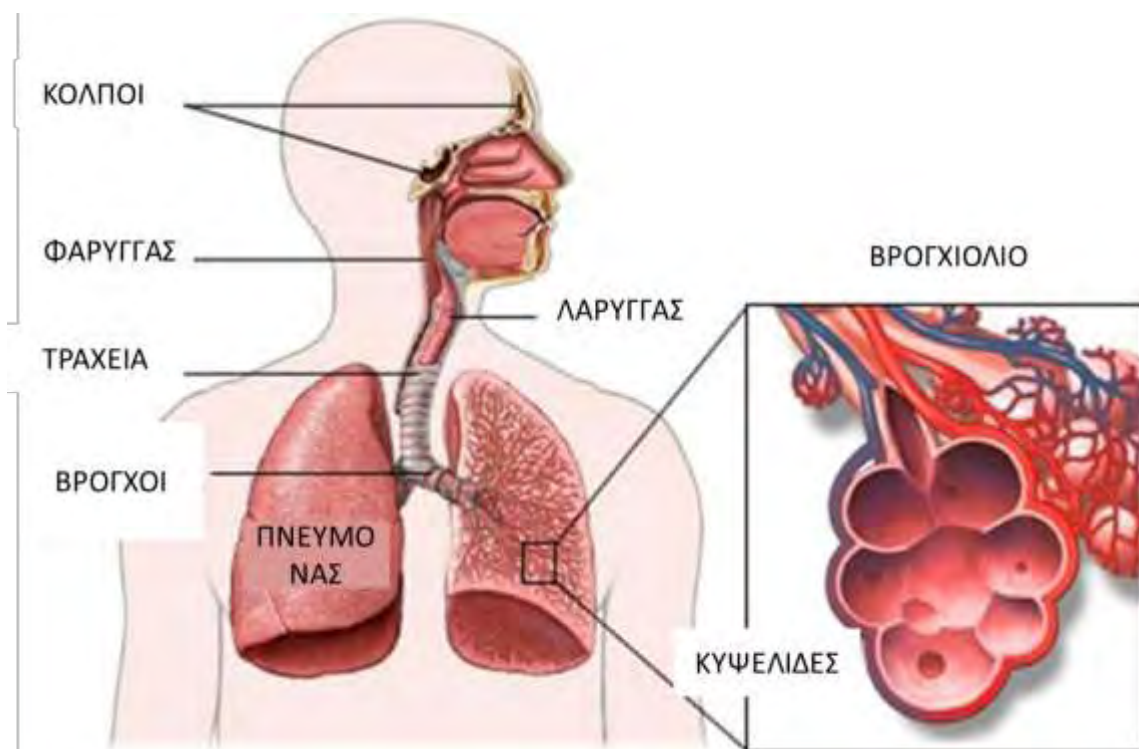
## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.1. Δομή και λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος

Η βασική λειτουργία των πνευμόνων είναι η ανταλλαγή  $O_2$  και  $CO_2$ , μεταξύ του αίματος, των πνευμονικών τριχοειδών και του κυψελιδικού αέρα, μέσω της τριχοκυψελιδικής μεμβράνης. Η μετακίνηση όγκων αέρα από το περιβάλλον προς το εσωτερικό του οργανισμού επιτυγχάνεται μέσω του συστήματος των αεραγωγών που αρχίζει από τη μύτη και το στόμα, συνεχίζεται με το φάρυγγα, το λάρυγγα και τους αεραγωγούς μεγαλύτερης διαμέτρου (τραχεία 2cm) και φτάνει σε αεραγωγούς πολύ μικρής διαμέτρου (βρογχιόλια <2mm). Η απαιτούμενη διαφορά πίεσης για την κίνηση του αέρα παράγεται από τη σύσπαση των εισπνευστικών μυών (διάφραγμα και μεσοπλεύριου) που διατείνει το θώρακα και κατά συνέπεια τους πνεύμονες, με αποτέλεσμα τη μείωση της κυψελιδικής πίεσης. Στην εκπνοή γίνεται παθητική χάλαση των εισπνευστικών μυών και συνεισφέρει η αύξηση της ενδοκοιλιακής πίεσης μέσω των κοιλιακών μυών, που ωθούν προς τα άνω το διάφραγμα. Η ροή του αέρα είναι βραδεία και σιωπηρή στους μικρούς αεραγωγούς αυτούς και η μεταφορά αερίων πραγματοποιείται κυρίως με διάχυση στα τελικά βρογχιόλια (K. 2008).

Καθώς ο αέρας εισπνέεται μέσω των ανώτερων αεραγωγών, διηθείται (στη μύτη), θερμαίνεται στη θερμοκρασία του σώματος και υγραίνεται με υδρατμούς μέχρι κορεσμού. Μερική ανάκτηση της θερμότητας και της υγρασίας γίνεται κατά την εκπνοή (Hunter J.A.A. 2009). Η τραχεία φέρει χόνδρινους ημικρίκιους σωλήνες και το οπίσθιο τοίχωμά της αποτελείται από βλεννογόνο και λείες μυϊκές ίνες. Στο αντανεκλαστικό του βήχα, το οπίσθιο τμήμα συσπάται και ο αυλός αποκτά σχήμα ‘υ’. Η τραχεία διαιρείται σε 2 κύριους βρόγχους με τον αριστερό να είναι μακρύτερο και το δεξιό να σχηματίζει μικρότερη γωνία με την τραχεία. Οι κύριοι βρόγχοι στη συνέχεια διαιρούνται σε λοβαίους και αυτοί σε τμηματικούς, με αποτέλεσμα 32 γενεές βρόγχων μέχρι τα αναπνευστικά βρογχιόλια. Όσο προχωρούν οι διακλαδώσεις αραιώνουν οι χόνδροι, ενώ η περιεκτικότητά τους σε μύες αυξάνει και το επιθήλιό τους είναι κροσσωτό. Τα βρογχιόλια είναι η κατάληξη των βρόγχων, δεν περιέχουν χόνδρο και το επιθήλιό τους είναι μονόστοιβο κυλινδρικό κροσσωτό. Τα αναπνευστικά βρογχιόλια εμφανίζουν κυψελίδες στο τοίχωμά τους και καλύπτονται από στρώμα επιφανειοδραστικής ουσίας. Οι κυψελίδες έχουν διάμετρο 0,1-0,5 mm και τα τοιχώματά τους επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω των πόρων του Kohn και γειτνιάζουν με τα πνευμονικά τριχοειδή. Ο διάμεσος χώρος βρίσκεται μεταξύ κυψελιδικού και τριχοειδικού επιθηλίου. Ενορχηστρωτής της αναπνοής είναι το αναπνευστικό κέντρο στον προμήκη, που η λειτουργία του ρυθμίζεται μέσω περιφερικών υποδοχέων. Οι κύριες βρογχικές και πνευμονικές υποδιαιρέσεις παρουσιάζονται στην εικόνα 1 (K. 2008).



Εικόνα 1. Η δομή του αναπνευστικού συστήματος και η λειτουργία του. Ανατύπωση από (Marien E.M. 2007)

Το πνευμονικό λοβίδιο είναι η μονάδα ανταλλαγής αερίων του πνεύμονα και αποτελείται από διακλαδιζόμενα αναπνευστικά βρογχιόλια και δέσμες κυψελίδων. Εδώ ο διηθημένος, υγρός και θερμός αέρας έρχεται σε στενή επαφή με τα πνευμονικά τριχοειδή (απόσταση αέρα-αίματος  $< 0,4 \mu\text{m}$ ) και λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή οξυγόνου- $\text{CO}_2$ . Οι κυψελίδες επενδύονται από πεπλατυσμένα επιθηλιακά κύτταρα (πνευμονοκύτταρα τύπου I) και ελάχιστα, περισσότερο κυβοειδή, πνευμονοκύτταρα τύπου II: Τα τελευταία παράγουν επιφανειοδραστικό παράγοντα, ένα μίγμα φωσφολιπιδίων που ελαττώνει την επιφανειακή τάση και εξουδετερώνει την τάση σύμπτωσης των κυψελίδων. Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II μπορούν επίσης να διαιρεθούν και να ανασυγκροτήσουν τα πνευμονοκύτταρα τύπου I μετά από βλάβη του πνευμονικού ιστού (Hunter J.A.A. 2009).

## 1.2. Το αμυντικό σύστημα των πνευμόνων

Εφόσον το αναπνευστικό είναι ένα ανοιχτό σύστημα σε συνεχή επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα, κρίνεται αναγκαία η οχύρωσή του από βλαβερούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Όσον αφορά τους ανώτερους αεραγωγούς, τα περισσότερα μεγάλα σωματίδια συγκρατούνται από τις τρίχες της μύτης, ενώ τα μικρότερα σωματίδια απωθούνται προς το στοματοφάρυγγα από το κυλινδρικό κροσσώτο επιθήλιο που καλύπτει τις ρινικές κόγχες και το διάφραγμα. Επίσης, το οπίσθιο τοίχωμα του φάρυγγα αποτελεί σημείο πρόσκρουσης για τα μεγαλύτερα σωματίδια και διαθέτει ανεπτυγμένο λεμφικό ιστό για ισχυρή ανοσιακή απάντηση. Με το βήχα, η πίεση των



εκπνευστικών μυών επί της κλειστής γλωττίδας αυξάνει πολύ την ενδοθωρακική πίεση, η οποία κατόπιν απελευθερώνεται εκρηκτικά (Hunter J.A.A. 2009). Ο παρμόσ είναι επίσης ένα αντανεκλαστικό που επιταχύνει την αποβολή των ξένων σωματιδίων κατά μήκος της μεταφορικής μοίρας των αεραγωγών (Boron W. F. 2006). Το εύκαμπτο οπίσθιο τοίχωμα της τραχείας ωθείται προς τα μέσα από την υψηλή πίεση, ελαττώνοντας τη διατομή και μεγιστοποιώντας την ταχύτητα του αέρα για να επιτευχθεί αποτελεσματική απόχρεμψη. Ο λάρυγγας επίσης ενεργεί σαν σφιγκτήρας, προστατεύοντας τον αεραγωγό κατά την κατάποση και τον έμετο (Hunter J.A.A. 2009).

Η ασηψία, η δομή και η λειτουργικότητα των κατώτερων αεραγωγών συντηρείται με τη στενή συνεργασία εγγενών και προσαρμοστικών (επίκτητων) ανοσοαπαντήσεων, που περιλαμβάνουν μη ειδικούς αμυντικούς μηχανισμούς. Τα εισπνεόμενα σωματίδια παγιδεύονται μέσα στη βλέννα του αεραγωγού και αποβάλλονται με τη βλεννοκροσσική κυλινδρική κλίμακα (Hunter J.A.A. 2009). Επιπλέον, τα σωματίδια που αιωρούνται στο υγρό που καλύπτει την επιφάνεια των κυψελίδων, μετακινούνται προς τα τελικά βρογχόλια, όπου παραλαμβάνονται από στρώμα βλέννης και με την κίνηση των κροσσών εξωθούνται προς τους μεγαλύτερους αεραγωγούς (Boron W. F. 2006). Ο καπνός του τσιγάρου αυξάνει την έκκριση βλέννας, αλλά ελαττώνει τη βλεννοκροσσική κάθαρση και αυξάνει την τάση για λοιμώξεις της κατώτερης αναπνευστικής οδού, συμπεριλαμβανομένης της πνευμονίας (Hunter J.A.A. 2009).

Το έκκριμα του αεραγωγού περιέχει πλήθος αντιμικροβιακών πεπτιδίων, πρωτεϊνών και αντιοξειδωτικών. Πολλά από αυτά τα μόρια συμβάλλουν στην οψωνινοποίηση και θανάτωση των βακτηρίων και στη ρύθμιση των ισχυρών πρωτεολυτικών ενζύμων που εκκρίνουν τα φλεγμονώδη κύτταρα. Ειδικότερα, η  $\alpha_1$ -αντιπρωτεΐνη ή αλλιώς  $\alpha_1$ -αντιθρυψίνη (A1Pi) ρυθμίζει τη δραστηριότητα της ελαστάσης των ουδετερόφιλων και η ανεπάρκειά της συσχετίστηκε με την εμφάνιση πρόωρου εμφυσήματος (Kumar V. 2008).

Τα φαγοκύτταρα της κυκλοφορίας, όπως τα ΜΦ, καταβροχθίζουν μικρόβια, οργανικές σκόνες (από ζώα ή φυτά) και άλλα σωματίδια. Ανόργανες ουσίες, όπως ο αμίαντος και το πυρίτιο, θανατώνουν τα ΜΦ, απελευθερώνοντας ισχυρά πρωτεολυτικά ένζυμα που προξενούν βλάβες στο παρέγχυμα. Ο αριθμός των ουδετερόφιλων στον αεραγωγό είναι μικρός, αλλά στην πνευμονική κυκλοφορία υπάρχει μικρή δεξαμενή από την οποία λαμβάνονται αμέσως εφεδρείες σε περίπτωση βακτηριακής λοίμωξης. Η γεινίαση των ουδετερόφιλων με το πνευμονικό παρέγχυμα μπορεί να εξηγήσει την πρόκληση πνευμονικής βλάβης επί συνδρόμων σήψης και τραυματισμών. Στη φυσική ανοσία συμμετέχουν και άλλα κύτταρα, όπως ηωσινόφιλα, κύτταρα φυσικοί φονείς και σιτευτικά κύτταρα. Σημαντικός αναγνωρίζεται και ο ρόλος των toll-like receptors (TLR) στη φυσική ανοσία. Οι πολυμορφισμοί τέτοιων υποδοχέων μπορεί να επηρεάσουν τη μορφή της ανοσοαπάντησης (Kumar V. 2008).

Η προσαρμοστική (επίκτητη) ανοσιακή άμυνα χαρακτηρίζεται από την ειδικότητα της ανοσοαπάντησης και την ανάπτυξη ανοσιακής μνήμης. Τα δενδριτικά κύτταρα του πνεύμονα διευκολύνουν την παρουσίαση αντιγόνων στα T και B λεμφοκύτταρα. Τα CD4 βοηθητικά T λεμφοκύτταρα ωθούν τα B λεμφοκύτταρα να παράγουν ανοσοσφαιρίνες, οι οποίες εξουδετερώνουν μικροβιακές τοξίνες και υποκινούν μία άκρως αποτελεσματική διαδικασία οψωνίνωσης και φαγοκυτταρικής θανάτωσης. Εάν τα εν λόγω T λεμφοκύτταρα είναι τύπου Th2 προάγουν την παραγωγή IgE και άρα προδιαθέτουν σε αλλεργία. Άλλες ανοσοαπαντήσεις οδηγούν στην παραγωγή αντισωμάτων IgM, IgG, IgA (Kumar V. 2008).

Οι φυσικές και οι προσαρμοστικές ανοσοαπαντήσεις συντονίζονται με σειρά κυτταροκινών, οι οποίες υποκινούν, ρυθμίζουν και τερματίζουν την ανοσοαπάντηση και συγχρονίζουν τις επιδιορθωτικές διεργασίες (Kumar V. 2008).

### **1.3. Παθήσεις του αναπνευστικού**

Το αναπνευστικό σύστημα πλήττεται από μία πληθώρα νοσολογικών οντοτήτων τόσο οξείας όσο και χρονίως. Οι χρόνιες φλεγμονώδεις, μη κοκκιωματώδεις νόσοι όπως το άσθμα και η ΧΑΠ (χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια) εμπλέκουν τους αεραγωγούς στην παθοφυσιολογία τους, ενώ η πνευμονική υπέρταση συχνά συνυπάρχει με υποκείμενη νόσο των αεραγωγών.

#### **1.3.1 Άσθμα**

Το άσθμα χαρακτηρίζεται από επεισοδιακό, αναστρέψιμο βρογχόσπασμο, ο οποίος προκαλείται από βρογχική υπεραντιδραστικότητα ως απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα. Πιστεύεται ότι αυτό προκύπτει από εμμένουσα βρογχική φλεγμονή, γι αυτό και το άσθμα θεωρείται χρόνια φλεγμονώδης βλάβη των αεραγωγών. Κλινικά το άσθμα εκδηλώνεται με παροξυσμική δύσπνοια, βήχα και εκπνευστικό συριγμό. Προσβάλλει 5% των ενηλίκων και 7-10% των παιδιών (Kumar V. 2008).

Η υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών μπορεί να εκδηλωθεί εύκολα με τη μορφή της αυξημένης ευαισθησίας σε βρογχοσυσταλτικούς παράγοντες, όπως η ισταμίνη ή η μεταχολίνη (χολινεργικός αγωνιστής). Η παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων (ιδιαίτερα ηωσινοφίλων, λεμφοκυττάρων και μαστοκυττάρων) σε συνδιασμό με τη βλάβη στο βρογχικό επιθήλιο αποτελούν ένα σταθερό χαρακτηριστικό εύρημα του βρογχικού άσθματος. Οι ιντερλευκίνες 4,5 και 13 προάγουν την σύνθεση IgE, την ανάπτυξη μαστοκυττάρων, καθώς και την ενεργοποίηση των ηωσινοφίλων. Η αρχική ενεργοποίηση των μαστοκυττάρων γίνεται στην επιφάνεια των βλεννογόνων και η απελευθέρωση διαμεσολαβητών, διασπά τις διακυτταρικές συνδέσεις, επιτρέποντας τη διείσδυση του αντιγόνου και την επαφή του με περισσότερα βλεννογονικά

μαστοκύτταρα. Επίσης, η άμεση ενεργοποίηση των υποεπιθηλιακών παρασυμπαθητικών υποδοχέων προκαλεί αντανακλαστικό βρογχόσπασμο. Όψιμα, υπάρχει πρόσθετη επιστράτευση λευκοκυττάρων που απελευθερώνουν πρόσθετους μεσολαβητές που ενισχύουν την αρχική αντίδραση και προκαλούν βλάβη των επιθηλιακών κυττάρων (Kumar V. 2008).

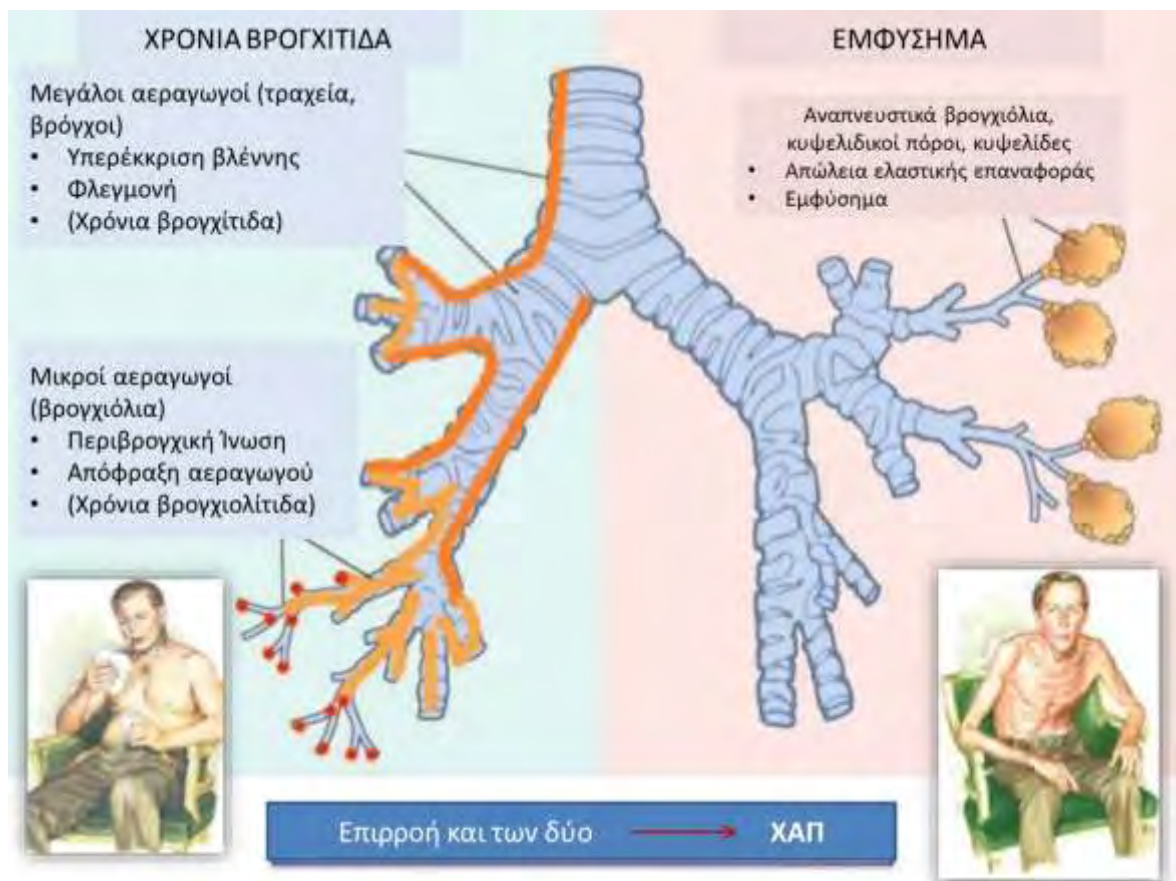
Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι πηγές διαμεσολαβητών, όπως της ενδοθηλίνης και του οξειδίου του αζώτου, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν συστολή και χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων, αντιστοίχως. Η απώλεια της επιθηλιακής ακεραιότητας, μέσω της μείωσης του διαθέσιμου NO, μπορεί επίσης να συμβάλλει στην υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών. Επιπλέον, η συσσώρευση ηωσινοφίλων και μαστοκυττάρων επάγει περαιτέρω αντιδράσεις που οδηγούν σε ιστική βλάβη (μέσω ηωταξίνης, MBP-μείζονα βασική πρωτεΐνη, ECP-κατιονική πρωτεΐνη ηωσινοφίλων, υπεροξειδάση των ηωσινοφίλων) (Kumar V. 2008).

### **1.3.2. Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια**

Η χρόνια αποφρακτική πνευμονική νόσος προσβάλλει περισσότερο από το 10% των ενηλίκων και αποτελεί την 4η αιτία θανάτου παγκοσμίως. Χαρακτηρίζεται από εμμένουσα απόφραξη των αεραγωγών που είναι συνήθως προοδευτική και σχετίζεται με μία υπερβολική χρόνια φλεγμονώδη απάντηση των αεραγωγών και των πνευμόνων σε βλαπτικά σωματίδια ή αέρια. Περιλαμβάνει δύο κύριες συνιστώσες, τη χρόνια βρογχίτιδα και το εμφύσημα. Οι παροξύνσεις και οι συνυπάρχουσες παθήσεις συμβάλλουν στη συνολική βαρύτητα της νόσου (Kumar V. 2008).

Η χρόνια βρογχίτιδα προσβάλλει τους μεγάλους και μικρούς αεραγωγούς, ενώ το εμφύσημα περιορίζεται στα τελικά βρογχιόλια. Τα δύο νοσήματα συνήθως συνυπάρχουν, επειδή ο σημαντικότερος παθογόνος παράγοντας, το κάπνισμα είναι κοινός (Kumar V. 2008).

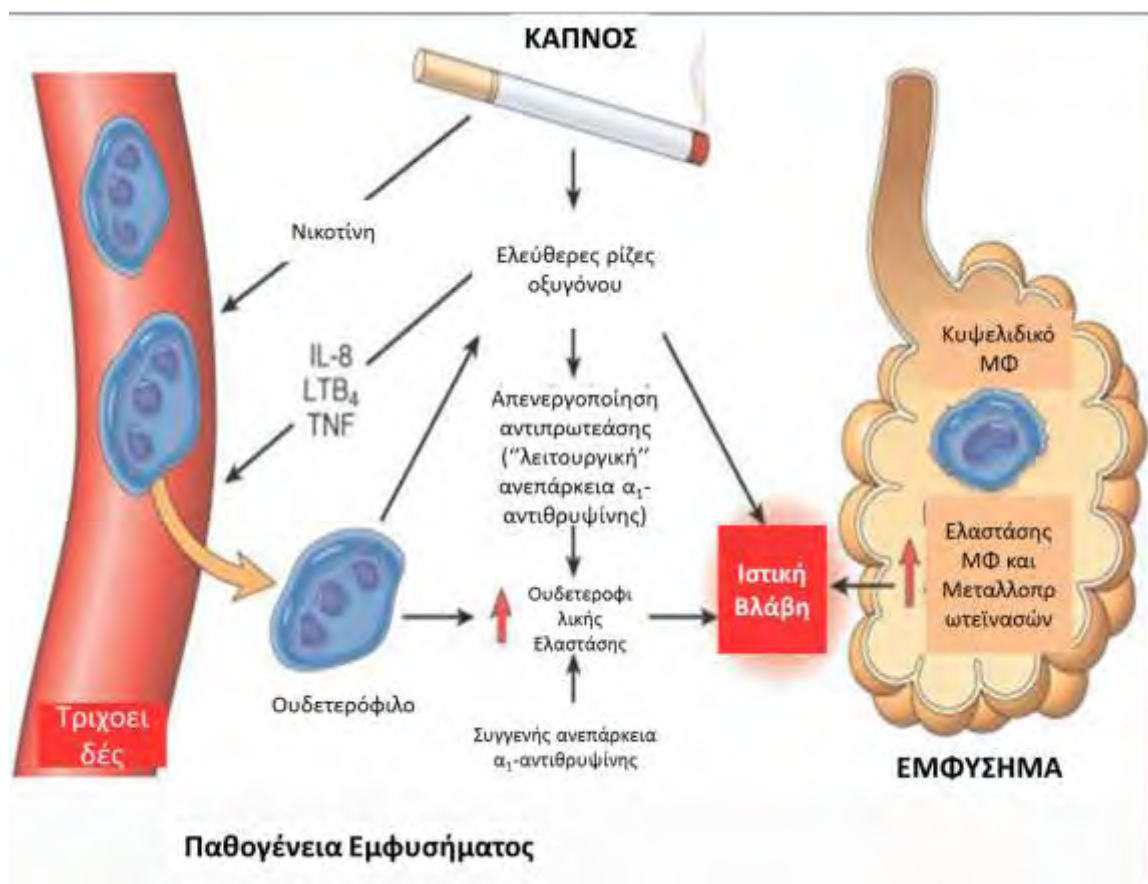
Το εμφύσημα προκύπτει ως συνέπεια της διαταραχής ισορροπίας πρωτεάσης-αντιθρυψίνης και αυτής των οξειδωτικών-αντιοξειδωτικών παραγόντων. Περίπου 1% ασθενών με εμφύσημα έχουν ανεπάρκεια α1-αντιθρυψίνης, ενός ενζύμου, το οποίο βρίσκεται στον ορό, στο εξωκυττάριο υγρό και στα ΜΦ και είναι σημαντικός αναστολέας πρωτεασών (ειδικά της ελαστάσης), που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Τα ουδετερόφιλα φυσιολογικά είναι απομονωμένα στα περιφερικά τριχοειδή αγγεία και λίγα αποκτούν πρόσβαση στους κυψελιδικούς χώρους. Το εκάστοτε ερέθισμα είτε αυξάνει τον αριθμό των λευκοκυττάρων στον πνεύμονα, είτε την απελευθέρωση της πρωτεάσης που περιέχεται στα κοκκία τους ενισχύει την πρωτεολυτική δραστηριότητα. Τα χαμηλά επίπεδα της α1-αντιθρυψίνης στον ορό έχουν ως συνέπεια την ανεξέλεγκτη καταστροφή του ελαστικού ιστού και την ανάπτυξη εμφυσήματος (Kumar V. 2008).



Εικόνα 2: Ανατομική κατανομή της γνήσιας χρόνιας βρογχίτιδας και του γνήσιου χρόνιου εμφυσήματος. Ανατύπωση από (Kumar V. 2008).

Στους καπνιστές από την άλλη, ουδετερόφιλα και ΜΦ συγκεντρώνονται στις κυψελίδες. Ο μηχανισμός της φλεγμονής δεν είναι απολύτως σαφής, αλλά ενδεχομένως να περιλαμβάνει τις άμεσες χημειοτακτικές δράσεις της νικοτίνης καθώς επίσης και τις επιπτώσεις των βλαπτικών ριζών οξυγόνου που περιέχονται στον καπνό. Αυτές επάγουν την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα κΒ (NF-κΒ), ο οποίος επάγει τα γονίδια του παράγοντα νέκρωσης του όγκου (TNF) και της ιντερλευκίνης 8 (IL-8). Οι παράγοντες αυτοί στη συνέχεια προσελκύουν και ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα (εικόνα 3). Τα τελευταία απελευθερώνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους που είναι πλούσια σε κυτταρικές πρωτεάσες (ελαστάση, πρωτεϊνάση 3, καθεψίνη G), με συνέπεια την ιστική βλάβη. Το κάπνισμα ενισχύει επίσης τη δραστηριότητα της ελαστάσης των μακροφάγων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, αντιοξειδωτικές ουσίες στον πνεύμονα (δισμουτάση υπεροξειδίου, γλουταθειόνη) διατηρούν την οξειδωτική βλάβη στα ελάχιστα δυνατά επίπεδα. Ο καπνός περιέχει άφθονες οξειδωτικές ουσίες (ελεύθερες ρίζες οξυγόνου), οι οποίες επηρεάζουν αυτούς τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και συνεπώς υποκινούν την ιστική βλάβη. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα προσφέρουν επιπλέον αντιδραστικές ρίζες και ενισχύουν τη δεξαμενή των τοξικών ριζών οξυγόνου στις κυψελίδες. Μία δευτερογενής

συνέπεια της οξειδωτικής βλάβης είναι η αδρανοποίηση των ενδογενών αντιπροτεασών, με συνέπεια τη “λειτουργική” ανεπάρκεια της α<sub>1</sub>-αντιθρυψίνης (Kumar V. 2008).



Εικόνα 3: Παθογένεια εμφυσήματος. Ανατύπωση από (Kumar V. 2008).

Στη χρόνια βρογχίτιδα, η μορφολογική βάση της απόφραξης της ροής του αέρα είναι περισσότερο περιφερική και προκύπτει από τη φλεγμονή, ίνωση και στένωση των βρογχιολίων καθώς και το συνυπάρχον εμφύσημα. Χαρακτηριστικό γνώρισμα είναι η υπερέκκριση βλέννης που αρχίζει από τους μεγάλους αεραγωγούς. Πέρα από το κάπνισμα μπορεί να συμβάλλουν και άλλοι ατμοσφαιρικοί ρύποι όπως το διοξείδιο του θείου και το διοξείδιο του αζώτου. Αυτοί οι ερεθιστικοί παράγοντες επάγουν τη λειτουργία των βρογχικών βλεννωδών αδένων, προκαλούν υπερτροφία αυτών και οδηγούν στο μεταπλαστικό σχηματισμό καλκοειδών βλεννοεκκριτικών κυττάρων στο επιφανειακό επιθήλιο των βρόγχων. Προκαλούν φλεγμονή με διήθηση από CD8+ T κύτταρα, ΜΦ και ουδετερόφιλα, ενώ σε αντίθεση με το άσθμα απουσιάζουν τα ηωσινόφιλα. Πολλές από τις βλαπτικές επιδράσεις των περιβαλλοντικών παραγόντων στο αναπνευστικό επιθήλιο επάγονται μέσω του υποδοχέα του επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα (EGFR- Epidermal Growth Factor Receptor). Η μεταγραφή του γονιδίου MUC5AC της βλέννης, που αυξάνεται ως συνέπεια της έκθεσης στον καπνό σε πειραματικά μοντέλα in vitro και in vivo, εν μέρει μεσολαβείται μέσω οδών του υποδοχέα του επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα. Η

μικροβιακή λοίμωξη είναι συχνά παρούσα, συμβάλλοντας στη διατήρηση της φλεγμονής και την επιδείνωση των συμπτωμάτων (Kumar V. 2008).

### **1.3.3. Πνευμονική Υπέρταση**

Ως πνευμονική υπέρταση ορίζεται η μέση πίεση στην πνευμονική αρτηρία που υπερβαίνει τα 25 mmHg εν ηρεμία ή 30 mmHg με κόπωση. Οι αιτίες της πνευμονικής υπέρτασης ανάλογα με τη θέση της βλάβης είναι πλείστες με συνηθέστερη την αναπνευστική ανεπάρκεια λόγω εγγενούς πνευμονικής νόσου. Επικρατεί υπερτροφία του μέσου και έσω χιτώνα του αγγειακού τοιχώματος και υπερπλασία των ενδοθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα σημαντική στένωση του αγγειακού αυλού και συχνά θρόμβωση *in situ* (Hunter J.A.A. 2009).

Η παθοφυσιολογική οντότητα της πνευμονικής υπέρτασης είναι η πνευμονική αγγειοσύσπαση στην υποξία (HPV). Η υποξία απουσία υπερκαπνίας οδηγεί σε σύσπαση των αγγείων της πνευμονικής κυκλοφορίας, σε αντίθεση με τις συστηματικές αρτηρίες που διαστέλλονται ως απόκριση στην ιστική υποξία, γεγονός που προκαλείται και σε διέγερση του νωτιαίου μυελού. Αυτή η αντίδραση θεωρείται τοπική και ανεξάρτητη από το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Επάγεται μέσω της πτώσης του pO<sub>2</sub> αεραγωγού/κυψελίδων και οι προτριχοειδικές αντιστάσεις συνεισφέρουν σ' αυτό (Evans, Hardie et al. 2011). Επίσης, ένας άλλος παράγοντας που οδηγεί σε χρόνια διαλείπουσα υποξία είναι οι επαναλαμβανόμενες άπνοιες, όπως συμβαίνει στο σύνδρομο υπνικής άπνοιας (K. 2008).

### **1.4. Αναδιαμόρφωση αεραγωγών**

Η οξεία και η χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών ενορχηστρώνονται από κυτταροκίνες, που εκκρίνονται από φλεγμονώδη κύτταρα, μυοϊνοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα. Τα ΛΜΚ των αεραγωγών επιδεικνύουν λειτουργική πλαστικότητα στην ικανότητά τους για σύσπαση, πολλαπλασιασμό και σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας. Αυτό παίζει κυρίαρχο ρόλο στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών, μία διαδικασία που συμβαίνει χαρακτηριστικά στο άσθμα και περιλαμβάνει τα κάτωθι. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 1 συμβαίνουν δομικές αλλαγές που αυξάνουν τη μάζα των ΛΜΚ (Al-Muhsen, Johnson et al. 2011).

Το κλειδί στην αναδιαμόρφωση είναι ότι έχουμε συνύπαρξη υπερτροφίας και υπερπλασίας των ΛΜΚΑ. Όπως αναφέρεται και πιο πάνω (βλέπε παράγραφο 1.3.1. Άσθμα), εξωτερικοί παράγοντες πυροδοτούν κυτταρική βλάβη και ενισχυμένη Th2 φλεγμονώδη απόκριση, με αποτέλεσμα την υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών και την προοδευτική δομική αλλαγή στο τοίχωμά τους. Πρωταγωνιστικό ρόλο σ' αυτή τη διαδικασία έχουν οι ιντερλευκίνες (IL-1β, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13), η IFN-γ, ο TNF-α, οι πρωτεΐνες των τμημάτων της ECM



(extracellular matrix) που συμμετέχουν στην σύσπαση των λείων μυϊκών ινών (π.χ. λαμίνη, φιμπρονεκτίνη) και σχετικές μεταλλοπρωτεΐνες καθώς και μεσολαβητές της φλεγμονώδους απόκρισης (π.χ. λευκοτριένια και ισοπροστάνια, RANTES, CAMs). Μυοϊνοβλάστες των αεραγωγών φαίνεται πως κινητοποιούν τη χρόνια φλεγμονή. Η εξωκυττάρια ουσία έχει ρόλο μπαλαντέρ, καθώς άλλα συστατικά της όπως το κολλαγόνο τύπου IV καθυστερούν την τροποποίηση των ΛΜΚ σε συνθετικό φαινότυπο και άλλα όπως η ινωδονεκτίνη και τα κολλαγόνα τύπου I και III την προωθούν (Halayko and Amrani 2003).

#### ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ:

- Εκγύμνωση του επιθηλίου
- Υπερτροφία βλεννοπαραγωγών αδένων
- Αύξηση της μάζας των ΛΜΚ και πάχυνση της lamina reticularis
- Αύξηση του αριθμού των ινοβλαστών/μυοϊνοβλαστών
- Υποεπιθηλιακή ίνωση, αύξηση εξωκυττάριας ουσίας
- Αγγειακές μεταβολές (αγγειογένεση)
- Ανάπτυξη νευριτών

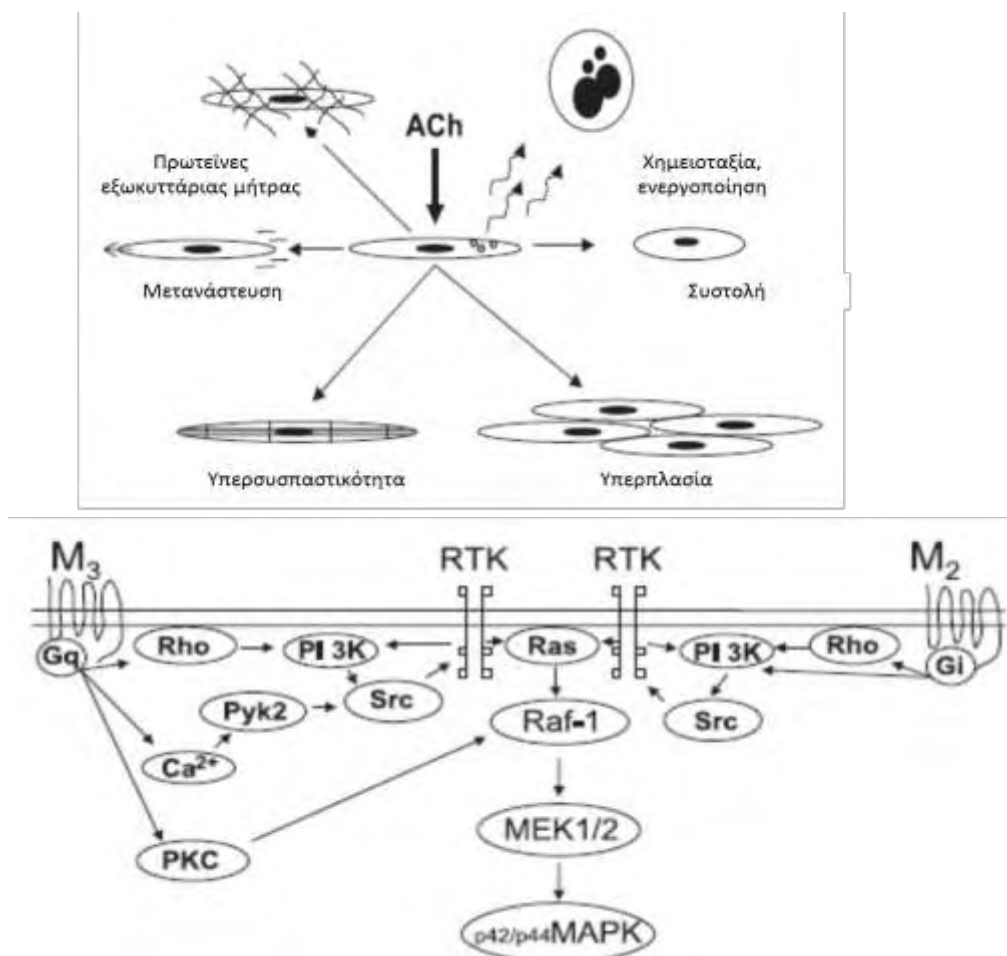
*Πίνακας I: Στοιχεία αναδιαμόρφωσης αεραγωγού. Ανατύπωση από (Al-Muhsen, Johnson et al. 2011).*

### **1.5. Ο ρόλος των ΛΜΚ στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών**

Τα ΛΜΚ δέχονται τον έλεγχο του αυτόνομου νευρικού συστήματος μέσω αδρενεργικών και χολινεργικών υποδοχέων. Οι χολινεργικοί υποδοχείς έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη σύσπαση, προσδένουν ACh και χωρίζονται σε νικοτινικούς και μουσκαρινικούς. Οι χολινεργικοί υποδοχείς είναι είτε μεταβοτρόποι (όπου ACh ή άλλα μόρια προσδένονται για μεταγωγή σήματος) είτε ιονοτρόποι (όπου ACh ή άλλα μόρια προσδένονται για μεταφορά ιόντων). Οι υποδοχείς συνδέονται με G πρωτεΐνες, που η ενεργοποίησή τους κινητοποιεί την αδενυλική κυκλάση προς αύξηση του cAMP. Η ακετυλοχολίνη βρίσκεται μεταγαγγλιακά στο παρασυμπαθητικό (και προγαγγλιακά στο συμπαθητικό) και η νορεπινεφρίνη μεταγαγγλιακά στο συμπαθητικό (Tiwari P. 2013).

Επιθηλιακά, φλεγμονώδη και ΛΜΚ εκφράζουν αυτούς τους υποδοχείς στην επιφάνειά τους και ευθύνονται για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίησή τους. Σε φλεγμονή των πνευμόνων (κύρια χρόνια) ο τόνος του πνευμονογαστρικού αυξάνεται και η ACh που απελευθερώνεται ρυθμίζει την επαγωγή της φλεγμονής και την παραγωγή βλέννης (Gosens, Zaagsma et al. 2006) (εικόνα 4). Τα ΛΜΚ αυξάνουν τη μιτογόνο δράση τους σ' αυτές τις περιπτώσεις και αυτό

συσχετίζεται με αυξημένη έκφραση M3 και μείωση των M2 μουσκαρινικών υποδοχέων στην επιφάνειά τους, που οδηγεί σε ενεργοποίηση των MAPK και της PI3K (Stamatiou, Paraskeva et al. 2014).



Εικόνα 4: Μηχανισμοί δράσης της ACh στον αεραγωγό και μουσκαρινικοί υποδοχείς. Ανατύπωση από (Gosens, Zaagsma et al. 2006)

Μια πληθώρα σηματοδοτικών οδών αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ, συμπεριλαμβανομένου της p38, p42/44 MAPK, PI3/Akt, NF-κB και TGF-β-σχετιζόμενων κινασών. Η p38 οδός χρειάζεται τις ανασταλτικές δράσεις των κυτταροκινών IL-13, IL-1β στην απόκριση των ΛΜΚΑ σε β2 αγωνιστές ή αγωνιστές συστολής, όπως η ισταμίνη. Ο NF-κB ενεργοποιείται στο ήπιο άσθμα και είναι απαραίτητος για την απευαισθητοποίηση του H1 υποδοχέα της ισταμίνης. Μέσω του TNF-α και της IL-13 ενεργοποιείται και η STAT1, που εμπλέκεται σε μονοπάτια των MAPK για ρύθμιση αντικής δράσης και προφλεγμονώδεις αποκρίσεις, δεν συσχετίζεται όμως με τη μηχανική πλαστικότητα (Halayko and Amrani 2003).

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των GPCRs και των RTKs κρίνονται σημαντικές. Για παράδειγμα, η σηματοδότηση μέσω EGFR, που μπορεί να επάγεται από μηχανικό στρες κρίνεται σημαντική στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών στο χρόνια αλλεργικό άσθμα και οδηγεί στην αύξηση των



ΛΜΚ μέσω παραγωγής λευκοτριενίων. Νεότερα δεδομένα εμπλέκουν και τις σηματοδοτικές οδούς των NOX4 μέσω των ROS και της GSK-3β (Prakash 2013).

Τα ίδια τα ΛΜΚ επίσης τροποποιούν το εξωκυττάριο περιβάλλον τους μέσω σηματοδοτικών οδών, όπως αυτός της καβεολίνης και οδοί που ενεργοποιούνται από PPAR-γ (peroxisome proliferator-activated receptor) αγωνιστές που αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους. Αντιπολλαπλασιαστικό ρόλο στα ΛΜΚΑ φαίνεται πως έχουν και τα οιστρογόνα, ενώ η δράση της IL-1β και του TNF-α αυξάνει την παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-9 και MMP-12 (Prakash 2013).

### **1.5.1. Φυσιολογική λειτουργία των ΛΜΚΑ και πλαστικότητα**

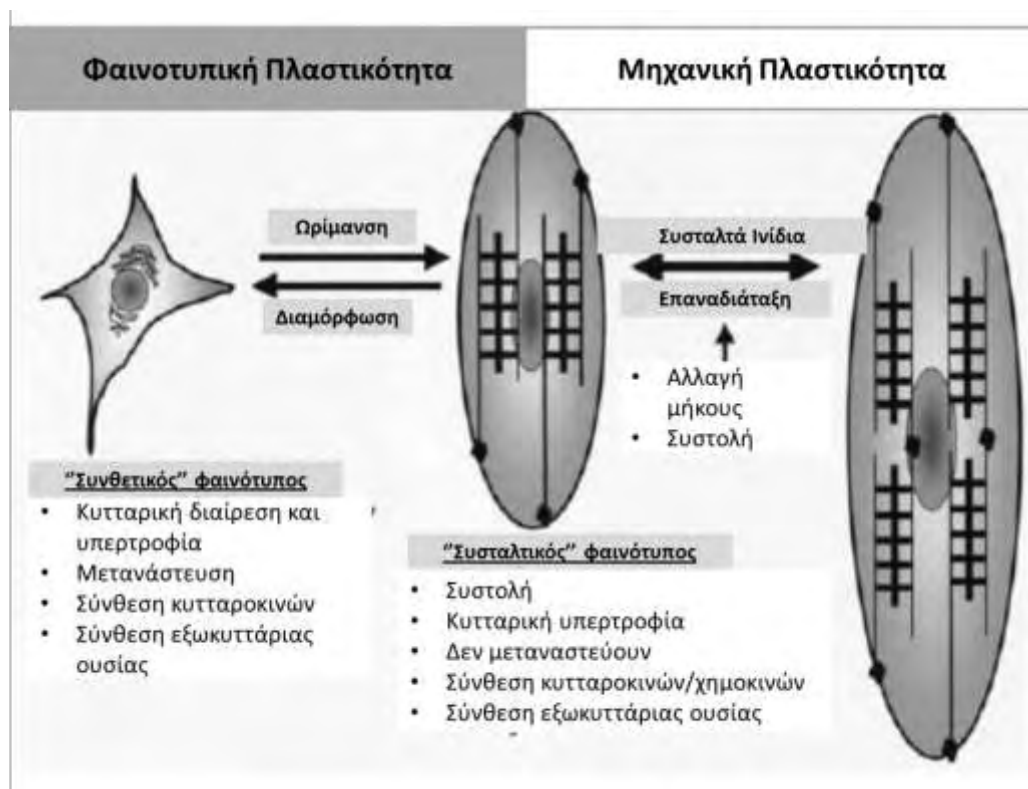
Οι μύς των αεραγωγών διατάσσονται σε δέσμες μερικώς περιβαλλόμενες από ινοβλάστες και εξωκυττάρια ουσία. Το πλήθος των μικρών αεραγωγών εντός του πνευμονικού παρεγχύματος διατηρείται βατό στον υγιή οργανισμό από την ακτινωτή έλξη που ασκεί το δίκτυο των ινών ελαστικής (Hunter J.A.A. 2009). Το μήκος των ΛΜΚ τροποποιείται αναλόγως των ταλαντώσεων που επιδέχονται από μηχανικά φορτία, γεγονός που τροποποιείται από τις ενδοπνευμονικές πιέσεις και τον αναπνεόμενο όγκο (An, Bai et al. 2007). Η τραχεία ενέχει πυκνή νεύρωση, η οποία φτάνει πολλές φορές κοντά στους μύς των αεραγωγών με πλούσιες χασματοσυνδέσεις. Σημαντικό τμήμα της νεύρωσης αποτελούν τα αδρενεργικά νεύρα, που στους βρόγχους γειτνιάζουν εξαιρετικά με τα ΛΜΚ, εφόσον μέσω της απελευθέρωσης ACh και των κοκκίων νοραδρεναλίνης τροποποιούν τη μυϊκή δραστηριότητα. Η υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών σχετίζεται με την παρουσία ουδετερόφιλων και μακροφάγων και την ενεργοποίηση των μαστοκυττάρων μεταξύ επιθηλίου και ΛΜΚ (Kalinin M.A. 1991).

Τα ΛΜΚ των αεραγωγών συσπώνται, πολλαπλασιάζονται, μεταναστεύουν και είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση ECM (εξωκυττάρια ουσίας), αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών-χημοκινών, ενώ η σύνδεση μεταξύ των είναι κυρίως με χασματοσυνδέσεις (gap junctions) και παρέχουν σημεία μηχανικής πρόσδεσης για συσταλτές πρωτεΐνες. Διαθέτουν φαινοτυπική ποικιλομορφία, εφόσον δεν είναι τελικά διαφοροποιημένα και πλαστικότητα στη σύσπαση και την έκτασή τους. Οι κυτταροκίνες που εκκρίνουν ρυθμίζουν τη σύσπαση-χάλαση μέσω GPCRs (G-protein coupled receptors). Παροδικά ρυθμίζουν τη διάμετρο του αυλού του αεραγωγού, ενώ χρόνια επάγουν δομική αναδιαμόρφωση με τελικό αποτέλεσμα ίνωση και υπερτροφία (Halayko and Amrani 2003).

Παράγοντες που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ είναι: η ινσουλίνη (μέσω του PI3K μονοπατιού), αυξητικοί παράγοντες και κυτταροκίνες όπως PDGF, FGF, VEGF, TGF-β και IL-1β μέσω MAPK και PI3K οδών (Stamatiou, Paraskeva et al. 2012).

Τα κύτταρα με συσταλτό φαινότυπο είναι επιμήκη και πλούσια σε πρωτεΐνες όπως η α-ακτίνη και η MHC (myosin heavy chain). Βρογχοσυσπαστικές ουσίες, φερ' ειπείν ισταμίνη συνδέονται σε GPCRs και προκαλούν ενεργοποίηση της PLP C (phospholipase C), που θα διασπάσει την 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP2) σε τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3) και διακυλογλυκερόλη (DAG). Ακολούθως, η IP3 οδηγεί σε απελευθέρωση του  $\text{Ca}^{2+}$  από το ενδοπλασματικό δίκτυο, που δεσμεύεται από την καλμοδουλίνη. Το σύμπλοκο που προκύπτει ενεργοποιεί την MLCK (myosin light chain kinase) που φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη μυοσίνη της ελαφριάς αλυσίδας με τελικό αποτέλεσμα τη σύσπαση (εικόνα 6) (Evans, Hardie et al. 2011).

Τα κύτταρα που μεταπίπτουν στον πολλαπλασιαστικό φαινότυπο διαθέτουν οργανίδια για τη σύνθεση πρωτεϊνών και λιπιδίων, λιγότερες πρωτεΐνες και πολλά μιτοχόνδρια. Επίσης, είναι πιο ευαίσθητα στην απόκριση σε βρογχοσυσταλτά ερεθίσματα και έχουν αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και έκκρισης μεσολαβητών. Η εναλλαγή από το συσταλτό στο συνθετικό φαινότυπο ονομάζεται αναδιαμόρφωση, ενώ το αντίθετο ωρίμανση, γεγονός που πραγματοποιείται με αναστολή πολλαπλασιασμού εξ' επαφής ή με παρατεταμένη στέρηση ορού *in vitro*. Επίσης, σε παρατεταμένη στέρηση ορού ενισχύεται η έκφραση του M3R μουσκαρινικού υποδοχέα στην επιφάνεια των κυττάρων. Η φαινοτυπική πλαστικότητα των ΛΜΚ (εικόνα 5) συμβάλλει στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών καθώς και στην παθοφυσιολογία των αναπνευστικών νόσων (Pelaia, Renda et al. 2008).



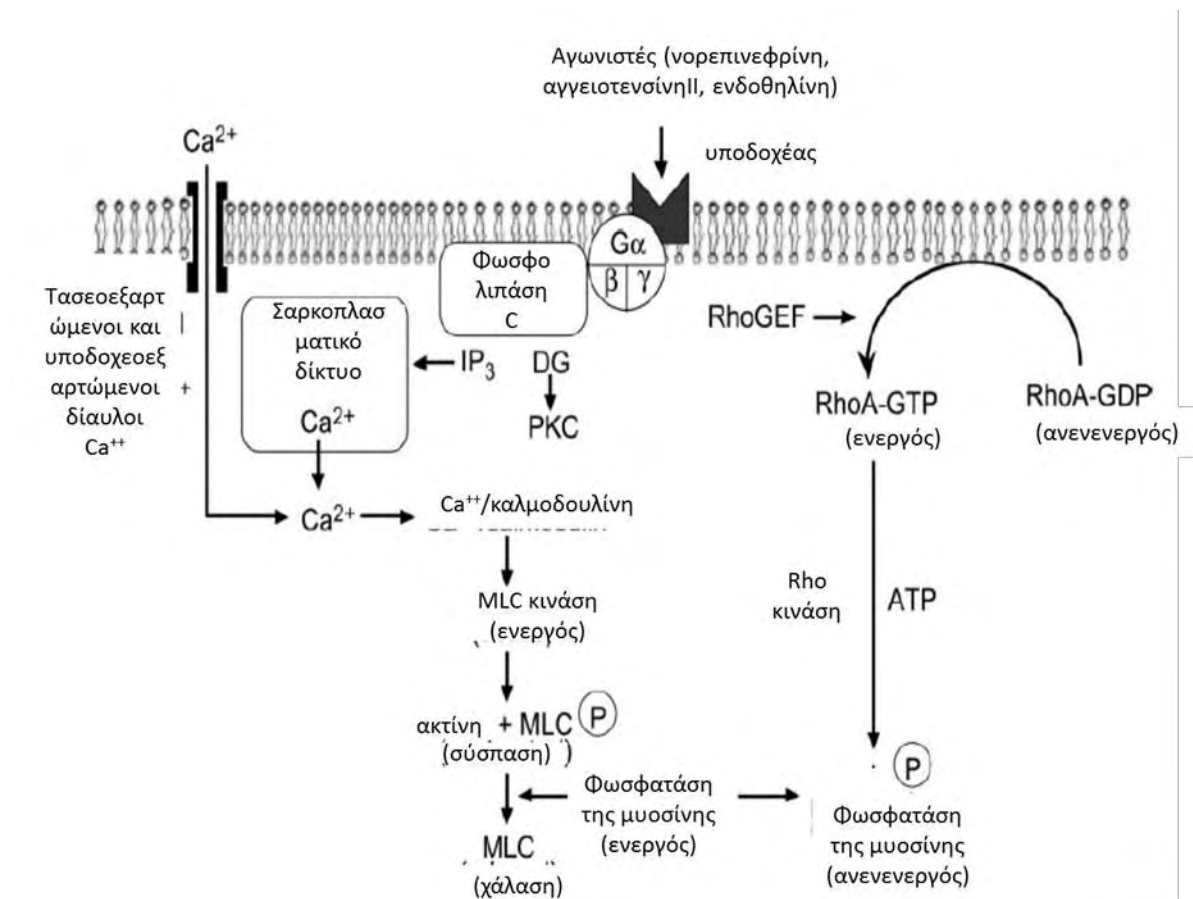
Εικόνα 5: Φαινοτυπική πλαστικότητα των ΛΜΚ των αεραγωγών. Ανατύπωση από (Halayko and Amrani 2003)

### 1.5.2. Σύσπαση των ΛΜΚΑ

Η συσπαστική ικανότητα είναι τόσο ευέλικτη όσο προσαρμοστικές είναι οι αλλαγές στο φορτίο και το μήκος του λείου μυός (Halayko and Amrani 2003). Η συστολή των ΛΜΚ επιτυγχάνεται μέσω: 1) του κλασσικού μηχανισμού συστολής, 2) του λειτουργικού ανταγωνισμού και 3) της ευαισθητοποίησης στο  $\text{Ca}^{++}$  (δρόμος μη εξαρτώμενος από το  $\text{Ca}^{++}$ ) (Lotvall J.). Όσον αφορά το μηχανισμό της σύσπασης, επί αυξημένου ασβεστίου ενδοκυττάρια, αυτό προσδένεται στην καλμοδουλίνη και ενεργοποιείται η MLCK (myosin light chain kinase), που φωσφορυλιώνει την αλαφρά αλυσίδα της μυοσίνης. Το ενδοκυττάριο ασβέστιο αυξάνεται, λόγω απελευθέρωσης από το σαρκοπλασματικό δίκτυο ή λόγω εισόδου από τον εξωκυττάριο χώρο μέσω ειδικών υποδοχέων  $\text{Ca}^{++}$ . Στο σαρκοπλασματικό δίκτυο των ΛΜΚ υπάρχουν διάλυτοι  $\text{IP}_3$  (αντίστοιχα με τους διαύλους ρυανοδίνης στους γραμμωτούς μυς και την καρδιά) και δύο είναι οι εναλλακτικές σηματοδοτικές οδοί: 1) της  $\text{IP}_3$ , 2) του cAMP (εικόνα 6). Οι Rho-GEFs (Rho-guanine nucleotide exchange factors) από την άλλη υποβοηθούν την ενεργοποίηση της RhoA και ρυθμίζουν τη διάρκεια και την ένταση της σηματοδότησης μέσω ετεροτριμερικών GPCR (G-protein coupled receptors), με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυττάρια  $\text{Ca}^{++}$  και τον πολυμερισμό ακτίνης και μυοσίνης για την επίτευξη “crossbridge cycling” (Noble, Pascoe et al. 2014). Η χάλαση, τελικά γίνεται μέσω ενεργοποίησης της MLCP (myosin light chain phosphatase) και της  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  ATPase για την είσοδο του ασβεστίου στο σαρκοπλασματικό δίκτυο. Σε έκταση του λείου μυός, η συσκευή σύσπασης αναδιατάσσεται και περισσότερα μόρια σύσπασης τίθενται σε σειρά, επιτρέποντας στον μυ να ξεκινήσει να παράγει δύναμη (Halayko and Amrani 2003).

Υπάρχει λειτουργικός ανταγωνισμός μεταξύ μουσκαρινικών και αδρενεργικών υποδοχέων. Μέσω του παρασυμπαθητικού οι M3 υποδοχείς ενέχονται στη βρογχοσύσπαση και μέσω του συμπαθητικού οι  $\beta_2$  αδρενεργικοί υποδοχείς ενέχονται στη χάλαση των ΛΜΚ των αεραγωγών. Κεντρικό ρόλο έχουν η CaM και η  $\text{IP}_3$  και η ευαισθητοποίηση στο  $\text{Ca}^{++}$  γίνεται μέσω της αύξησης των Rho κινάσων και της CPI-17 (που παίζει ρόλο στη φωσφορυλίωση της MLCK και MLCP), ενώ απουσιάζει η τροπονίνη (Webb 2003).

Νεότερος θεραπευτικός στόχος για την υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών στο άσθμα αποτελεί και η σηματοδότηση RhoA/Rho-κινάσης, όπως το fasudil (Y-27632) που αναστέλλει αυτές τις κινάσες και προκαλεί χάλαση των ΛΜΚ με εφαρμογή στην αντιϋπερτασική αγωγή, καθώς και η αναστολή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του ενδοκυττάρια ασβεστίου (Jude, Wylam et al. 2008, Chiba, Matsusue et al. 2010).



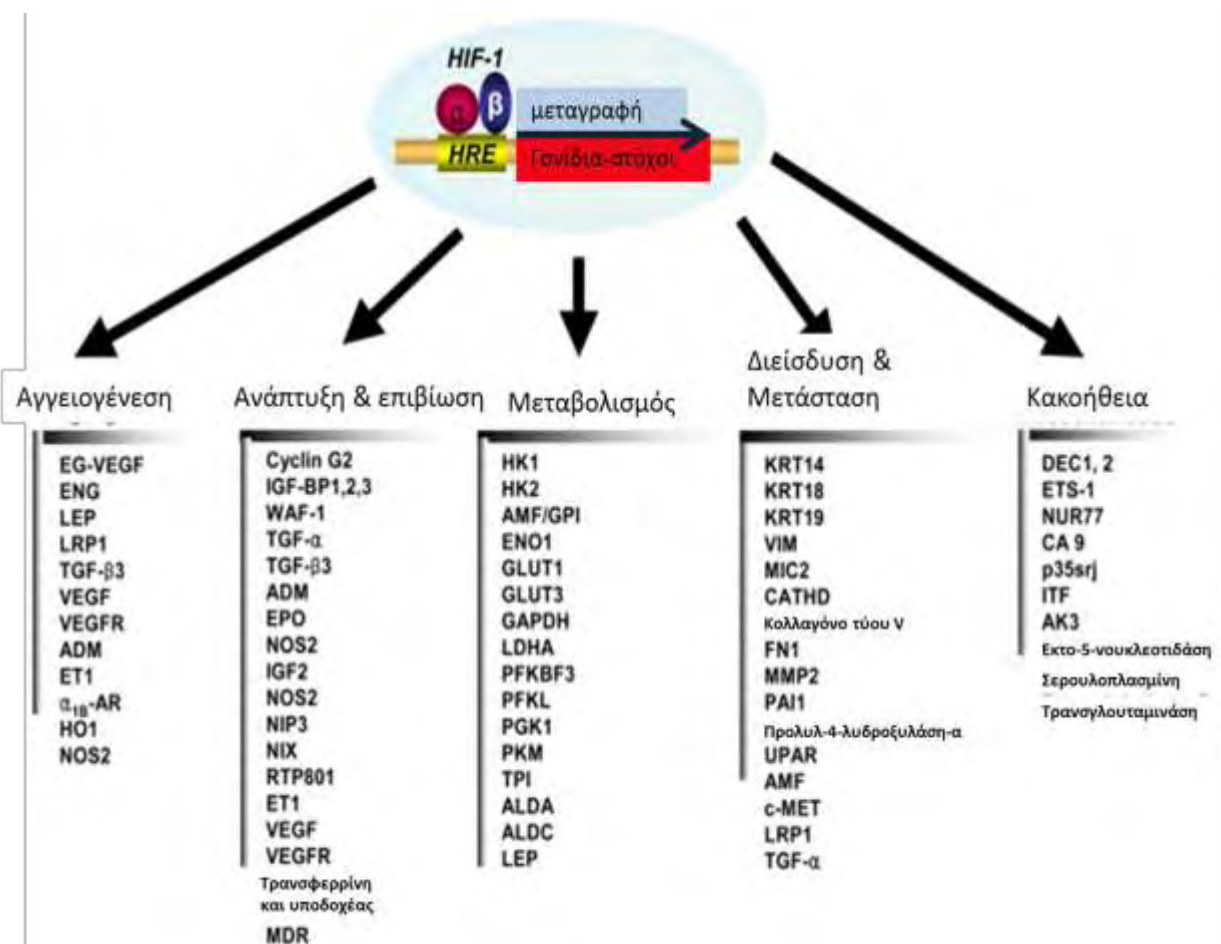
Εικόνα 6: Ρύθμιση σύσπασης ΑΜΚ. Ανατύπωση από (Webb 2003)

## 1.6. Υποξία και φλεγμονή στους αεραγωγούς

Η υποξία και η φλεγμονή είναι δύο αλληλεξαρτώμενες διαδικασίες, δηλαδή η υποξία μπορεί να προκαλέσει φλεγμονή αλλά και η φλεγμονή οδηγεί στη δημιουργία υποξίας. Για παράδειγμα, η παραμονή σε υψηλό υψόμετρο σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών μεσολαβητών. Επίσης, ποντίκια που εκτέθηκαν σε οξεία υποξία βρέθηκαν να έχουν αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών μεσολαβητών και συσσωρευμένα φλεγμονώδη κύτταρα στους πνεύμονες και σε άλλα όργανα. Αντίστοιχα, χαρακτηριστικές κλινικές περιπτώσεις που η υποξία συνοδεύεται από φλεγμονή είναι το πνευμονικό οίδημα και ο καρκίνος. Από την άλλη πλευρά, η φλεγμονή δημιουργεί υποξία στους τραυματισμένους ιστούς. Η υποξία προκύπτει λόγω της αύξησης των μεταβολικών απαιτήσεων των κυττάρων της φλεγμονής και από τον ενδοκυτταρικό πολλαπλασιασμό των παθογόνων μικροοργανισμών οι οποίοι καταναλώνουν οξυγόνο και ενέργεια και της ταυτόχρονης μείωσης της παροχής του οξυγόνου από την αγγειακή βλάβη στον τραυματισμένο ιστό (Eltzschig and Carmeliet 2011).

## 1.7. Η απόκριση των κυττάρων στην υποξία

Στους ανώτερους οργανισμούς το οξυγόνο χρησιμοποιείται ως τελικός αποδέκτης στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, μέσω της οποίας παράγεται το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας, που είναι απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού. Επιπλέον, τα κύτταρα με παρατεταμένη υποξία πεθαίνουν λόγω τοξικότητας από ROS. Κατά συνέπεια, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει ομοιοστατικούς μηχανισμούς που τους βοηθούν να ανταπεξέλθουν στις χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, κατάσταση που καλείται υποξία. Η υποξία παρατηρείται τόσο φυσιολογικά, όπως κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, τη λιπογένεση, την αιμοποίηση, την T-κυτταρική διαφοροποίηση ή την ανάβαση σε υψηλό υψόμετρο, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η φλεγμονή, η αιμορραγία, οι πνευμονοπάθειες και ο καρκίνος. Η υποξία μπορεί να είναι συνεχής ή διακοπτόμενη και μπορεί να είναι οξεία ή χρόνια (Semenza 2009).



Εικόνα 7: Γονίδια-στόχοι του HIF. Ανατύπωση από (Semenza 2010)

Ο ανθρώπινος οργανισμός διαχειρίζεται την υποξία μέσω της αύξησης του πνευμονικού αερισμού και της αποτελεσματικότερης αιμάτωσης των ιστών. Το καρωτιδικό σωματίο, το όργανο που αντιλαμβάνεται τις μεταβολές στην αρτηριακή pO<sub>2</sub> ενεργοποιεί το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, για να ρυθμίσει την καρδιακή παροχή και τον αερισμό. Τα αγγεία στην πνευμονική κυκλοφορία συστέλλονται για να ωθήσουν το οξυγονωμένο αίμα μακριά από τον

πνεύμονα, ενώ τα αγγεία της συστηματικής κυκλοφορίας διαστέλλονται, ώστε να δεχτούν περισσότερο αίμα. Ταυτόχρονα, αυξάνεται η ερυθροποίηση, ώστε να αυξηθεί η ποσότητα του οξυγόνου που θα μεταφέρεται στο αίμα. Σε επίπεδο ιστών, η απόκριση στην υποξία γίνεται μέσω της αγγειογένεσης, ενώ γίνεται και επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού μεταβαίνοντας από την οξειδωτική φωσφορυλίωση σε γλυκόλυση (Semenza 2010).

Οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες που μεσολαβούν στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία είναι οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIFs (Hypoxia Inducible Factors). Οι HIFs ελέγχουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της γλυκόζης και του σιδήρου, στην αγγειογένεση, στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων, αλλά και τη μετανάστευσή τους σε άλλους ιστούς (εικόνα 7) (Semenza 2010).

Επιπρόσθετα, η απόκριση στην υποξία επιδέχεται και επιγενετική ρύθμιση. Συστημικές και περιβαλλοντικές παρεμβολές στα επίπεδα οξυγόνου στην πρώιμη νεογνική περίοδο (π.χ. διαλείπουσα υποξία) επηρεάζουν το καρωτιδικό σωματίο και την απόκρισή του στην υποξία στην ενήλικη ζωή. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί αφορούν κληρονομήσιμες τροποποιήσεις στο DNA που δεν ενέχουν αλλαγές στην πρώιμη αλληλουχία του DNA. Τρεις καλά μελετημένοι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι: τα siRNAs (small interfering RNA), η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις ιστονών (π.χ. ακετυλίωση-αποακετυλίωση). Από αυτές η DNA μεθυλίωση σχετίζεται με τον αναπτυξιακό προγραμματισμό μεσολαβώντας στη γονιδιακή έκφραση. Η αντίδραση καταλύεται από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs) και περιλαμβάνει την 5' τοποθέτηση της C του CpG δινουκλεοτιδίου στο γονιδιακό προμότορα, που αποκαλούνται "CpG" νησίδια. Γενικά, η υπερμεθυλίωση οδηγεί σε καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, ενώ η υπομεθυλίωση σε μεταγραφική ενεργοποίηση. Έτσι λοιπόν, σε ποντικούς που είχαν εκτεθεί στη νεογνική τους περίοδο σε διαλείπουσα ισχαιμία, η θεραπεία με δεσιταμπίνη (αναστολέα DNMTs) έδειξε ότι περιορίστηκε η υπερμεθυλίωση των CpG δινουκλεοτιδίων στο *sod2* γονίδιο (δισμουτάση του υπεροξειδίου), επιδιορθώθηκε το οξειδωτικό stress μειώνοντας την έκφραση των αντιοξειδωτικών γονιδίων και έγινε πρόληψη της υπερευαισθησίας του καρωτιδικού σωματίου με εκδήλωση φυσιολογικής καρδιοαναπνευστικής λειτουργίας (Prabhakar 2013).

### **1.8. Οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIFs**

Οι HIFs είναι ετεροδιμερείς μεταγραφικοί παράγοντες που ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών bHLH – PAS (basic Helix-Loop-Helix – Per-ARNT-Sim). Αποτελούνται από μία α υπομονάδα, η έκφραση και δράση της οποίας ρυθμίζεται από τα επίπεδα οξυγόνου και μία β υπομονάδα, η οποία εκφράζεται συνεχώς. Οι υπομονάδες του HIF μεταφέρονται στον πυρήνα όπου συνδέονται με συντηρημένες αλληλουχίες DNA (RCGTC), στα στοιχεία απόκρισης της υποξίας HRE (hypoxia response elements) που βρίσκονται στις ρυθμιστικές περιοχές και σε

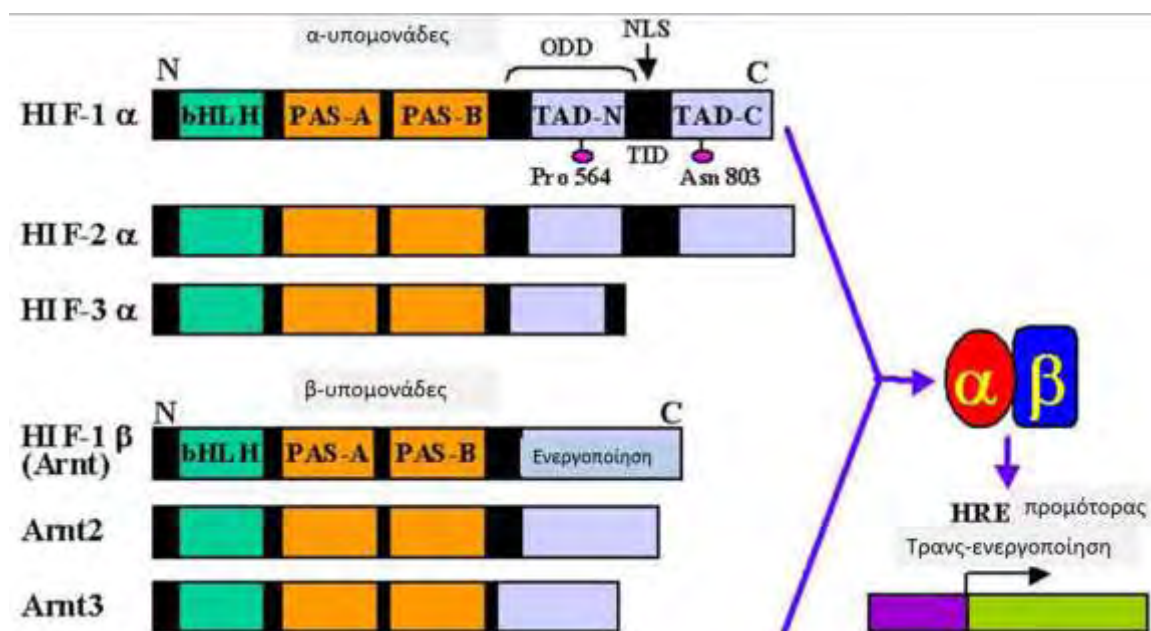
υποκινητές γονιδίων, η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από την υποξία (Majmundar, Wong et al. 2010).

Η υπομονάδα HIF-1 $\beta$  αποτελείται από 879 αμινοξέα και είναι γνωστή και ως ARNT (Aryl hydrocarbon Nuclear Translocator) που διμερίζεται με τον υποδοχέα AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor) ώστε να σχηματιστεί ο λειτουργικός υποδοχέας της διοξίνης. Η υπομονάδα αυτή εκφράζεται συνεχώς και δεν υπόκειται σε ρύθμιση από τη συγκέντρωση του οξυγόνου, αν και υπάρχουν πρόσφατα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η συγκέντρωση του ARNT ρυθμίζεται τόσο από την υποξία όσο και από μιμητικά-υποξικά ερεθίσματα σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (Wolff M. 2013).

Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές της  $\alpha$  υπομονάδας: οι HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  και HIF-3 $\alpha$  (εικόνα 8). Ο HIF-1 $\alpha$  εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα, είναι ο κύριος ρυθμιστής της υποξίας, αποτελείται από 826 αμινοξέα και τα επίπεδά του αυξάνουν σε χαμηλή ενδοκυττάρια συγκέντρωση οξυγόνου. Στο αμινοτελικό άκρο, ο HIF-1 $\alpha$  φέρει τις περιοχές bHLH – PAS, ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο περιέχει δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (transactivation domains, TAD). Η περιοχή N-TAD βρίσκεται μεταξύ των καταλοίπων 531-575 και η περιοχή C-TAD μεταξύ των καταλοίπων 813-826. Οι περιοχές αυτές είναι υπεύθυνες για τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του HIF-1 και τη δέσμευσή του με συνενεργοποιητές, όπως τους p300/CBP και Ref-1. Επίσης ο HIF-1 $\alpha$  φέρει στο καρβοξυτελικό του άκρο και την περιοχή ODD (oxygen-dependent-degradation-domain) μεταξύ των καταλοίπων 401-603 που είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμησή του σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Ο HIF-1 $\alpha$  αρνητικός ομόζυγος γονότυπος δεν είναι συμβατός με τη ζωή, ενώ ο ετερόζυγος εκδηλώνει διαταραγμένη απόκριση στην υποξία (Prabhakar and Semenza 2012).

Ο HIF-2 $\alpha$  έχει παρόμοια αλληλουχία με τον HIF-1 $\alpha$ , με 48% ομοιότητα στα αμινοξικά κατάλοιπα. Ετεροδιμερίζεται κι αυτός με τον ARNT και μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση γονιδίων που φέρουν HRE. Υπάρχουν αρκετά γονίδια που ενεργοποιούνται μόνο από HIF-2, κυρίως γονίδια που κωδικοποιούν δείκτες αρχέγονων κυττάρων (NANOG, OCT4/POU5F1) σε ανθρώπινα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (Prabhakar and Semenza 2012).

Ο ρόλος του HIF-3 $\alpha$  αντίθετα, είναι λιγότερο κατανοητός, αλλά φαίνεται να αλληλεπιδρά και αυτός με τον ARNT και να δεσμεύεται σε HRE στοιχεία. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το εναλλακτικό μάτισμα του HIF-3 $\alpha$ , από το οποίο προκύπτει η ανασταλτική πρωτεΐνη IPAS (inhibitory PAS domain protein), η οποία αλληλεπιδρά με τον HIF-1 $\alpha$  στο αμινοτελικό άκρο, αποτρέποντας τη δέσμευσή του στο DNA και λειτουργώντας ως βρόγχος αρνητικής ανάδρασης (Prabhakar and Semenza 2012).



Εικόνα 8: Οι υπομονάδες του HIF. Ανατύπωση από (Brat, Kaur et al. 2003)

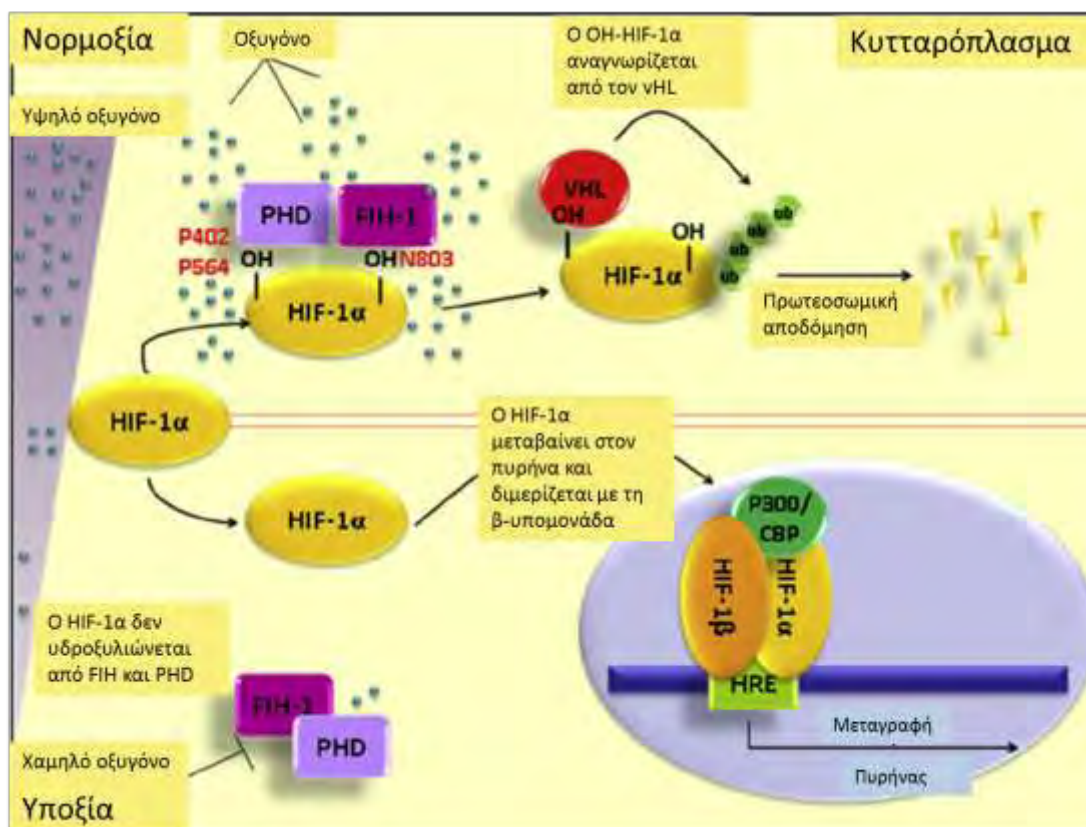
## 1.9. Η ρύθμιση του HIF-1α

### 1.9.1 Η ρύθμιση του HIF-1α από το O<sub>2</sub>.

Σε φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου 21%, ο HIF-1α έχει μικρό χρόνο ημιζωής (περίπου 5 λεπτά). Αν και μεταγράφεται και μεταφράζεται συνεχώς, η πρωτεΐνη HIF-1α, δεν είναι ανιχνεύσιμη, λόγω της ταχείας αποικοδόμησής της στο πρωτεάσωμα. Συγκεκριμένα, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται στα κατάλοιπα προλίνης Pro402 και Pro564, που βρίσκονται εντός της ODD περιοχής, από ειδικές προλυλ-υδροξυλάσες (prolyl-4-hydroxylase domain proteins PHDs), οι οποίες λειτουργούν ως αισθητήρες οξυγόνου του κυττάρου. Οι PHDs είναι μέλη της υπεροικογένειας των διοξυγενασών και στον άνθρωπο υπάρχουν 3 ισομορφές: PHD1, PHD2 και PHD3. Οι PHDs απαιτούν οξυγόνο ως υπόστρωμα για την υδροξυλίωση της προλίνης σε υδροξυπρολίνη και τους συμπαράγοντες ασκορβικό οξύ και σίδηρο. Με το οξυγόνο ως υπόστρωμα, οι PHDs υδροξυλιώνουν τον HIF-1α, με συνέπεια να αναγνωρίζεται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη von Hippel-Lindau (pVHL) και να προσδένεται σ' αυτή. Πρόσδεση της pVHL στο HIF-1α σηματοδοτεί την ουβικουιτινίωσή του από το σύμπλοκο E<sub>3</sub> λιγάσης και την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα 26S, σε συνθήκες νορμοξίας (Acker and Plate 2004, Semenza 2012) (εικόνα 9). Επιπλέον, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται σε ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης (Asn803) που βρίσκεται εντός της C-TAD περιοχής από την ανασταλτική πρωτεΐνη FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1) και η υδροξυλίωση αυτή εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τους συνενεργοποιητές CBP/p300. Η πρωτεΐνη FIH-1 ανήκει στην οικογένεια των



δεοξυγενασών όπως και οι PHDs και απαιτεί ως συμπαραγόντες ασκορβικό οξύ και σίδηρο, ενώ αναστέλλει ταυτόχρονα τις υδροξυλάσες (Lando, Peet et al. 2002).



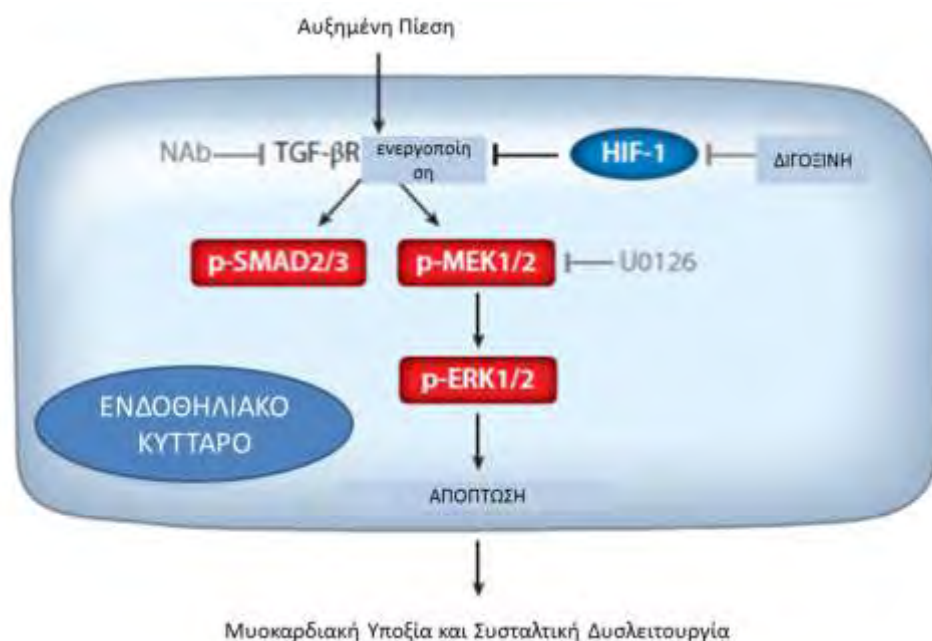
Εικόνα 9: Η ρύθμιση του HIF-1α από το οξυγόνο. Ανατύπωση από (Borsi, Terragna et al. 2015).

### 1.9.2 Η ρύθμιση του HIF-1α ανεξάρτητα από το O<sub>2</sub>.

Εκτός από τη ρύθμιση σε συνθήκες υποξίας, τα επίπεδα του HIF-1α ρυθμίζονται σε φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου από διάφορους μηχανισμούς, οι οποίοι επηρεάζουν τη σταθερότητα του HIF-1α, τη μεταγραφή και τη μετάφραση του HIF-1α mRNA. Πολλοί φαρμακολογικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται για την αναστολή του HIF-1. Σε συνθήκες νορμοξίας, αναστολείς των PHDs, όπως το DMOG (dimethyloxalylglycine) που είναι ανάλογο του ακετογλουταρικού και η DFX (desferrioxamine) που χρησιμοποιείται στη θεραπεία αποσιδήρωσης, δεσμεύει το Fe<sup>2+</sup> που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο των PHDs. Με τον τελευταίο μηχανισμό δρουν επίσης και τα μέταλλα κοβάλτιο και νικέλιο, τα οποία χρησιμοποιούνται ερευνητικά (Semenza 2010).

Ο HIF-1α επάγεται σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου από αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, ορμόνες όπως αγγειοτενσίνη II και θρομβίνη, αλλά και ιικές πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, ο TNF-α και η IL-β αυξάνουν τη μεταγραφή ή τη μετάφραση του HIF-1α mRNA. Ας πάρουμε για παράδειγμα τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του μυοκαρδίου. Οι

μεταβολές στις αγγειακές αντιστάσεις λόγω συστηματικής υπέρτασης επηρεάζουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα TGF- $\beta$  υποδοχέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κανονικής οδού μέσω της φωσφορυλίωσης των SMAD2/3 και της μη κανονικής οδού, μέσω της φωσφορυλίωσης πρώτα των MEK1/2 και στη συνέχεια των ERK1/2 κινασών, που έχει ως αποτέλεσμα την απόπτωση και σε συστηματικό επίπεδο την καρδιακή ανεπάρκεια (εικόνα 10). Η Διγοξίνη που χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη, αναστέλλει τη συσσώρευση του HIF-1 $\alpha$ , ενώ η ακριφλαβίνη μπλοκάρει το διμερισμό του. Ανοσοκατασταλτικά όπως αναστολείς καλσινευρίνης και αναστολείς του mTOR ασκούν επίσης ανασταλτική δράση στον HIF (Semenza 2010).



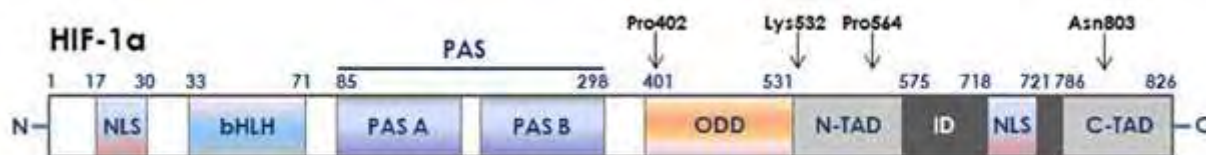
Εικόνα 10: Σηματοδοτικά μονοπάτια HIF-1 $\alpha$  σε Κ.Α. οφειλόμενη σε συστηματική υπέρταση. Ανατύπωση από (Semenza 2010).

Πέρα από το ενδοθήλιο είναι ενδιαφέρον ότι στα ΛΜΚΑ ο TNF- $\alpha$  αυξάνει τη μεταγραφή του HIF-1 $\alpha$  mRNA μέσω της ενεργοποίησης του NF- $\kappa$ B αλλά παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1 $\alpha$  με τον ARNT μειώνοντας τη μεταγραφική δράση του HIF-1 (Tsapournioti, Mylonis et al. 2013).

### 1.10. Η ρύθμιση εισόδου του HIF-1 $\alpha$ στον πυρήνα

Η είσοδος του HIF-1 $\alpha$  στον πυρήνα είναι απαραίτητο βήμα για το σχηματισμό του λειτουργικού διμερούς HIF-1 $\alpha$  /ARNT και την αλληλεπίδραση με τα HRE στοιχεία. Η μετατόπιση του HIF-1 $\alpha$  στον πυρήνα γίνεται μέσω των πυρηνικών πόρων και ρυθμίζεται από τους υποδοχείς πυρηνικής μεταφοράς που ανήκουν στην οικογένεια των ιμπορτινών- $\beta$ . Έχουν εντοπιστεί δύο αλληλουχίες

του HIF-1α που έχουν ομολογία με σήματα πυρηνικού εντοπισμού NLS, μία στο αμινοτελικό άκρο και μία στο καρβοξυτελικό άκρο που αποτελείται από δύο αλληλουχίες βασικών αμινοξέων (bipartite NLS) (εικόνα 11) (Luo and Shibuya 2001).



Εικόνα 11: Απεικόνιση των σημάτων πυρηνικού εντοπισμού του HIF-1α. Ανατύπωση από (Hu, Liu et al. 2013).

Το NLS στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την ιμφορτίνη α και ειδικότερα με τις ισομορφές α1, α3, α5 και α7. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές προωθούν την είσοδό του στον πυρήνα μέσω του συμπλόκου α/β ιμφορτινών (Depping, Steinhoff et al. 2008). Επίσης, ο HIF-1α αλληλεπιδρά επιπλέον με τις ιμφορτίνες 4 και 7 στην αμινοτελική bHLH-PAS περιοχή του, η οποία είναι υπεύθυνη για τον ετεροδιμερισμό με τον ARNT και τη δέσμευση στο DNA. Η αλληλεπίδραση αυτή συνεπάγεται ότι η είσοδος στον πυρήνα και η απελευθέρωση του HIF-1α θα ολοκληρωθεί, όταν ο HIF-1α θα συναντήσει τον ARNT ή θα προσδεθεί στα HREs (Chachami, Paraskeva et al. 2009).

### 1.11. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α

Εκτός από την υδροξυλίωση στις προλίνες 402 και 564 από τις PHDs και στην ασπαραγίνη 803 από την FIH, που έχουν συζητηθεί παραπάνω, ο HIF-1α υπόκειται σε μία σειρά άλλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, μεταξύ των οποίων ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, σουμιοϋλίωση και S-νιτροζυλίωση, οι οποίες ρυθμίζουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα και τη δράση του. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι:

Ο HIF-1α ακετυλιώνεται από την ακετυλοτρανσφεράση ARD1 (Arrest Defective-1 protein) σε λυσίνη που εντοπίζεται στη θέση 532. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί την αλληλεπίδραση με την pVHL με επακόλουθο την αποικοδόμηση του HIF-1α στο πρωτεάσωμα. Δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για το αν η ARD1 υπόκειται σε ρύθμιση από το οξυγόνο, καθώς έχει αναφερθεί μείωση της ακετυλίωσης του HIF-1α στην υποξία λόγω μείωσης των επιπέδων mRNA της ARD1 (Jeong, Bae et al. 2002).

Ο HIF-1α είναι στόχος φωσφορυλίωσης τόσο σε συνθήκες υποξίας όσο και σε συνθήκες νορμοξίας. Οι κινάσες ERK1/2 φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α στα κατάλοιπα σερίνης 641 και 643. Η φωσφορυλίωση αυτή εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την εξαπορτίνη

CRM1 και την εξαγωγή του στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα την πυρηνική συσσώρευση του HIF-1α και την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας (Mylonis, Chachami et al. 2008). Επίσης, ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από την CK1δ στη σερίνη 247, στην αμινοτελική περιοχή σύνδεσης με τον ARNT. Η συγκεκριμένη φωσφορυλίωση οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του διμερούς HIF-1α /ARNT μειώνοντας κατ' αυτό τον τρόπο τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 (Kalousi, Mylonis et al. 2010). Μία ακόμη σημαντική φωσφορυλίωση του HIF-1α είναι από την GSK-3 στην N-TAD περιοχή σε κατάλοιπο σερίνης 9 του HIF-1α, που φαίνεται να οδηγεί τον HIF-1α σε αποικοδόμηση μέσω της αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη VHL (Flugel, Gorlach et al. 2007).

Ο HIF-1α συνδέεται ομοιοπολικά με τις πρωτεΐνες SUMO (small ubiquitin like modifier). Οι SUMO αποτελούν μία οικογένεια πρωτεϊνών, οι οποίες προστατεύουν τις πρωτεΐνες-στόχους από ουβικουιτινίωση. Ο HIF-1α διαθέτει 2 θέσεις σουμυλίωσης στις λυσίνες 391 και 477 μέσω των οποίων συνδέεται η πρωτεΐνη SUMO 1. Φαίνεται ότι η σουμυλίωση πραγματοποιείται από την RanBP2 E3 λιγάση που βρίσκεται από την κυτταροπλασματική πλευρά του πυρηνικού πόρου. Η τροποποίηση αυτή δεν έχει διευκρινισθεί αν συντελεί στη μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-1α ή αν επιφέρει αρνητική ρύθμιση (Bae SH 2004).

Μία ακόμη τροποποίηση που πραγματοποιείται στον HIF-1α είναι η S-νιτροζυλίωση. Στην S-νιτροζυλίωση πραγματοποιείται ομοιοπολική σύνδεση μίας ομάδας μονοξειδίου του αζώτου (NO) στην πλευρική αλυσίδα της κυστεΐνης, συμβάλλοντας στη μετα-μεταφραστική ρύθμιση των πρωτεϊνών. Ο HIF-1α νιτροζυλιώνεται στα κατάλοιπα κυστεΐνης 533 και 800 με αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητάς του (Sha Y 2012). Συγκεκριμένα, η νιτροζυλίωση στο κατάλοιπο κυστεΐνης 533, που βρίσκεται εντός της περιοχής ODD, οδηγεί σε σταθεροποίηση του HIF-1α μέσω της αναστολής της πρόσδεσης της pVHL, (Li F 2007) ενώ η νιτροζυλίωση στο κατάλοιπο 800, που βρίσκεται στην περιοχή C-TAD, διευκολύνει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον συνενεργοποιητή p300/CREB (Yasinka IM 2003).

### **1.12. Η αλληλεπίδραση του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες.**

Η ενεργότητα του HIF-1α επηρεάζεται και από την αλληλεπίδρασή του με άλλες πρωτεΐνες. Παρακάτω παρατίθενται οι κυριότερες από αυτές:

Όπως προαναφέρθηκε, η αλληλεπίδραση του HIF-1α με το συνενεργοποιητή p300 οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητάς του. Ο HIF-1α αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη p300 μέσω της C-TAD περιοχής σε συνθήκες υποξίας. Σε συνθήκες νορμοξίας, η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την p300 αναστέλλεται εξαιτίας της υδροξυλίωσης της ασπαραγίνης στη θέση 803 (Bardos JI 2005). Η αλληλεπίδραση με την p300 ενισχύεται περαιτέρω από αναστολείς της υδροξυλίωσης και S-νιτροζυλίωσης του HIF-1α. Επίσης, οι μεταγραφικοί ρυθμιστές

CTED2/CTED4, που συνδέονται στο συνενεργοποιητή p300 αναστέλλουν την αλληλεπίδραση HIF-1α/p300 και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Επιπλέον, η έκφραση της CTED2 επάγεται από την υποξία και ίσως λειτουργεί ως ρυθμιστής της ενεργότητας του HIF-1α (Yoon H. 2011).

Το υποξικό στρες προκαλεί συσσώρευση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53, η οποία μπορεί να δεσμευθεί στον HIF-1α και να προκαλέσει μείωση της μεταγραφικής ενεργότητάς του. Τόσο ο HIF-1α όσο και η p53 αλληλεπιδρούν με το συνενεργοποιητή p300. Ωστόσο η έκφραση της p300 δεν μπορεί να αντιστρέψει την αναστολή του HIF-1α που μεσολαβείται από την p53, ενώ είναι απαραίτητη η πρόσδεση της p53 στον p300 για την αναστολή του HIF-1α (Bardos JI 2005).

Η Hsp90 είναι μοριακή συνοδός, που βοηθά κατά κύριο λόγο τις πρωτεΐνες να αναδιπλωθούν σωστά. Η Hsp90 προσδένεται στο HIF-1α μέσω της PAS περιοχής σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας. Η αναστολή της Hsp90 οδηγεί σε μειωμένη συσσώρευση του HIF-1α και παρεμπόδιση της σύνδεσής του στο DNA υπό συνθήκες υποξίας. Η Hsp90 προστατεύει τον HIF-1α από μη ειδική αποικοδόμηση ανεξάρτητα από την pVHL, αφού αναστολείς της Hsp90 προκαλούν ουβικουιτινίωση και αποικοδόμηση του HIF-1α ακόμη κι όταν η pVHL απουσιάζει από τα κύτταρα. Η Hsp90 ανταγωνίζεται τον ARNT για τις θέσεις σύνδεσης στον HIF-1α. Στον πυρήνα, οι υψηλές συγκεντρώσεις του ARNT εκτοπίζουν την Hsp90 από την PAS περιοχή με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του HIF-1 (Bardos JI 2005).

Η πρωτεΐνη Myc είναι μεταγραφικός παράγοντας που ελέγχει τη μετάβαση G1/S του κυτταρικού κύκλου σχηματίζοντας ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη MAX. Σε φυσιολογικές συνθήκες η Myc αλληλεπιδρά με το μεταγραφικό παράγοντα SP1 επάγοντας την έκφραση του γονιδίου κυκλίνης D (Podar K. 2010). Σε συνθήκες υποξίας, η έκφραση του HIF-1α αυξάνεται με αποτέλεσμα ο HIF-1α να ανταγωνίζεται την Myc για την αλληλεπίδραση με τον SP1. Η πρόσδεση του HIF-1α με τον SP1 οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού. Ωστόσο σε καρκινικά κύτταρα η Myc υπερεκφράζεται. Η υπερέκφραση της Myc οδηγεί σε συνεργασία με τον HIF-1α στο συνεχή πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε μειωμένα επίπεδα οξυγόνου (Doe MR 2012).

### **1.13. Η κλινική σημασία των HIFs.**

Συνοπτικά, οι HIFs κατέχουν προστατευτικό ρόλο στη στεφανιαία νόσο, ισχαιμία του μυοκαρδίου, ισχαιμία μέλους, περιφερική αρτηριακή νόσο, καρδιακή ανεπάρκεια, επούλωση τραύματος, ΣΔ II αγγειοπάθεια και συμμετέχουν στην παθογένεση της πνευμονικής υπέρτασης, της αρτηριακής υπέρτασης, της υπνικής άπνοιας, της οφθαλμικής νεοαγγείωσης, της

κληρονομικής ερυθροκυττάρωσης, της χρόνιας απόρριψης μοσχεύματος και του καρκίνου (Semenza 2014).

Μία από τις επαναστατικές μεθόδους θεραπείας που αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα αξιοποίησης του HIF στην θεραπευτική είναι και το “preconditioning phenomenon”, όπου το μυοκάρδιο εκτίθεται σε μικρές περιόδους ισχαιμίας (5 λεπτών) και ακολουθούν μικρές περίοδοι επανάρδευσης, με σκοπό την προστασία του μυοκαρδίου από παρατεταμένα επεισόδια ισχαιμίας (30 λεπτών). Ο HIF-1 ενεργοποιεί γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που δίνουν την αδενοσίνη, τον κύριο επαγωγέα του preconditioning, που βοηθά στην επιβίωση του ενδοθηλίου και του μυοκαρδίου μέσω ενεργοποίησης των A2BAR υποδοχέων αδενοσίνης. Δημοφιλής όμως είναι και η αναστολή της δράσης του HIF θεραπευτικά (πίνακας 2).

ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΣΕ	ΦΑΡΜΑΚΑ
Πρωτεϊνική σύνθεση του HIF-1α	Καρδιακές γλυκοσίδες, ραπαμυκίνη, τοποτεκάνη, 2-μεθόξυ-οιστραδιόλη
Σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του HIF-1α	LAQ824, 17-AAG, YC-1, κυκλοσπορίνη
Ετεροδιμερισμό	Ακριφλαβίνη
Πρόσδεση του HIF-1α στο DNA	Δοξορουβικίνη, Εχινόμυκίνη
Μεταενεργοποίηση	Bortezomib, Amf. B
Σηματοδότηση	Imatinib, Ibuprofen, Erlotinib, Gefitinib, Trastuzumab

*Πίνακας 2: Φάρμακα που δρουν ανασταλτικά στη δράση του HIF-1α. Ανατύπωση από (Semenza 2014).*

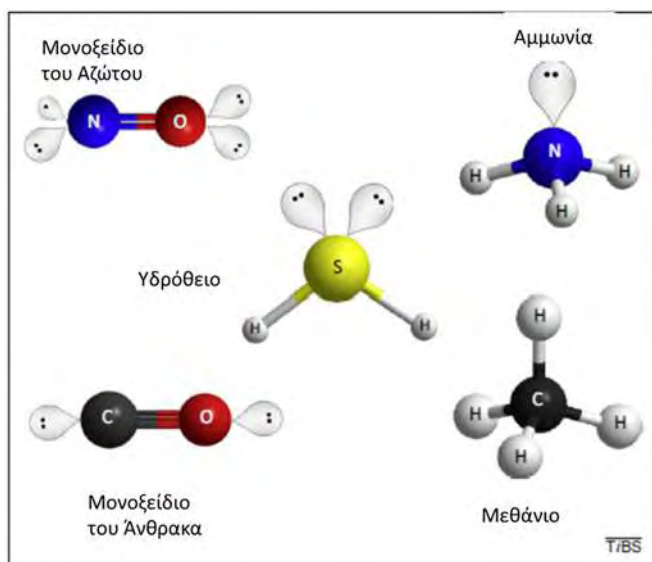
Στον καρκίνο, είναι γεγονός ότι υπάρχουν πολλές υποξικές περιοχές. Ένας πραγματικός κίνδυνος είναι ότι με επαγωγή της υποξίας από οποιαδήποτε αιτία (φάρμακα, κυτταροκίνες, δραστηριότητα ογκογονιδίων) ενέχει την αύξηση της πιθανότητας μετάστασης των καρκινικών κυττάρων, καθώς και της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα συνήθη χημειοθεραπευτικά. Τεράστια σημασία αποκτά επομένως στη σύγχρονη ογκολογία η αναστολή της δράσης του HIF (Semenza 2014).

#### 1.14. Το H<sub>2</sub>S ως αεροδιαβιβαστής

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αποδοθεί τα τελευταία χρόνια σε μικρά μόρια αεροδιαβιβαστές που φαίνεται ότι είναι συντηρημένα μέσω της εξέλιξης και εμπλέκονται σε ποικίλες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες. Οι τρεις δημοφιλέστεροι είναι το NO (μονοξείδιο του



αζώτου), το CO (μονοξείδιο του άνθρακα) και το H<sub>2</sub>S (υδρόθειο), ενώ έδαφος κερδίζουν η αμμωνία και το μεθάνιο. Το NO προκύπτει από την L-αργινίνη και είναι γνωστό ως EDRF (endothelium-derived relaxing factor) και το CO είναι προϊόν του μεταβολισμού της αίμης και έχει παρόμοια δράση (Wang 2014). Άλλοι εκτιμώμενοι υποψήφιοι αέριοι διαβιβαστές είναι η αμμωνία, το μεθάνιο και το υδρογόνο (εικόνα 12).



Εικόνα 12: Μοριακά μοντέλα αεροδιαβιβαστών. Ανατύπωση από (Wang 2014).

Το H<sub>2</sub>S είναι ένα άχρωμο, αέριο, υδατοδιαλυτό και λιπόφιλο μόριο που βρίσκεται σε διαρροή λυμάτων, γαστρεντερικά βακτήρια, βάλτους, χαλασμένα αυγά, στην κοπριά, στην κατασκευή υγροτόπων, πολτού και χαρτιού, στη βυρσοδεψία και στα ηφαίστεια, ενώ διαθέτει χαρακτηριστική αποκρουστική μυρωδιά. Ο χρόνος ημιζωής του σε διαλύματα είναι <5 λεπτά, η διαλυτότητά του αυξάνει σε χαμηλή θερμοκρασία, σε όξινο pH είναι πιο σταθερό και ανιχνεύεται στα 230nm φασματοσκοπικά, σε αποξυγονωμένο νερό (Hughes, Centelles et al. 2009). Έκθεση του ανθρώπου σε πάνω από 1000ppm μπορεί να προκαλέσει απώλεια συνείδησης, οσφρητική παράλυση, αναπνευστική παράλυση και θάνατο, μέσω αναστολής του κυτοχρώματος c. Έκθεση σε 10-500ppm προκαλεί βλεννογονικό ερεθισμό, ρινίτιδα, πνευμονικό οίδημα, βρογχολίτιδα, διάμεση πνευμονική ίνωση και οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια. Αρχικά, θεωρούνταν παραπροϊόν μεταβολικών διεργασιών από βακτήρια και αρχαία και μάλιστα τοξικό μέχρι την ανακάλυψη το 1989 που πρωτομετρήθηκε στον εγκέφαλο, ότι διαθέτει ρυθμιστικό ρόλο στον αγγειακό τόνο και κυτταροπροστατευτικό ρόλο. Σε αντίθεση με άλλους διαβιβαστές δεν αποθηκεύεται σε κυστίδια, αλλά εμφανίζεται με πολλές μορφές. Η συγκέντρωσή του στον ορό είναι περίπου 50μM, ενώ στον εγκέφαλο κυμαίνεται μεταξύ 50 και 160μM. Έχει μεγάλη συγγένεια για την αιμοσφαιρίνη και εξαιρετικά μικρό χρόνο ημιζωής (12-37h στον αέρα) (Chen and Wang 2012).

<b>Κριτήρια κατάταξης για αεροδιαβιβαστές:</b>	
1.	Μικρά αέρια μόρια, διαλυτά στο βιολογικό περιβάλλον
2.	Ελεύθερα διαπερατά στις μεμβράνες, μη εξαρτώμενα από υποδοχείς ή μεταφορείς
3.	Παράγονται ενδογενώς στα θηλαστικά με συγκεκριμένα υποστρώματα και ένζυμα. Δεν είναι μόνο μεταβολικά προϊόντα και η παραγωγή τους ρυθμίζεται προς χάριν σηματοδοτικών λειτουργιών.
4.	Έχουν σαφώς οριζόμενες λειτουργίες σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις.
5.	Οι λειτουργίες των ενδογενών αερίων μπορούν να μιμηθούν από εξωγενώς χορηγούμενες ομόλογες ουσίες.
6.	Εμπλέκονται στη σηματοδότηση και έχουν σαφείς κυτταρικούς και μοριακούς στόχους.

*Πίνακας 3: Απαιτούμενα κριτήρια για τον ορισμό ενός αέριου διαβιβαστή. Ανατύπωση από (Wang 2014).*

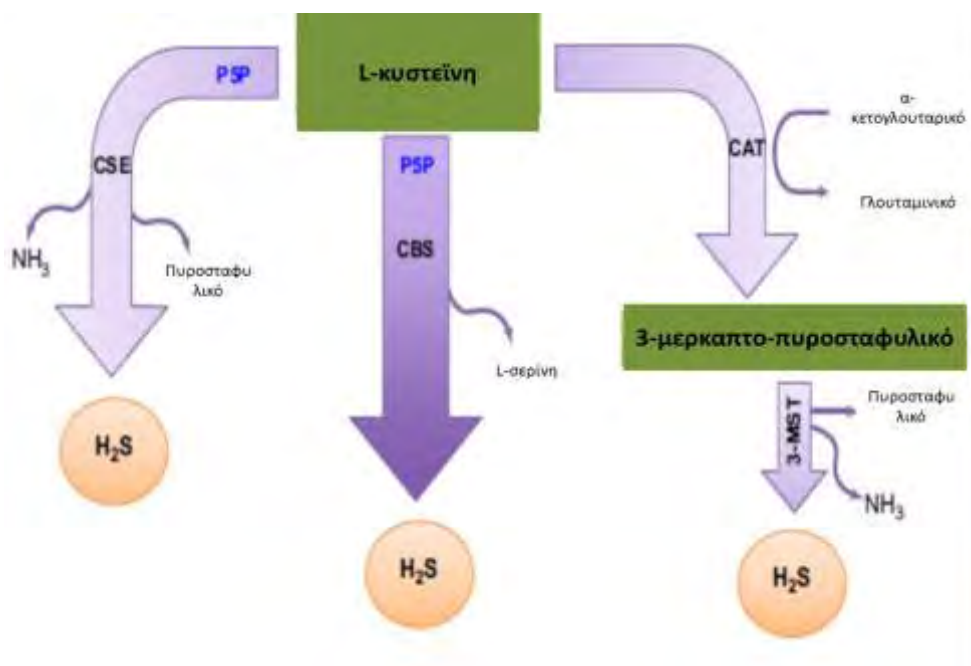
### **1.15. Ένζυμα παραγωγής και Αναστολείς του H<sub>2</sub>S**

Τρία ένζυμα παράγουν H<sub>2</sub>S από L-κυστεΐνη με ανεξάρτητες αντιδράσεις: η CSE (cystathione-γ-lyase), η CBS (cystathione-β-synthase) και η 3-MST (θειοτρανσφεράση του 3-μερκαπτοपुरοσταφυλικού). Η D-κυστεΐνη μπορεί να λειτουργήσει ως υπόστρωμα για την παραγωγή H<sub>2</sub>S μέσω του ενζύμου DAO (D-amino acidoxidase). Επιπλέον, το ένζυμο CAT (cysteine aminotransferase) καταλύει το σχηματισμό 3-μερκαπτοपुरοσταφυλικού από την L-κυστεΐνη, που μετατρέπεται σε H<sub>2</sub>S από την 3-MST (εικόνα 13).

Μέχρι πρόσφατα πιστεύαμε ότι οι 3-MST και η CBS βρίσκονται κύρια στο ΚΝΣ και η CSE στους περιφερικούς ιστούς, όμως τώρα είναι γνωστό ότι και τα 3 ένζυμα βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα και ότι το H<sub>2</sub>S επιδρά σε όλες σχεδόν τις κυτταρικές διεργασίες. (Wang, Isaak et al. 2014). Οι CBS και CSE εκφράζονται ειδικά σε αστροκύτταρα και νευρώνες και η CSE επιμέρους στο καρδιαγγειακό, ενώ η 3-MST σε νευρώνες και γλοία και παράγει H<sub>2</sub>S με τη χρήση α-κετογλουταρικού. Η CBS καταλύει τη συμπύκνωση ομο κυστεΐνης και σερίνης για το σχηματισμό κυσταθειονίνης, μη αντιστρεπτά και στη συνέχεια η CSE την υδρολύει σε κυστεΐνη με κετοβουτυρικό και αμμωνία σαν παραγόμενα προϊόντα (Hughes, Centelles et al. 2009).

Σε ορισμένα άρθρα βέβαια αναφέρεται και η παράπλευρη συμμετοχή των CAT (cysteine aminotransferase) ή DAO (D-amino acid oxidase) (Bibli, Yang et al. 2015), (εικόνα 15). Συγκεκριμένα, η MST από κυστεΐνη σε συνεργασία με την CAT παράγει H<sub>2</sub>S παρουσία α-κετογλουταρικού και αναστέλλεται από το ασπαρτικό οξύ (Zhao, Biggs et al. 2014, Olson 2015).





Εικόνα 13: Ένζυμα παραγωγής H<sub>2</sub>S και μεταβολικές οδοί. Ανατύπωση από (Chan and Wallace 2013).

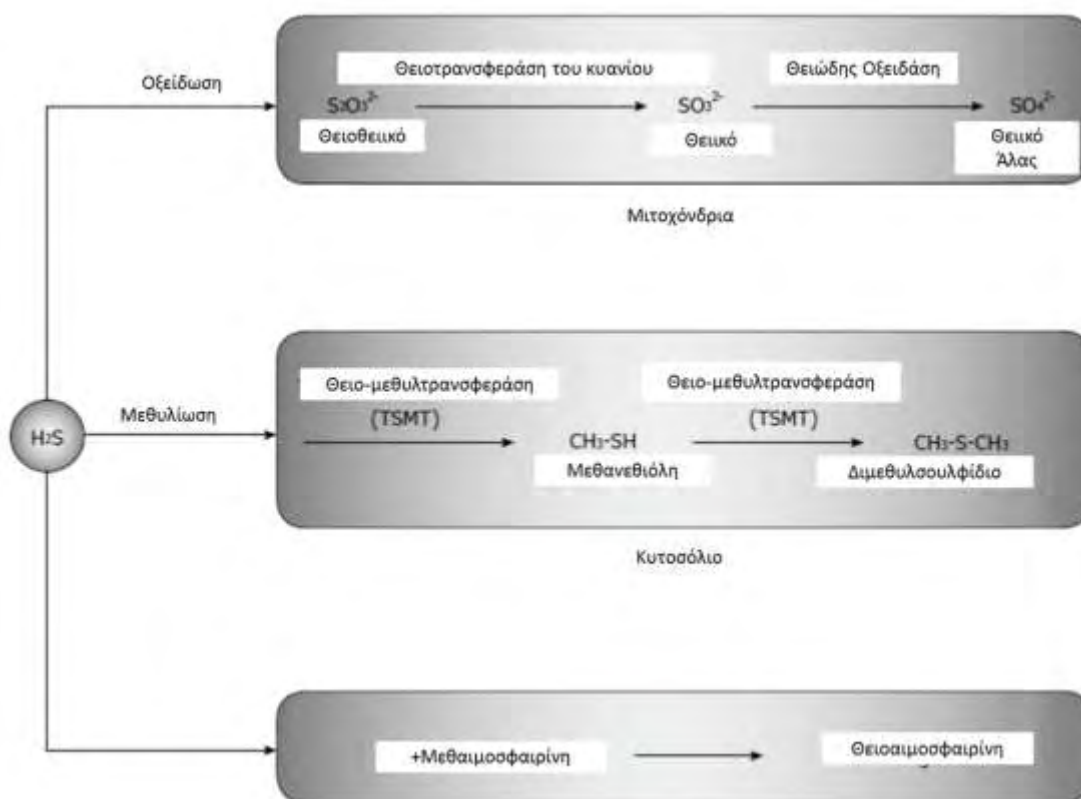
Η CSE φαίνεται πως είναι η πιο επαγωγίμη από τα ένζυμα παραγωγής H<sub>2</sub>S και ρυθμίζεται από διάφορες συνθήκες όπως η φλεγμονή που μεσολαβείται από τον TNF-α και τον LPS, μεταβολίτες όπως τα γλυκοκορτικοειδή και η γλυκόζη, το stress του ενδοπλασματικού δικτύου και οι διατροφικοί περιορισμοί. Η CSE καταλύει τη μετατροπή της κυσταθειονίνης σε κυστεΐνη. Με τη χρήση της κυστίνης (οξειδωμένη κυστεΐνη) παράγονται πυροσταφυλικό, αμμωνία και θειοκυστεΐνη και η τελευταία θα σχηματίσει κυστεΐνη και H<sub>2</sub>S. Για τη δραστηριότητα των ενζύμων CBS και CSE απαιτούνται η βιταμίνη B6 και ο συμπάράγοντας φωσφορική πυριδοξάλη (Chen and Wang 2012).

Η CBS εξαρτάται από μεταβολίτες που προσδένονται σ' αυτή π.χ. η S-αδενοσυλμεθειονίνη (SAM) ενεργοποιεί αλλοστερικά τη CBS. Επιπλέον, τα CO και NO αλληλεπιδρούν με το κέντρο της αίμης της CBS και τροποποιούν τη δραστηριότητά της. Στη νορμοξία το CO που παράγεται προσδένεται στην αίμη της CBS και αναστέλλει την παραγωγή H<sub>2</sub>S, γεγονός που αίρεται στην υποξία λόγω μειωμένων επιπέδων HO-2 (Chan and Wallace 2013). Επίσης, η ομάδα της αίμης στη CBS δεν επηρεάζεται από το NO, ενώ η δραστηριότητα της CAT αναστέλλεται από το ασβέστιο (Wang, Isaak et al. 2014).

Ένας εκλεκτικός αναστολέας της CSE, του ενζύμου παραγωγής του H<sub>2</sub>S είναι και η PPG (DL-propargylglycine, PAG) που ανέδειξε τη σημασία της εκλεκτικότητας της CSE στην υποξική απόκριση. Άλλοι αναστολείς είναι: η β-κυανοαλανίνη (αναστολέας της CSE), το

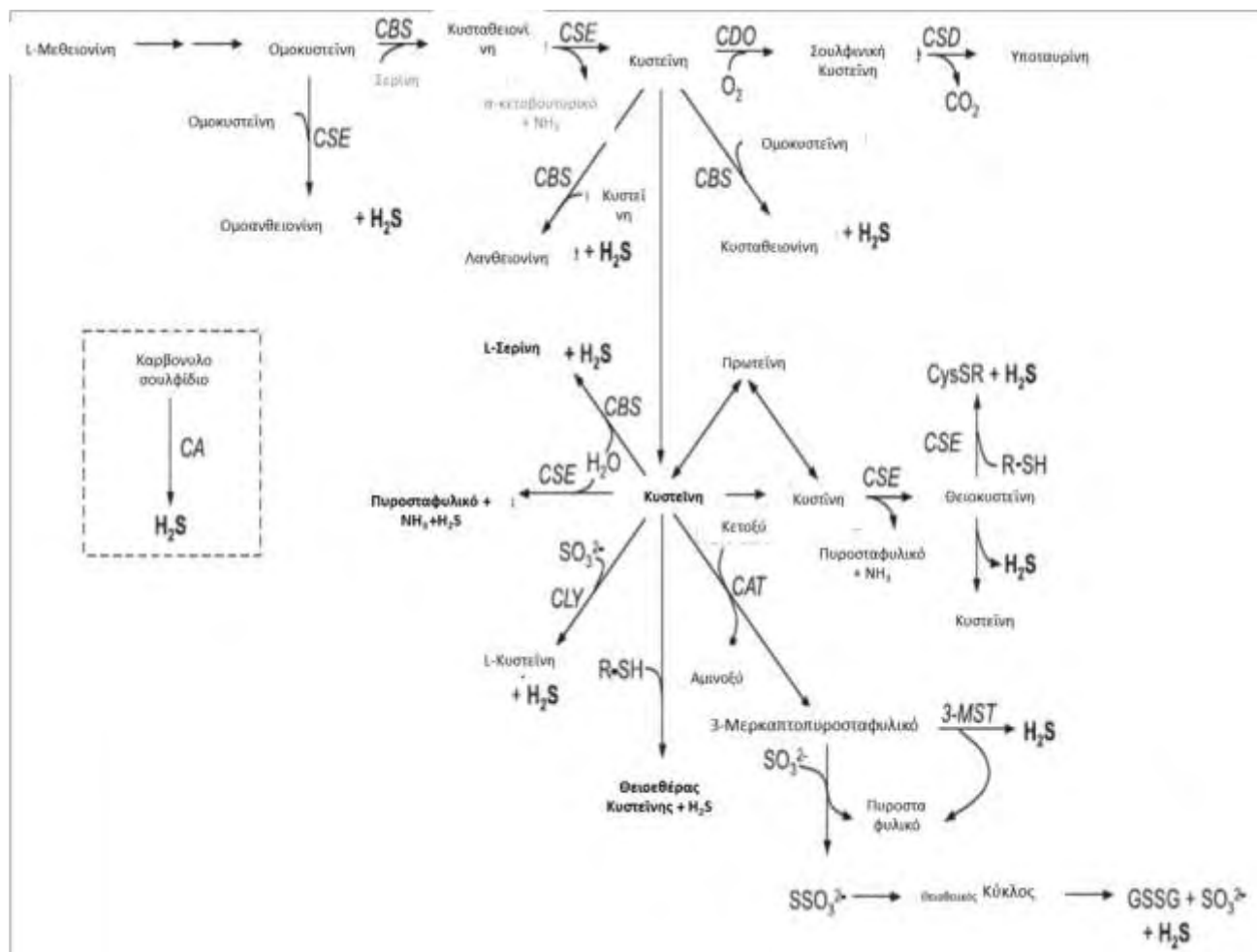
αμινοξυακετοξικό (αναστολέας της CBS) και η υδροξυλαμίνη (αναστολέας CSE και CBS) (Paul and Snyder 2015).

Το  $H_2S$  που παράγεται στα θηλαστικά αποθηκεύεται σαν συνδεδεμένο σουλφάνιο θείου και απελευθερώνεται στη συνέχεια σε απόκριση σε φυσιολογικά ερεθίσματα (εικόνα 14). Το  $H_2S$  απομακρύνεται γρήγορα από τα κύτταρα μέσω 3 καταβολικών οδών: 1) οξείδωση του  $H_2S$  που συμβαίνει κύρια στα μιτοχόνδρια, 2) μεθυλίωση του  $H_2S$  από την TSMT και 3) πρόσδεση του  $H_2S$  στη μεθαιμοσφαιρίνη και σχηματισμός σουλφαιμοσφαιρίνης. Το αέριο απορροφάται γρήγορα ή αποθηκεύεται (ενδοκυττάρια ή ενδομιτοχονδριακά) ενώ το ελεύθερο  $H_2S$  διατηρείται σε σταθερά επίπεδα (Guo, Cheng et al. 2013). Παρ' όλα αυτά, τα επίπεδα  $H_2S$  μεταβάλλονται σε νόσους όπως το άσθμα, η ΧΑΠ και η πνευμονία (Hatziefthimiou A. 2015).



Εικόνα 14: Κύριες καταβολικές οδοί  $H_2S$ . Ανατύπωση από (Hatziefthimiou A. 2015).

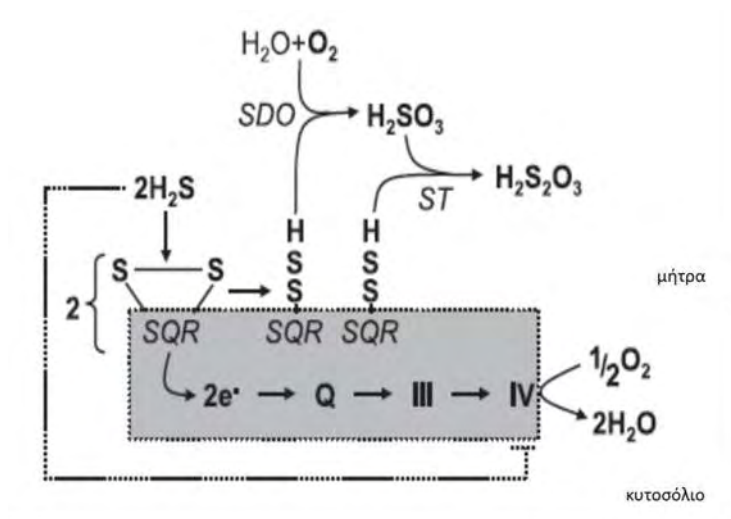
Στην παρακάτω εικόνα συνοψίζονται οι βασικές βιοσυνθετικές και καταβολικές οδοί του  $H_2S$  (εικόνα 15).



Εικόνα 15: Οδοί παραγωγής και μεταβολισμού του H<sub>2</sub>S. Ανατύπωση από (Olson 2011).

Η οξείδωση του έχει προτεραιότητα σε σχέση με άλλες αντιδράσεις, ώστε το κύτταρο να μη συγκεντρώσει τοξικά επίπεδα H<sub>2</sub>S εσωτερικά. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν σημεία καταβολισμού των θειούχων παραγώγων. Τα κύρια παράγωγα οξείδωσης του H<sub>2</sub>S είναι το θειο-θειικό άλας και το θειικό άλας. Στα ένζυμα οξείδωσης περιλαμβάνονται η οξειδοαναγωγή της κινόνης (SQR), η διοξυγενάση του θείου (ETHE1) και η οξειδάση του θειώδους άλατος. Για παράδειγμα, η SQR προσθέτει μια σουλφυδρυλομάδα στην GSH και τη μετατρέπει σε GSSH και κατέχει βασικό ρόλο στη μεταφορά e<sup>-</sup> από το H<sub>2</sub>S στην αναπνευστική αλυσίδα (εικόνα 16). Τέλος, το H<sub>2</sub>S ενισχύει την ανακατανομή της GSH στα μιτοχόνδρια (Polhemus and Lefer 2014). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου το H<sub>2</sub>S προάγει την κατανάλωσή του και σε υψηλές συγκεντρώσεις το H<sub>2</sub>S αναστέλλει την οξειδάση του κυτοχρώματος c (Olson 2011), οδηγώντας σε μειωμένη παραγωγή ATP. Μικρές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>S από την άλλη, αναστέλλουν τη φωσφοδιεστεράση 2A (PDE2A), οδηγώντας σε αύξηση του cAMP και ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A. Σε πολλά κύτταρα (ΛΜΚ, ηπατικά) τα ένζυμα παραγωγής H<sub>2</sub>S μεταναστεύουν στα μιτοχόνδρια και αποτρέπουν την τοξικότητα κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας. Λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής του δράσης, το H<sub>2</sub>S αποτρέπει τη διάνοιξη του MPTP (mitochondrial

permeability transition pore). Επομένως, το  $H_2S$  διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό και την αξιοποίηση της ενέργειας από τα κύτταρα (Paul and Snyder 2015).



Εικόνα 16: Μιτοχονδριακή οξείδωση  $H_2S$ . Ανατύπωση από (Olson 2011).

Δύσκολη θεωρείται η ακριβής μέτρηση των επιπέδων  $H_2S$  στο αίμα και στους ιστούς. Μέχρι στιγμής, οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι: το κυανό του μεθυλενίου, τα εκλεκτικά ιοντικά ηλεκτρόδια, η αέρια χρωματογραφία και οι φθορίζοντες ανιχνευτές (όπως το ντανσυλαζίδιο). Τρεις είναι οι αντιδράσεις που εκμεταλλεύονται: 1) αναγωγή μεσολαβούμενη από  $H_2S$  με τη χρήση αζιδίου ( $N_3$ ), 2) πυρηνοφιλικές αντιδράσεις μεσολαβούμενες από  $H_2S$  και 3) κατακρήμνιση μεταλλο-σουλφιδίων μεσολαβούμενη από  $H_2S$  (Zhao, Biggs et al. 2014). Οι δυσκολίες έγκειται στην ανάμειξη με άλλα χρωμοφόρα, στη σταθερότητα του αναλυόμενου παραγώγου, στην παρουσία ελεύθερου και δεσμευμένου με μόρια  $H_2S$  καθώς και στην εμπλοκή άλλων θειούχων παραγώγων (Polhemus and Lefer 2014).

Επίπεδα $H_2S$	
Στον ορό	35μm/L
Στην εκπνοή	8-16ppb
Στους πνεύμονες	30μm/L

Πίνακας 4: Επίπεδα  $H_2S$  στον οργανισμό (Hatziefthimiou A. 2015).

## 1.16. Δότες $H_2S$

Γνωστοί μέχρι τώρα δότες του  $H_2S$  αποτελούν ανόργανα άλατα όπως το  $NaHS$  και το  $Na_2S$ , οργανικά παράγωγα όπως το αντιδραστήριο Lawesson's (2,4-δις-(4-μεθοξυφαινυλ)-1,2,3,4-διθειαδιφωσφετάνιο-2,4-δισουλφίδιο) που απελευθερώνει  $H_2S$  σε υδατικά διαλύματα μετά από

υδρόλυση και το GYY4137 (Μορφολινο-4-φωσφινοδιθειικό) που είναι παράγωγο του αντιδραστηρίου Lawesson's. Η θειογλυκίνη και οι θειοβαλίνη είναι δύο καινούριοι αργοί δότες του  $H_2S$  που αυξάνουν τα επίπεδα cGMP (Bibli, Yang et al. 2015). Άλλοι δότες του  $H_2S$  είναι το διαλλυλικό τρισουλφίδιο και το πολυσουλφίδιο DATS (diallyl trisulphide) ,που βρίσκεται στο σκόρδο ή ανάλογά του όπως DAS (diallyl sulphide), DADS (diallyl disulphide) , DATTS (diallyl tetrasulphide). Τα ανόργανα άλατα αυξάνουν πολύ γρήγορα τη συγκέντρωση του υδροθείου, που καταναλώνεται πολύ γρήγορα κατόπιν σε ιστικό επίπεδο, μπορούν όμως να εκδηλώσουν και τοξικές δράσεις λόγω μη καθαρότητας. Τα πολυσουλφίδια από την άλλη αυξάνουν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα τη συγκέντρωση του  $H_2S$  (Polhemus and Lefer 2014).

Οι εξωγενείς δότες του  $H_2S$  έχει φανεί ότι ενεργοποιούν το μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης B, που προωθεί την (προ-)αγγειογένεση και την ανάπτυξη όγκου και ενισχύει τη φωσφορυλίωση ενεργοποιούμενης από μιτογόνο πρωτεϊνικής κινάσης (εξωκυτταρικές κινάσες και p38). Επίσης, η αύξηση του cGMP από το  $H_2S$  ενεργοποιεί την PKG-1 και αυτό οδηγεί σε αγγειοδιαστολή και αγγειογένεση. Οι αργοί δότες του  $H_2S$  φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικοί ποσοτικά στην αύξηση του cGMP, όμως μεγαλύτερη πιθανότητα να εκδηλώσουν δράση εξαρτώμενη από cGMP έχουν οι ταχείς δότες (Bibli, Yang et al. 2015). Ακόμη, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχει στο μονοπάτι του VEGF (Polhemus and Lefer 2014).

Σε αντιπαραβολή γρήγορων και αργών δοτών τα αποτελέσματα από πειραματόζωα δείχνουν ότι το NaHS προκαλεί γρήγορη και αντιστρεπτή χάλαση των ΛΜΚ των αγγείων και δοσο-εξαρτώμενη πτώση της αρτηριακής πίεση μέσα στα πρώτα 10-30 sec, ενώ το GYY4137 δεν έδειξε καμία κυτταροτοξικότητα και προκάλεσε πτώση της αρτηριακής πίεσης στα πρώτα 30 λεπτά και επίπεδα  $H_2S$  που παραμένουν στο πλάσμα έως και 3 ώρες μετά (Zhao, Biggs et al. 2014).

### **1.17. Μοριακοί μηχανισμοί δράσης του $H_2S$ και παραδείγματα.**

Η πιο διαδεδομένη ιδιότητα του  $H_2S$  είναι η σουλφυδρίωση ή σουλφυδρυλίωση (persulfidation). Η σουλφυδρίωση σε κυστεϊνικά κατάλοιπα είναι μια διαδικασία όμοια της νιτροζυλίωσης, δηλαδή το  $H_2S$  μεσολαβεί τη μετατροπή ενός -SH τμήματος των ενεργών κυστεϊνών μιας πρωτεΐνης, για να σχηματιστεί περσουλφιδικό τμήμα (-SSH). Ενώ η νιτροζυλίωση μειώνει την ενεργότητα του τροποποιημένου καταλοΐπου, η σουλφυδρυλίωση την αυξάνει. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της GAPDH, όπου η σουλφυδρυλίωση αυξάνει σε επταπλάσιο βαθμό τη γλυκολυτική του δραστηριότητα (Olson 2015). Πριν τη δράση του  $H_2S$  όμως προαπαιτείται η

οξειδωση της κυστεΐνης, εφόσον το H<sub>2</sub>S δεν μπορεί να δράσει σε αναχθείσες θειόλες (Chen and Wang 2012).

Μία από τις αναφερόμενες ιδιότητες του H<sub>2</sub>S είναι και η τροποποίηση της δραστηριότητας ενζύμων με μέταλλα στο ενεργό τους κέντρο (π.χ. GC, cytochrome c oxidase), με πρόσδεση και πρόκληση αναγωγής. Έτσι, φερ' ειπείν, αντιδρά με την οξειδωμένη μορφή της Hb γεννώντας παράγωγο θεικής Αίμος. Με άλλο μηχανισμό φαίνεται να αναστέλλει και τη συσσώρευση AMT (Bibli, Yang et al. 2015).

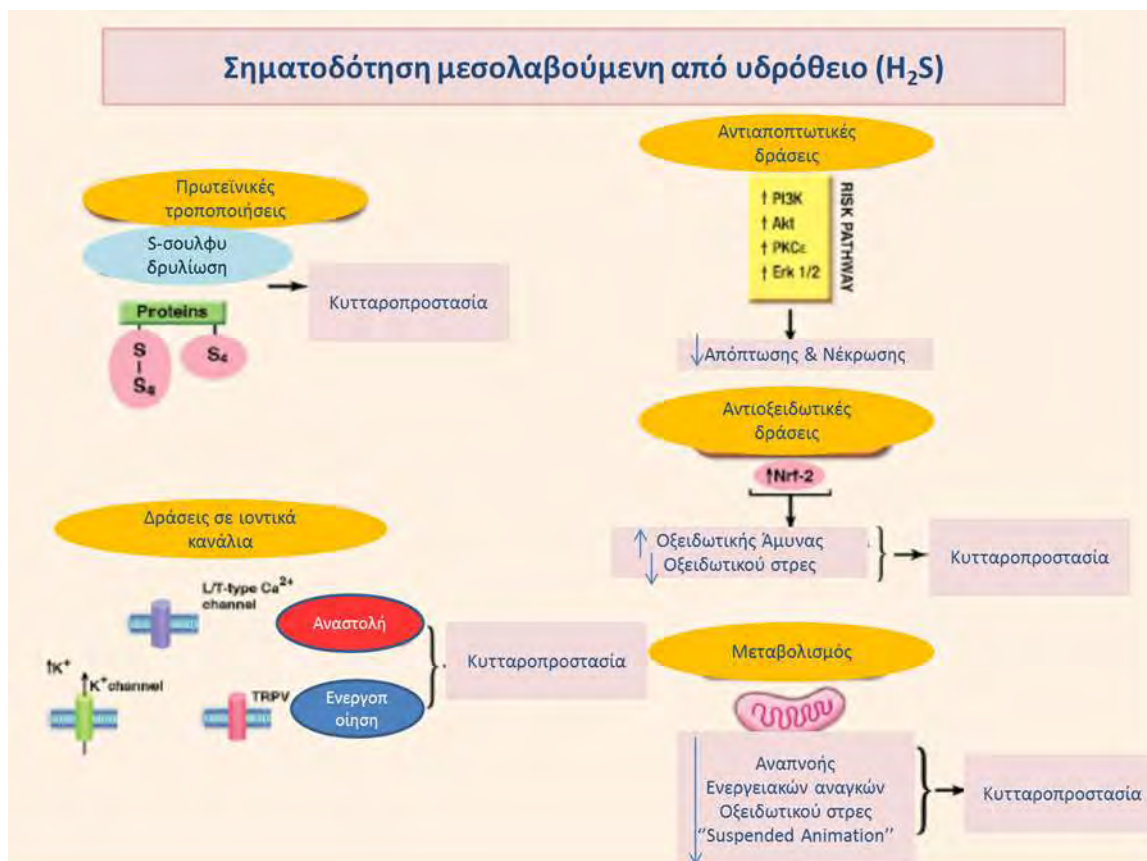
Το H<sub>2</sub>S αντιδρά επίσης με S-νιτροζοθειόλια για το σχηματισμό θειονιτρικού οξέος (HSNO), του οποίου οι μεταβολίτες (NO, NO<sup>+</sup>, NO<sup>-</sup>) έχουν σαφείς λειτουργίες (Zhao, Biggs et al. 2014).

Το H<sub>2</sub>S στην ανηγμένη του μορφή HS<sup>-</sup> και μπορεί να αντιδράσει με διάφορους ηλεκτροφυλικούς παράγοντες όπως 8-νιτρο-cGMP, 15-δεοξυ-Δ12,14-προσταγλανδίνη J2, 4-υδροξυ-2-ενεαννάλη, παράγωγα λιπαρών οξέων νιτροαλκένης και ακρολεΐνη για προστασία από το οξειδωτικό stress ή για τροποποίηση της σηματοδότησης. Η σουλφυδρυλίωση του 8-νιτρο-cGMP σε 8-SH-cGMP, όχι μόνο μειώνει την S-γουανυλίωση των πρωτεϊνών, αλλά δημιουργεί και ένα μόριο ανθεκτικό στις φωσφοδιεστεράσες που διατηρεί τη δραστηριότητα του cGMP (Olson 2015).

Το H<sub>2</sub>S μεσολαβεί αποκρίσεις στο ισχαιμικό stress του καρδιαγγειακού συστήματος προωθώντας την πυρηνική μετατόπιση του Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), γεγονός που έχει σημασία σε διαβητικά πειραματικά μοντέλα. Ο Nrf2 αποτελεί το βασικό μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει την έκφραση της φάσης II αντιοξειδωτικής απόκρισης των γονιδίων (οξυγενάση της αίμης-1, δισμουτάση του υπεροξειδίου-1 και καταλάση). Φυσιολογικά παραμένει στο κυτοσόλιο, όπου στοχοθετείται από την Keap1 (kelch-like ECH associated protein) για αποδόμηση στο πρωτεάσωμα. Το H<sub>2</sub>S σουλφυδρυλιώνει την Keap1, οδηγώντας στον αποχωρισμό Keap1 και Nrf2. Σε CSE knockout ποντίκια περιορίζεται αυτή η σουλφυδρυλίωση και τα κύτταρα οδηγούνται σε οξειδωτικό stress και γηρασμό (Zhao, Biggs et al. 2014).

Επίσης, το H<sub>2</sub>S παρέχει καρδιοπροστασία σε βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης σε διαβητικά μοντέλα, ενεργοποιώντας οδούς πολλαπλών κινασών (οδός RISK-rescue injury salvage kinases) που συμβάλλουν στη διάσωση του μυοκαρδίου (Lambert, Nicholson et al. 2014).

Το H<sub>2</sub>S ρυθμίζει την αγγειοδιαστολή, ενώ αναστολείς της CSE την αποτρέπουν. Το H<sub>2</sub>S μεσολαβεί την αγγειοχάλαση μέσω σουλφυδρυλίωσης ATP-εξαρτώμενων διαύλων καλίου παρόντα σε λεία μυικά κύτταρα αγγείων. Η σουλφυδρυλίωση της Cys43 της εσωτερικής υπομονάδας του δίαυλου Kir6.1, αποτρέπει τη σύνδεση με το ATP και καθιστά το δίαυλο ανοιχτό προς επίτευξη αγγειοχάλασης (Olson 2011).

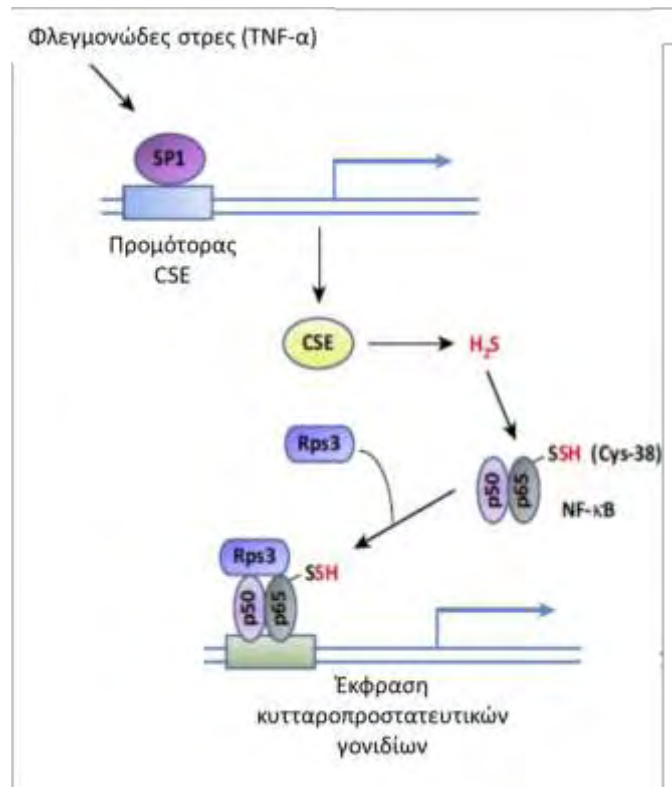


Εικόνα 17: Μεσολάβηση του  $H_2S$  σε σηματοδοτικά μονοπάτια (Polhemus and Lefer 2014).

Επιπροσθέτως, το  $H_2S$  μεσολαβεί στη φλεγμονώδη απόκριση μέσω σουλφυδρίωσης της p65 υπομονάδας του NF- $\kappa$ B. Πρακτικά, όταν τα ΜΦ διεγείρονται μέσω του TNF- $\alpha$ , ο μεταγραφικός παράγοντας SP1 (specificity protein1) επάγει την έκφραση της CSE που οδηγεί στην παραγωγή  $H_2S$  (εικόνα 18). Ο σουλφυδρυλιωμένος πλέον NF- $\kappa$ B, προσδένεται στη ριβοσωμική πρωτεΐνη S3 (rps3) οδηγώντας σε αύξηση της συσχέτισης με τους προμότερες των κυτταροπροστατευτικών γονιδίων στόχων. Παράλληλα, αναστέλλει την κύλιση των λευκοκυττάρων και την προσκόλλησή τους στο ενδοθήλιο (Paul and Snyder 2015).

Η CSE φαίνεται πως επάγεται και σε stress του ενδοπλασματικού δικτύου με αποτέλεσμα την αύξηση του  $H_2S$ . Έτσι, γίνεται σουλφυδρυλίωση της πρωτεΐνης PTP1B (πρωτεϊνική τυροσινική φωσφατάση 1B) στο κατάλοιπο Cys215, που αναστέλλει τη δραστηριότητά του. Κατόπιν, η PERK (protein kinase RNA-like ER kinase), που είναι στόχος της PTP1B, διατηρεί τη φωσφορυλιωμένη της μορφή και ενεργοποιεί το UPR (unfolded protein response). Η φωσφο-PERK καταλύει τη φωσφορυλίωση του ευκαρυωτικού eIF2 $\alpha$  (eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ ) οδηγώντας στην απόσβεση της ολικής πρωτεϊνοσύνθεσης. Μόνο ορισμένα mRNAs μεταφράζονται κατ' εξαίρεση όπως το ATF4 (activating transcription factor 4), που ενεργοποιεί τη CSE, δημιουργώντας έναν κύκλο ανατροφοδότησης, ισχυροποιώντας την απόκριση στο stress του ER (Paul and Snyder 2015).



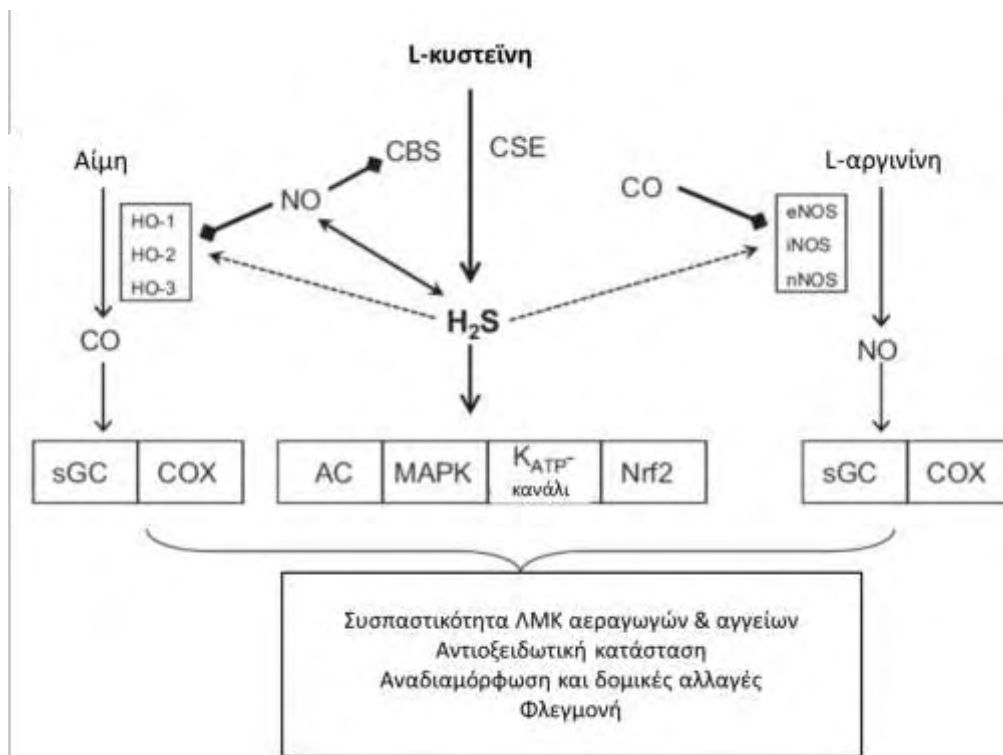


Εικόνα 18: Συμμετοχή της σουλφυδρυλίωσης στην κυτταροπροστασία. Ανατύπωση από (Paul and Snyder 2015).

### 1.18. Αλληλεπίδραση συστημάτων αεροδιαβιβαστών και ρύθμιση αυτών από το H<sub>2</sub>S.

Οι αεροδιαβιβαστές μοιράζονται κοινούς μοριακούς στόχους, αλλά τροποποιούν τις δραστηριότητές τους μέσω διαφορετικών μηχανισμών (εικόνα 19) Για παράδειγμα, τόσο το NO όσο και το CO ενεργοποιούν τους διαύλους BKca αλλά το NO δρα μόνο στη β υπομονάδα και το CO στην α. Επίσης, συμβαίνει οι αεροδιαβιβαστές να δρουν σε διαφορετικούς στόχους αλλά να επιφέρουν το ίδιο τελικό αποτέλεσμα. Για παράδειγμα, το NO προσδένεται στο sGC group τα αίμης (soluble guanylate cyclase) για να αυξήσει την παραγωγή cGMP. Το CO κάνει το ίδιο στην sGC, αλλά με μικρότερη αγγιστεία. Περίεργως, το CO δεν ενεργοποιεί το sGC εκτός αν το ιστικό επίπεδο NO είναι χαμηλό. Το H<sub>2</sub>S δεν δρα άμεσα στην sGC, αλλά μειώνει την αποδόμηση του cGMP αναστέλλοντας τις φωσφοδιεστεράσες (Wang 2012).



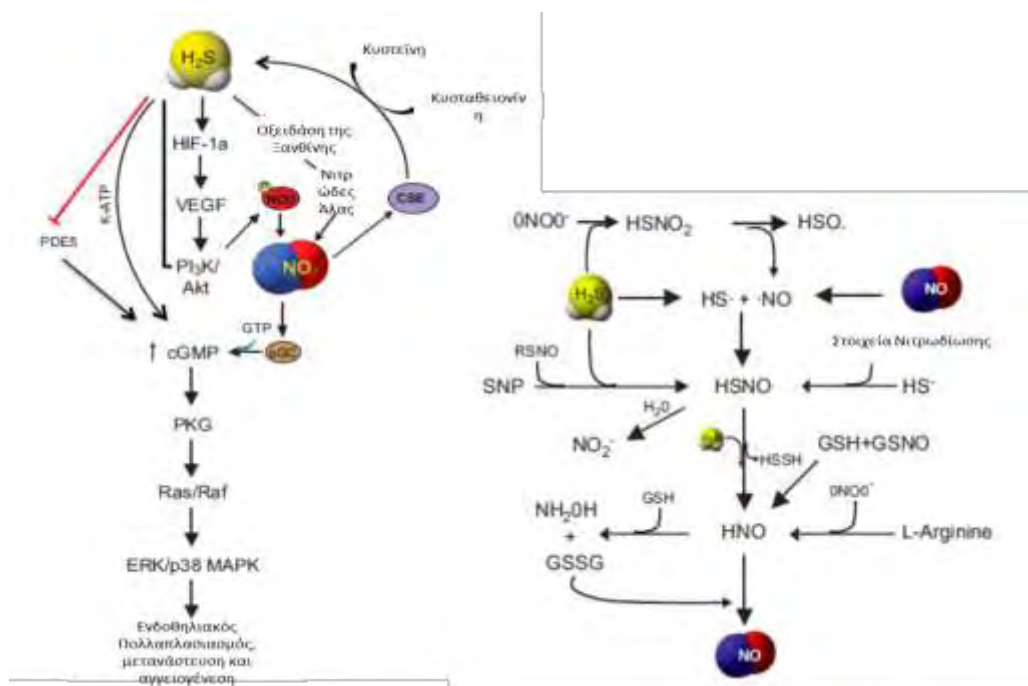


Εικόνα 19: Διασταυρούμενη επικοινωνία αεροδιαβιβαστών. Ανατύπωση από (Chen and Wang 2012).

Το H<sub>2</sub>S όπως προαναφέραμε έχει αγγειοδιασταλτικές δράσεις σε μερική πίεση οξυγόνου 30mmHg, όμως μπορεί να δράσει και αγγειοσυσπαστικά σε μερική πίεση οξυγόνου 150mmHg. Το H<sub>2</sub>S φαίνεται να συνεργάζεται με το σύστημα NO (που δρα ως EDRF), ενισχύοντας τη δράση του τελευταίου στο αγγειακό σύστημα. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα το NO συντίθεται από την eNOS και εκκινεί τη σηματοδότηση με τη γουανυλική κυκλάση σχηματίζοντας το δεύτερο αγγελιοφόρο cGMP. Το cGMP συντίθεται από GTP μέσω των GCs (guanyl cyclases) και αποδομείται με υδρόλυση από φωσφοδιεστεράσες (PDEs). Επίσης, το H<sub>2</sub>S αναστέλλει έμμεσα την αγγειοδιαστολή, μέσω καθυστέρησης αποδόμησης της cGMP (Chen and Wang 2012). Παρότι η σηματοδότηση του H<sub>2</sub>S και του NO είναι ανεξάρτητες, υπάρχει διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ τους, γεγονός που αποδεικνύεται από μελέτες σε Κ.Α. από υπερφόρτωση όγκου. Στα πειραματικά μοντέλα χορηγήθηκε δότης H<sub>2</sub>S και 30min μετά ανιχνεύθηκαν στο πλάσμα αυξημένα επίπεδα νιτρωδών (nitrite, nitrate and nitrosylated protein RXNO) ως απότοκο της αύξησης της φωσφορυλίωσης της eNOS. Αντίστροφα, δότες NO προκαλούν αύξηση της έκφρασης της CSE σε αορτικά ΛΜΚ. (Polhemus and Lefer 2014). Το H<sub>2</sub>S φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα NO, ρυθμίζοντας την αγγειογένεση και περιορίζοντας τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, που επάγει το σηματοδοτικό μονοπάτι VEGF και ακολούθως PI3K/Akt/eNOS (Kolluru, Shen et al. 2013). Υπό μελέτη είναι και η συσχέτιση των 2

συστημάτων με την απελευθέρωση του ασβεστίου, ενώ έχει αναφερθεί ότι ένας NO δότης μπορεί να αναστείλλει την έκφραση της CBS (Chen and Wang 2012)

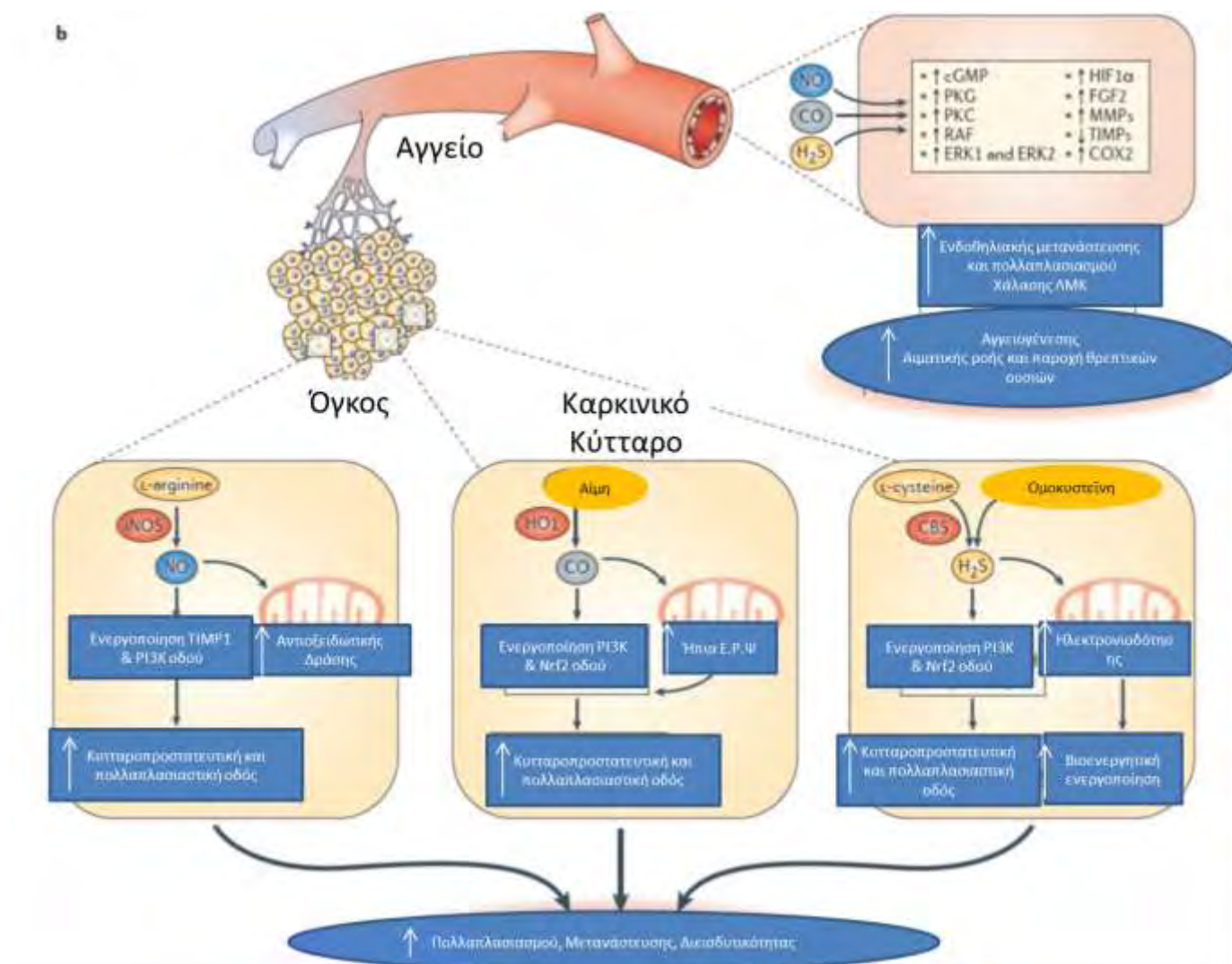
Μελέτες έχουν αποδείξει την αλληλοεξάρτηση των 2 συστημάτων, δουλεύοντας με knockout ποντικούς για την eNOS και τη CSE. Το H<sub>2</sub>S αποτρέπει την αποδόμηση της eNOS και επάγει τη φωσφορυλίωσή της μέσω PI3K/Akt δραστηριότητας καθώς και της οδού της p38MAPK. Παρ' όλα αυτά, μία ομάδα βρήκε ότι η γένεση NO σ' αυτά τα ποντίκια μετά από χορήγηση H<sub>2</sub>S μπορεί να προκύψει και μη ενζυματικά μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης (XO) και να επάγει το ίδιο μονοπάτι. Αυτή η οδός επίσης, μετριάζει το οξειδωτικό στρες, εφόσον το εξωγενές H<sub>2</sub>S διεγείρει την παραγωγή Nrf2, μπλοκάρει την έκφραση NOX1 και αλληλεπιδρά με περοξυνιτρώδεις ρίζες (ONOO<sup>-</sup>). Έτσι, τα προϊόντα οξείδωσης του NO μπορούν να αντιδράσουν με το H<sub>2</sub>S και τα ενδιάμεσα που προκύπτουν απελευθερώνουν NO και ουδετεροποιούν προ-αποπτωτικές και οξειδωτικές δράσεις των περοξυνιτρωδών (εικόνα 20). Το HSNO για παράδειγμα, διαχέεται ενδοκυτταρικά και υποβοηθά την τρανς-νιτροζύλιωση πρωτεϊνών όπως η αίμη, δείχνοντας ένα ρόλο στη μεταφορά οξυγόνου και την καρδιοπροστασία (Chen and Wang 2012).



Εικόνα 20: Κοινές σηματοδοτικές οδοί H<sub>2</sub>S και NO και αλληλεπιδράσεις. Ανατύπωση από (Kolluru, Shen et al. 2013)

Η πιο ενδιαφέρουσα οντότητα είναι αυτή του ρόλου και των 3 συστημάτων αεροδιαβιβαστών στην ογκολογία. Η επιβίωση και η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων ενεργοποιείται από την παραγωγή αεροδιαβιβαστών στον όγκο. Η επαγωγή του iNOS και τα επακόλουθα αυξημένα επίπεδα του NO, επάγουν την HO-1 και την CBS με αποτέλεσμα, να αυξάνουν τα επίπεδα CO

και  $H_2S$  αντίστοιχα, που συμβάλλει σε προ-επιβιωτικές και προ-αναπαραγωγικές δράσεις. Αυτοί οι σηματοδοτικοί μηχανισμοί κορυφώνουν την επαγωγή FGF2, MMPs (matrix metalloproteinases) και TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) και ενεργοποιούνται η PI3K και η COX2. Επιπρόσθετα στις αυτόνομες δράσεις του όγκου, κάθε διαβιβαστής μπορεί να διαχέεται τόσο ενδοογκικά, όσο και παραογκικά διεγείροντας την αγγειογένεση, μέσω παρακρινών οδών στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ενεργοποίησης ποικίλων προαγγειογενετικών οδών (εικόνα 21), ενεργοποίησης PKC/RAF/ERK αλλά και σταθεροποίησης του HIF-1α (Szabo 2016)

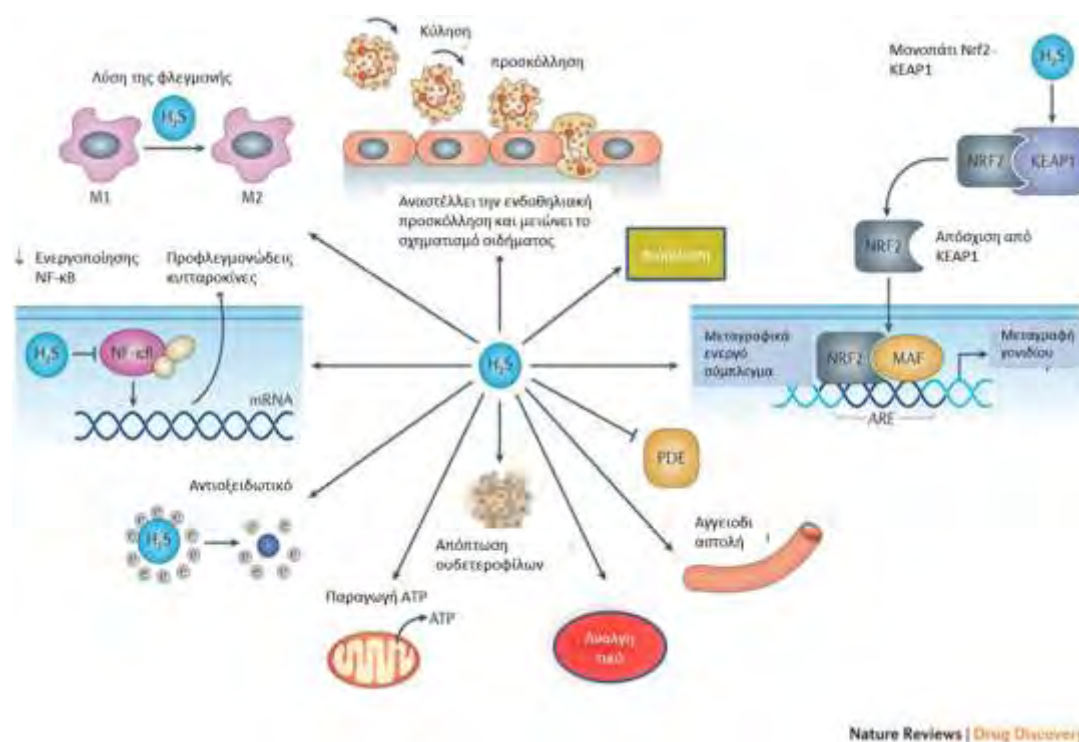


Εικόνα 21: Προ-ογκογόνες δράσεις χαμηλών επιπέδων των ενδογενώς παραγόμενων αεροδιαβιβαστών NO, CO,  $H_2S$  (Szabo 2016).

## 1.19. Δράσεις του $H_2S$

Δημοσιεύσεις αναφέρουν τη συμμετοχή του στη φυσιολογία του καρδιαγγειακού, νευρικού, ενδοκρινικού, αναπαραγωγικού, γαστρεντερικού και ανοσοποιητικού συστήματος (εικόνα 22). Συχνή είναι και η εμπλοκή του σε παθολογικές καταστάσεις, όπως, η αθηροσκλήρυνση, η

αρτηριακή υπέρταση, η καρδιακή ανεπάρκεια, ο διαβήτης, η ηπατική κίρρωση, η φλεγμονή, η σήψη, οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, το εγκεφαλικό επεισόδιο, το άσθμα, η ΧΑΠ, η πνευμονική υπέρταση, η παγκρεατίτιδα, οι ενδοκοιλιακές φλεγμονές αλλά και η στυτική δυσλειτουργία. Ακόμη, η εντόπιση των επιπέδων  $H_2S$  στο πλάσμα φρονείται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης ασθενών σε ΜΕΘ, εφόσον τα αυξημένα επίπεδα  $H_2S$  αυξάνουν με την πρόοδο της οξέωσης (Olson 2011). Επιμέρους, δρα ως σηματοδοτικό μόριο για τη νευροδιαβίβαση και εμπλέκεται στη μνήμη, τη μάθηση και την αλγαισθησία. Όπως το NO έχει ρόλο EDRF, έτσι και το  $H_2S$  είναι ένας EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor). Σε κυτταρικό επίπεδο οι επιδράσεις του εμπλέκουν το ενδοθήλιο, τα ΛΜΚ, τα κύτταρα της φλεγμονής και σε υποκυτταρικό επίπεδο τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο, καθώς και πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Μόρια-στόχοι του  $H_2S$  αποτελούν ιοντικοί διάλυλοι, όπως οι ATP-ευαίσθητοι διάλυλοι καλίου, οι TRPV (transient receptor potential vanilloid channels), μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο NF- $\kappa$ B και η HO-1 (heme oxygenase-1) και οι MAPK σε ΛΜΚ, επιθηλιακά και ινοβλάστες (Hatziefthimiou A. 2015).



Εικόνα 22: Επιδράσεις του  $H_2S$  στη φυσιολογία των κυττάρων. Ανατύπωση από (Wallace and Wang 2015).

### 1.19.1. Δράσεις του $H_2S$ σε συστήματα

Η βιολογία του  $H_2S$  ανά σύστημα παρουσιάζει ενδιαφέρον.

Στο **νευρικό σύστημα**, η ενίσχυση των NMDA υποδοχέων με τροποποίηση της LTP (long term potentiation) ήταν από τις πρώτες δράσεις που αποδόθηκαν στο  $H_2S$ . Οι NMDA υποδοχείς

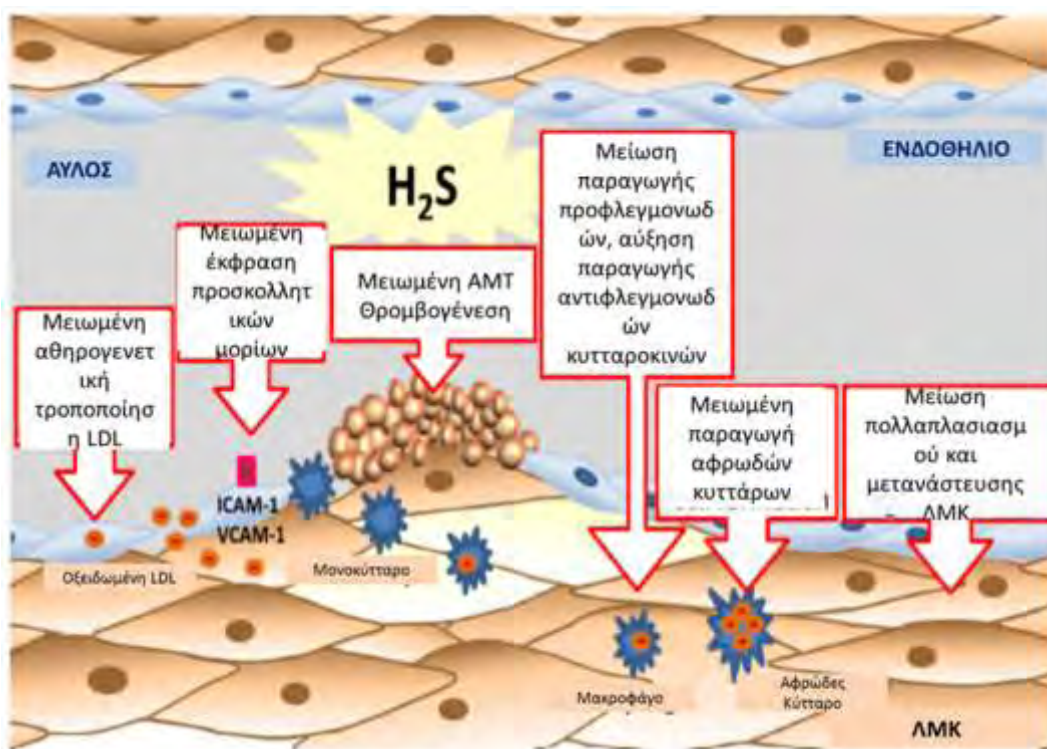
του γλουταμικού φέρουν κυστεϊνικά κατάλοιπα που σουλφυδρυλιώνονται από το  $H_2S$  με αποτέλεσμα την επαγωγή μακράς διάρκειας δυναμικού για τη συνειρμική μάθηση, με άγνωστο μέχρι τώρα μηχανισμό. Διαταραχή του μεταβολισμού του  $H_2S$  στον εγκέφαλο φαίνεται να σχετίζεται με νευροεκφύλιση, δεδομένου ότι η σηματοδότηση μέσω αυτού είναι ενισχυμένη στις νόσους Parkinson's και Alzheimer's (Paul and Snyder 2015). Το εξωγενές  $H_2S$  μειώνει τη συσσώρευση β-αμυλοειδούς, τροποποιεί την αλγαισθησία μέσω των  $\mu$  υποδοχέων των οπιοειδών και αποτρέπει τη νευροεκφύλιση. Ακόμη, προστατεύει τους νευρώνες από υποξική βλάβη αυξάνοντας την παραγωγή γλουταθειόνης και μειώνοντας το οξειδωτικό στρες από τα μιτοχόνδρια. Επίσης, ρυθμίζει το ενδοκυττάριο pH της γλοίας και υπερπολώνει τα αστροκύτταρα μέσω ενίσχυσης των GABA υποδοχέων και αύξησης του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Τέλος, το  $H_2S$  φαίνεται να προλαμβάνει την απόπτωση μέσω αναστολής των MAPK και της κασπάσης 3 σε νευρικά κύτταρα, μετά από AEE (Polhemus and Lefer 2014) ενώ στο σύνδρομο Down η CBS υπερεκφράζεται στο χρωμόσωμα 21 και αυξημένα επίπεδα  $H_2S$  ανευρίσκονται στο ENY (Olson 2011).

Παρότι το  $H_2S$  συντίθεται κατά μήκος όλου του ΓΕΣ ο μηχανισμός της κινητικότητας του εντέρου διαφοροποιείται. Στο στόμαχο, το  $H_2S$  δρα μέσω ενεργοποίησης της MLCP, στο κόλον είναι ανεξάρτητο από το ενδοκυττάριο ασβέστιο, τους διαύλους καλίου, την MLCP ή τη Rho κινάση και στον ειλέο δεν εξαρτάται από τα εντερικά νεύρα, το NO και τους  $K_{ATP}$ ,  $K_{Ca^{++}}$  διαύλους. Επίσης, το  $H_2S$  διεγείρει την παραγωγή  $Cl^-$  στο έντερο, στοχεύοντας στους βανιλλοειδείς υποδοχείς που θα ενεργοποιήσουν τις εκκριταγωγές ίνες για την απελευθέρωση της ουσίας P. Η αναστολή της CSE διεγείρει τη χολική έκκριση διττανθρακικών, ενώ το εξωγενές  $H_2S$  την αναστέλλει. Τα χολικά οξέα αυξάνουν την έκφραση της CSE μέσω ενεργοποίησης του φαρνεσοειδούς υποδοχέα X και η προκύπτουσα παραγωγή  $H_2S$  προτείνεται για τη διατήρηση της αγγειοδιαστολής και τη μείωση της πυλαίας υπέρτασης (Olson 2011). Στον εντερικό βλεννογόνο παράγεται  $H_2S$  και απενεργοποιείται ταχέως από μιτοχονδριακά ένζυμα. Τα επίπεδά του είναι αυξημένα στην κολίτιδα, όμως το  $H_2S$  φαίνεται ότι συμμετέχει στη λύση της φλεγμονής και σε αντίσταση στην επερχόμενη βλάβη, προωθώντας την απόπτωση των ουδετερόφιλων, αναστέλλοντας τη δραστηριότητα της ουδετεροφιλικής MPO (myeloperoxidase) καθώς και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B), ενισχύοντας τη φαγοκυττάρωση από βακτήρια και οδηγώντας σε διαφοροποίηση των μακροφάγων προς M2 φαινότυπο, ενώ στα μιτοχόνδρια εξυπηρετεί ως καύσιμο για μιτοχονδριακή παραγωγή ATP. Επιπλέον, αυξάνει την αιματική ροή του βλεννογόνου, αποτρέπει την προσκόλληση των λευκοκυττάρων, μειώνει το οξειδωτικό stress και το οίδημα και κινητοποιεί την αγγειογένεση. Ένας άλλος μηχανισμός του  $H_2S$  είναι η ενίσχυση της COX-2-μεσολαβούμενης σύνθεσης PGL,



ενώ η βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης στις αιμορραγίες βελτιώνεται μέσω της μιτοχονδριακής του χρήσης για γένεση ATP (Flannigan, Agbor et al. 2015).

Αρκετά μελετημένες είναι και οι δράσεις του  $H_2S$  στο **καρδιαγγειακό**. Πέρα από τους γνωστούς μηχανισμούς που ενέχει το  $H_2S$  στην αγγειοχάλαση, το τελευταίο μπορεί να την προκαλέσει και έμμεσα μέσω αναστολής του μετατρεπτικού ενζύμου και να αποτρέψει το σχηματισμό της αγγειοσυσπαστικής ANG II. Επιπροσθέτως, το  $H_2S$  εμπλέκεται στην υπόταση που σχετίζεται με το σηπτικό και το υπογκαιμικό σοκ και τη μη ορθή έκκριση της ινσουλίνης σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου II σε μακροαγγειακές και μικροαγγειακές παθολογίες. Γενικά, το  $H_2S$  έχει αρνητική ινότροπο και χρονότροπο δράση στην καρδιά και η αυξημένη ενδογενής παραγωγή του προστατεύει από τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Olson 2011). Σημαντική υπήρξε η ανάδειξη του  $H_2S$  ως μακροπρόθεσμης προστασίας έναντι μυοκαρδιακής βλάβης σε ποντικούς με Κ.Α. μετά από ισχαιμία. Σε ποντικούς, έγινε αποκλεισμός της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας για 60 λεπτά και επανάρδευση έως 4 εβδομάδες μετά και NaHS εγχύθηκε στην επανάρδευση και κάθε μέρα για 7 ημέρες μετά. Αποδείχθηκε ότι μακροχρόνια θεραπεία με  $H_2S$  μείωνε τη διάταση της αριστερής κοιλίας, την υπερτροφία και βελτίωνε την καρδιακή λειτουργία (Zhao, Biggs et al. 2014). Χαρακτηριστικές είναι και οι δράσεις του  $H_2S$  στην αθηροσκλήρυνση. Κάτι που έχει ενδιαφέρον είναι ότι η ατορβαστατίνη αυξάνει την παραγωγή  $H_2S$  στον περιαγγειακό λιπώδη ιστό, προάγοντας την έλλειψη του συνενζύμου Q9 και αναστέλλοντας τη μιτοχονδριακή οξείδωση (Dunn, Alexander et al. 2016).



Εικόνα 23: Ο προστατευτικός ρόλος του  $H_2S$  στο σχηματισμό αθηροσκληρυντικής πλάκας (Dunn, Alexander et al. 2016)

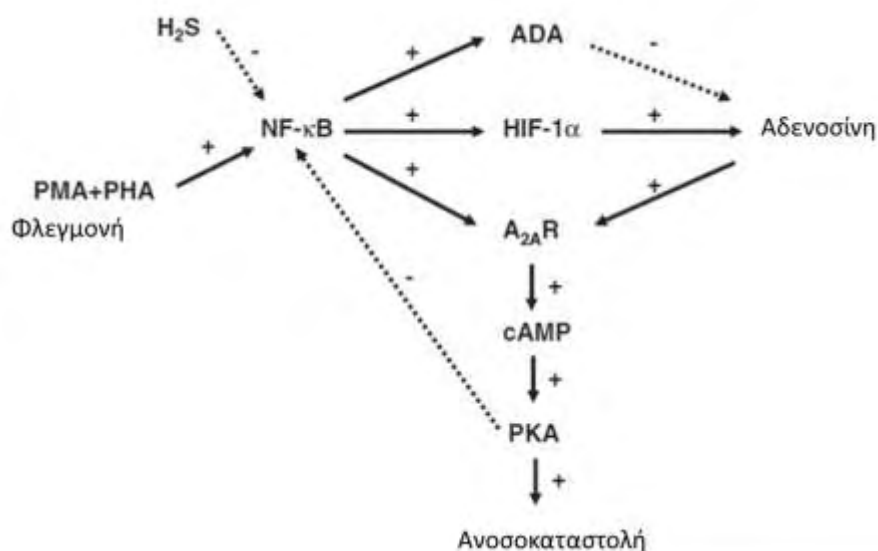
Ακόμη, το H<sub>2</sub>S προωθεί τη μακροζωία μέσω διαιτητικού περιορισμού, ένα φαινόμενο υψηλά συντηρημένο. Η διαιτητική μείωση των προσλαμβανόμενων θεικών αμινοξέων προστατεύει τα ποντίκια από την ηπατική βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, μέσω αύξησης της έκφρασης της CSE (Shim H. S. 2015).

Το H<sub>2</sub>S στον **πνεύμονα** αυξάνει τις αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η IL-10 και μειώνει τις προφλεγμονώδεις, όπως η IL-1β, IL-6, TNF-α και η IL-8 σε μοντέλα με ALI (acute lung injury) προκαλούμενα από καπνό ή από υπεροξία, ενώ προστατευτική είναι η εισπνοή H<sub>2</sub>S σε VILI (ventilator-induced lung injury) αποτρέποντας το σχηματισμό οιδήματος, την απόπτωση, την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και τη συσσώρευση ουδετερόφιλων (Chen and Wang 2012). Γενικά, επίπεδα H<sub>2</sub>S στον ορό είναι μειωμένα σε προχωρημένα στάδια ΧΑΠ, αλλά και σε εξάρσεις της νόσου, σε πνευμονική υπέρταση καθώς και σε καπνιστές. Σε σύγκριση σταθερής ΧΑΠ και έξαρσης τα επίπεδα H<sub>2</sub>S είναι μεγαλύτερα στην πρώτη περίπτωση. Το H<sub>2</sub>S ακόμη, προσφέρει κυτταροπροστασία έναντι της πνευμονοτοξικότητας της μπλεομυκίνης, μέσω αναστολής της έκφρασης της p65 υπομονάδας του NF-κB και της ρύθμισης της ισορροπίας Th1/Th2 απόκρισης. (Hatziefthimiou A. 2015). Επιπρόσθετα, η παραγωγή του H<sub>2</sub>S μειώνεται στη χρόνια υποξία που σχετίζεται με πνευμονική υπέρταση τόσο στους πνεύμονες όσο και στο αίμα. Σε ποντίκια με πνευμονική βλάβη επαγόμενη από οελικό οξύ, το εξωγενές H<sub>2</sub>S αύξησε την αρτηριακή P<sub>a</sub>O<sub>2</sub>, μείωσε το πνευμονικό οίδημα και τη διήθηση πολυμορφοκυττάρων, μείωσε την IL-6 και την IL-8, αλλά αύξησε την IL-10, καταδεικνύοντας ως αιτία τη μείωση της ενδογενούς παραγωγής H<sub>2</sub>S. Σε κατάσταση υποθερμίας, η έκθεση σε H<sub>2</sub>S θα βελτιώσει τη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα και θα αυξήσει παραδόξως την αερόβια χρήση της γλυκόζης (Olson 2011).

Η χορήγηση PPG μειώνει το GFR και την απέκκριση K<sup>+</sup> και Na<sup>+</sup> από το **νεφρό**, ενώ αυξάνονται με έγχυση H<sub>2</sub>S ή κυστεΐνης και είναι ευεργετικό έναντι της νεφρογενούς υπέρτασης, μέσω αναστολής της έκφρασης της ρενίνης. Στην υπερομοκυστεϊναιμία πάλι συμβαίνουν τα αντίθετα, λόγω μείωσης της παραγωγής του H<sub>2</sub>S και στους αιμοκαθαιρόμενους τα επίπεδά του είναι επίσης χαμηλά. Έλλειψη της CBS οδηγεί σε υπερομοκυστεϊναιμία με σχετιζόμενα καρδιαγγειακά, οφθαλμικά, νευρολογικά και σκελετικά προβλήματα, έλλειψη της CSE παράγει κυσταθειονινουρία και σχετίζεται με άποιο διαβήτη, σύνδρομο Down, νευροβλάστωμα, ηπατοβλάστωμα και κοιλιοκάκη και τέλος έλλειψη της 3-MST οδηγεί σε δισουλφιδουρία της μερκαπτολακτικής κυστεΐνης και μπορεί να μη σχετίζεται υποχρεωτικά με νοητική υστέρηση. Με έγχυση του δότη GYY4137 το H<sub>2</sub>S του πλάσματος αυξήθηκε κατά 50μmol/L σε 30 λεπτά και παρέμεινε αυξημένο, έως και 3 ώρες μετά (Olson 2011).

Το H<sub>2</sub>S ασκεί ανασταλτική δράση στον NF-κB που κατέχει ρόλο-κλειδί σε καταστάσεις **φλεγμονής**. Η επαγωγή του NF-κB σε καταστάσεις φλεγμονής αυξάνει την ευαισθησία των T

κυττάρων στην υποξία, αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα της αδενοσίνης 2A (A<sub>2A</sub>R) και την παραγωγή του cAMP και στη συνέχεια την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A, χωρίς να αλλάζουν τα επίπεδα αδενοσίνης από την παρέμβαση του ενζύμου της απαμινάσης της αδενοσίνης. Επομένως, συμβαίνει αδενοσυνεργική ανοσοκαταστολή των T κυττάρων μέσω του H<sub>2</sub>S (εικόνα 24) (Bruzzeze, Fromonot et al. 2014).



Εικόνα 24: Μοντέλο αδενοσυνεργικής σηματοδότησης στα T κύτταρα σε υποξία. Ανατύπωση από (Bruzzeze, Fromonot et al. 2014)

Το H<sub>2</sub>S αποτελεί ‘‘δίκωπο μαχαίρι’’, εφόσον σε υπερβολική συγκέντρωση δρα ως δηλητήριο για τα κύτταρα. Χαρακτηριστική είναι και η αμφιθυμία του μορίου σε μοντέλα εγκεφαλικών εμφράκτων, όπου στην αρχή το H<sub>2</sub>S προκάλεσε υποθερμία και μείωσε κατά 50% το μέγεθος του εμφράκτου, χωρίς όμως νευρολογικά ελλείμματα, ενώ η μετέπειτα χορήγηση NaHS αύξησε τον όγκο του εμφράκτου στη μέση εγκεφαλική αρτηρία (Wang 2012).

### 1.19.2. H<sub>2</sub>S και ΛΜΚΑ

Ένα γεγονός που ελκύει το ενδιαφέρον είναι ότι η χάλαση των ΛΜΚ των αεραγωγών που προκαλείται από το H<sub>2</sub>S είναι ανεξάρτητη από τους K<sub>ATP</sub> διαύλους ή τη NOS ή την απογύμνωση του επιθηλίου. Αυτό αποδείχθηκε σε τραχεία ποντικών προσυσταλή με ACh ή KCl, όπου η προσθήκη NaHS προκάλεσε χάλαση ανθεκτική σε αναστολείς K<sub>ATP</sub> διαύλων, διαλυτή γουανυλική κυκλάση, COX-1,2 ή ανταγωνιστές υποδοχέων ταχυκινίνης (Chen and Wang 2012).

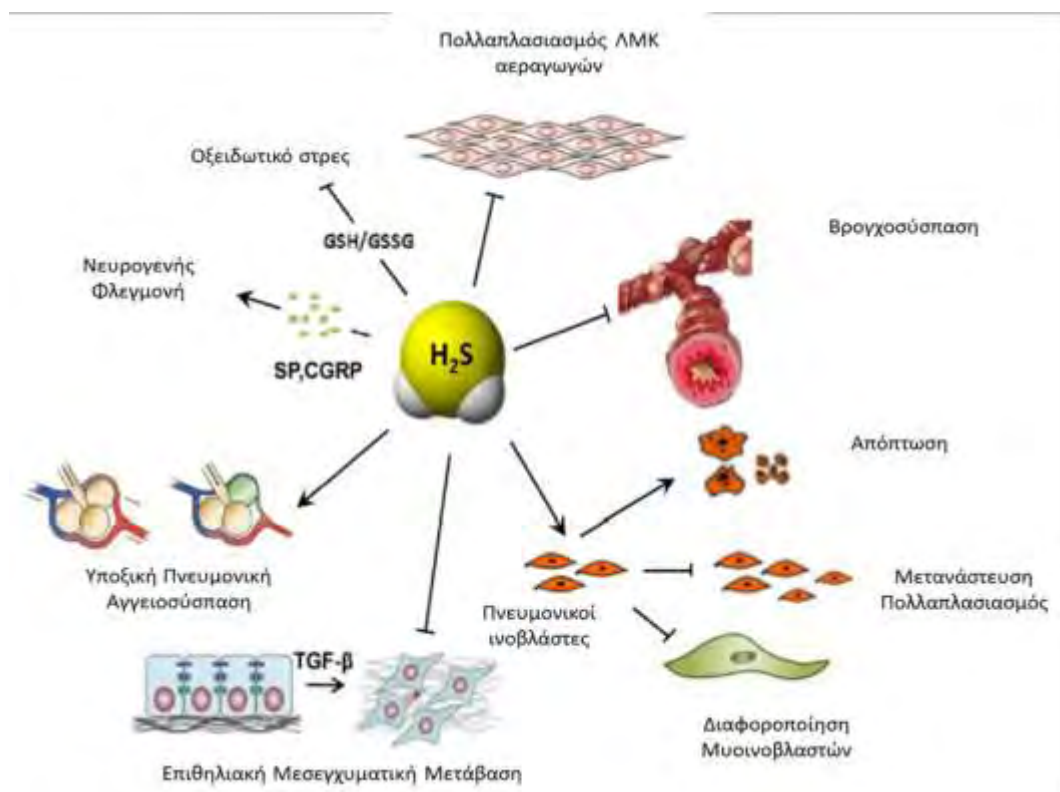
Έχει βρεθεί ότι η L- κυστεΐνη προκαλεί δόσοεξαρτώμενη χάλαση στα περιφερικά βρογχόλια. Ακόμη, το H<sub>2</sub>S φαίνεται ότι επάγει την παραγωγή αισθητικών νευροπεπτιδίων (όπως η ουσία P και το CGRP), εξαιτίας της ενεργοποίησης TRPV1 υποδοχέων (transient receptor potential



vanilloid type 1), ενός μη εκλεκτικού κατιονικού διαύλου, οδηγώντας σε βρογχοσυστολή και επίταση της φλεγμονής στη σήψη (μηχανισμός νευρογενούς φλεγμονής) (Chen and Wang 2012). Όταν τα αισθητικά νεύρα απευαισθητοποιούνταν με καψαϊκίνη ή καψαζεπίνη, το H<sub>2</sub>S φάνηκε να προκαλεί σχετική χάλαση και προστασία έναντι της πνευμονικής φλεγμονώδους βλάβης. Ο μηχανισμός δράσης εμπλέκει τα ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου. Συγκεκριμένα, το H<sub>2</sub>S προκαλεί μειωμένη εισροή ασβεστίου και αναστολή απελευθέρωσής του από ενδοκυττάρια αποθήκες μέσω Insp3R (inositol triphosphate receptor). Σε αγγειακά ΛΜΚ υπό ορισμένες συνθήκες όπως η υποξία και η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου, οδηγούν τη CSE να μεταναστεύσει στα μιτοχόνδρια για την ενεργοποίηση της παραγωγής ATP. Επίσης, ένας άλλος μηχανισμός που συζητείται και παρακάτω είναι η επιρροή των διαύλων καλίου στα ΛΜΚ των αγγείων και των αεραγωγών προκαλώντας υπερπόλωση της μεμβράνης μέσω ενεργοποίησης των BKCa διαύλων (που θα αυξήσουν το ρεύμα καλίου προς τα έξω) και χάλαση (Hatziefthimiou A. 2015)

Ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Atf3 (activating transcription factor 3) περιορίζει την έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και ελέγχει την ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιαστικών και αποπτωτικών σημάτων στα ΛΜΚΑ (εικόνα 25). Η εφαρμογή του NaHS μείωσε την επαγόμενη από όζον αύξηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου ουδετερόφιλων και μακροφάγων αλλά και των σύστοιχων κυτταροκινών σε BAL (Chen and Wang 2012).

Η πνευμονική ίνωση αποτελεί το κοινό μονοπάτι μιας συστάδας διαφορετικών πνευμονολογικών διαταραχών, γνωστές ως διάμεσοι πνευμονικοί νόσοι. Χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση ινοβλαστών, μυοϊνοβλαστών, καθώς και στην υπερβολική εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας (κύρια κολλαγόνου) και την επακόλουθη κυψελιδική διαταραχή αρχής γενομένης από μικροτραυματισμούς του κυψελιδικού επιθηλίου. Οι ινοβλάστες στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση είναι ανθεκτικοί στην απόπτωση. Το H<sub>2</sub>S φαίνεται να υποστηρίζει τη διατήρηση του κυψελιδικού επιθηλιακού φαινοτύπου, εφόσον ο TGF-β1 επάγει τη μετάβαση των κυττάρων από επιθηλιακής σε μεσεγγυματικής αρχής, επάγει τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ και την εναπόθεση συνδετικού ιστού κι αυτή η δράση καταστέλλεται από το H<sub>2</sub>S, μέσω μείωσης της φωσφορυλίωσης των Smad2/3 και των ERK1/2 και p38MAPK στους πνεύμονες, αλλά και την αύξηση του σχηματισμού μικροπυρηνίσκων, τη σταθεροποίηση του p53 και τη μετάβαση της Bax από το κυτοσόλιο στα μιτοχόνδρια για την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Το H<sub>2</sub>S οδηγούσε σε καταστολή μετανάστευσης των ινοβλαστών, πολλαπλασιασμού αυτών και αλλαγή φαινοτύπου προκύπτουσα από αυξητικούς παράγοντες, όπως FGF, PDGF και TGF-β, ενώ προκαλούσε μείωση της έκφρασης βιμεντίνης και αύξηση των επιπέδων ε-καδherίνης όσον αφορά το αναπνευστικό επιθήλιο (Hatziefthimiou A. 2015).



Εικόνα 25: Μηχανισμοί δράσης  $H_2S$  στις χρόνιες αναπνευστικές νόσους. (Chen-the message)

Επιπλέον, το  $H_2S$  ενέχει αντιοξειδωτική δράση στον πνεύμονα, εφόσον τα επίπεδα MDA (malondialdehyde) σε πνευμονικό ιστό με FRGS (free radical generating system) μετά από έκθεση σε NaHS ήταν μειωμένα. Σε μελέτες πνευμονικής υπέρτασης, χορήγηση PPG για 4 εβδομάδες ανέστειλε την απόπτωση των ΛΜΚ, επάγοντας την έκφραση Fas και κασπάσης-3 και αναστέλλοντας την έκφραση bcl-2, γεγονός που υποδεικνύει τον ανασταλτικό ρόλο του  $H_2S$  στην αναδιαμόρφωση των πνευμονικών αγγείων. Επίσης, το NaHS μείωσε την έκφραση κολλαγόνου I και III, ελαστίνης, προκολλαγόνου I και III και TGF- $\beta$  σε συνθήκες υποξίας (Chen and Wang 2012).

### 1.20. Διαγνωστική και θεραπευτική σημασία του $H_2S$

Το  $H_2S$  λοιπόν, φαίνεται να κατέχει βασικό ρόλο στην παθοφυσιολογία των αναπνευστικών νόσων και προτείνεται ως βιοδείκτης για νόσους όπως το άσθμα, η ΧΑΠ και η πνευμονική ίνωση. Επίσης προτείνεται ως δείκτης ορού για την ανάγκη έναρξης αντιβιοτικής αγωγής σε ασθενείς με έξαρση ΧΑΠ. Φαίνεται να υπάρχει θετική συσχέτιση  $H_2S$  με FEV1 (forced expiratory volume 1), αντίστροφη συσχέτιση με τη CRP του ορού και αρνητική με τον αριθμό των ουδετερόφιλων στα πτύελα των ασθενών. Επίσης, αυξημένο FeNO (κλάσμα εκπνεόμενου

NO) και εκπνεόμενο CO συσχετίστηκαν με πνευμονική παθολογία (εκτός των μεταμοσχευμένων) (Chen and Wang 2012).

Επομένως, τα επίπεδα  $H_2S$  μπορούν να αντανakλούν μειωμένη πνευμονική λειτουργία και προτείνεται η μέτρησή του από τη μύτη για την ακριβή εντόπιση του μεταβολισμού του στο αναπνευστικό. Ο εντοπισμός του, όμως δεν είναι εύκολος λόγω της αλλαγής της διαθεσιμότητάς του στον οργανισμό από το ποσοστό αυτού που εισπνέεται από τον ατμοσφαιρικό αέρα (Chen and Wang 2012). Γίνονται προσπάθειες για προσδιορισμό των επιπέδων του ρινικά εκπνεόμενου  $H_2S$ , αποφεύγοντας έτσι το ποσό  $H_2S$  που παράγεται από τα βακτήρια και σ' αυτό συμβάλλει η αέρια χρωματογραφία με το συνδιασμό θερμικής εκρόφησης και ανίχνευσης φωτομετρικής παλμικής φλόγας με σκοπό να ελέγξουμε και την ανταπόκριση στη θεραπεία με κορτικοειδή. Πιο πολύ μας ενδιαφέρει η σχέση του ενδογενώς παραγόμενου  $H_2S$  με τους ήδη υπάρχοντες φλεγμονώδεις δείκτες στα πτύελα, το υλικό βιοψίας και το BAL (Chen-the message). Από τις μέχρι τώρα προτεινόμενες μεθόδους για ανίχνευση του  $H_2S$  είναι η τροποποιημένης Biotin Switch Assay, της Maleimide Assay και της Tag Switch Assay (Paul and Snyder 2015) και η πολαρογραφία (Hughes, Centelles et al. 2009).

Επίσης, η ανάπτυξη στοχευμένου δρώντος δότη  $H_2S$  στη μυοκαρδιακή κυκλοφορία κρίνεται απαιτητική. Προσπάθειες γίνονται για εναπόθεση στην κυκλοφορία μικροφουσαλίδων με perfluorocarbon μέσω υπερηχογραφικής καθοδήγησης, που θα αποδίδουν  $H_2S$  στα μικρά αγγεία του μυοκαρδίου. Επιπλέον, ρηζικέλευθη προσέγγιση αποτελούν και οι δότες  $H_2S$  που στοχεύουν στα μιτοχόνδρια, που διαμεσολαβούν το οξειδωτικό στρες και την κυτταρική βλάβη (Polhemus and Lefer 2014).

Τα ένζυμα που παράγουν αεροδιαβιβαστές και έχουν ρυθμιστικό ρόλο σε οξειδοαναγωγικές καταστάσεις στην υποξία, αποτελούν θεραπευτικό στόχο. Για παράδειγμα, η έλλειψη των ενζύμων CBS και CSE δύναται να προκαλέσει νοητική υστέρηση, παρεκτόπιση οπτικού φακού, σκελετικές ανωμαλίες, καθώς και τάση για θρομβοεμβολικά επεισόδια (Hughes, Centelles et al. 2009).

Εξαιρετικά χρήσιμες θεωρούνται οι κυτταροπροστατευτικές δράσεις του  $H_2S$  και ερευνητικά γίνεται προσπάθεια αξιοποίησής τους σε συνέργεια με φάρμακα που προκαλούν πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες. Σύζευξη του  $H_2S$  είναι δυνατή με ΜΣΑΦ, αντιχολινεργικά, ντοπαμινεργικά και αναστολείς αγγειοτενσίνης I, αλλά και ασπιρίνης (χωρίς να επηρεάζει τη σύνθεση TXA) (Olson 2011).

Η χρήση δοτών  $H_2S$  συζητιέται θεραπευτικά για την ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο και την γαστρεντεροπάθεια από χρήση ΜΣΑΦ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ATB-429 που είναι παράγωγο μεσαλαμίνης (5-ASA) και δότης  $H_2S$ . Το ATB-429 φάνηκε ότι πέρα από αντιφλεγμονώδη κατείχε και αναλγητική δράση, λόγω του ότι το  $H_2S$  που απελευθερώνεται έχει

νευροτροποποιητικές δράσεις στον εγκέφαλο. Ομοίως, το ATB-346 ως παράγωγο ναπροξένης και δότης του  $H_2S$ , προτείνεται στη θεραπεία της αρθρίτιδας, χωρίς όμως τις αντίστοιχες παρενέργειες των ΜΣΑΦ στο γαστρεντερικό και το καρδιαγγειακό σύστημα (Guo, Cheng et al. 2013).

### 1.21. $H_2S$ και υποξία

Η αίσθηση της υποξίας που κατέχει στο σώμα μας επιτυγχάνεται με περιφερικούς χημειούποδοχείς, που αντιλαμβάνονται αλλαγές στη συγκέντρωση του οξυγόνου. Βασικό παίχτη στην όλη διαδικασία αποτελεί το καρωτιδικό σωματίο, μία ομάδα εξειδικευμένων νευροενδοκρινικών κυττάρων που βρίσκονται στο διχασμό της κοινής καρωτίδας σε έξω και έσω καρωτίδα και νευρώνονται από το νεύρο του καρωτιδικού κόλπου, κλάδου του γλωσσοφαρυγγικού. Διακρίνεται σε δύο κυτταρικούς τύπους, τα τύπου I κύτταρα (glomus) και τα τύπου II. Τα τύπου I κύτταρα αποτελούν τις πρωταρχικές θέσεις αίσθησης της υποξίας σε συνεργασία με τις γειτονικές αισθητικές νευρικές απολήξεις. Στη νορμοξία η εκφόρτιση των νευρώνων είναι χαμηλή, αλλά αυξάνει δραματικά με την πτώση της  $PO_2$  (π.χ. από 100mmHg σε 60-80mmHg) και η απόκριση των αισθητήρων των μεταβολών στην υποξία συμβαίνει μέσα σε δευτερόλεπτα. Συγκεκριμένα, η υποξία αναστέλλει διαύλους καλίου στα τύπου I κύτταρα, οδηγώντας σε εκπόλωση των κυττάρων και απελευθέρωση  $Ca^{++}$  μέσω διεγερτικών νευροδιαβιβαστών που θα ενεργοποιήσουν τις γειτονικές νευρικές απολήξεις, οδηγώντας σε αύξηση της εκφόρτισης των νευρώνων που είναι υπεύθυνοι για την αίσθηση μεταβολών στα επίπεδα οξυγόνου (Prabhakar 2013).

Οι αναστολείς NOS ενεργοποιούν, ενώ οι δότες NO αναστέλλουν τη δραστηριότητα του καρωτιδικού σωματίου, τροποποιώντας τα επίπεδα cGMP. Η απόκριση του καρωτιδικού σωματίου στην υποξία αυξάνει απουσία της “αναστολής των απαγωγών νεύρων” (efferent inhibition). Δεδομένου ότι τα νεύρα του καρωτιδικού κόλπου εκφράζουν nNOS, αλλά και σε παραγάγγλια κατά μήκος του γλωσσοφαρυγγικού, προτάθηκε ότι το NO μεσολαβεί την “αναστολή των απαγωγών νεύρων”. Έτσι, οι δότες NO ενισχύουν την αγωγή  $K^+$  και αναστέλλουν τους L-τύπου τασεοεξαρτώμενους διαύλους  $Ca^{++}$  στα κύτταρα του καρωτιδικού σωματίου, συστήνοντας το NO ως κατασταλτικό της διεγερσιμότητάς τους. Απουσία eNOS, τα κύτταρα υπερπλάθονται, υπάρχει επίμονη αγγειοσύσπαση και μειωμένη ροή και χρόνια ιστική υποξία (Prabhakar and Semenza 2012).

Το CO φαίνεται να έχει ρόλο-κλειδί στη ρύθμιση της ικανότητας του καρωτιδικού σωματίου να αντιλαμβάνεται τα επίπεδα οξυγόνου σε νορμοξία. Είναι γνωστό ότι η παραγωγή του  $H_2S$  επαγόμενη από την υποξία στα τύπου I κύτταρα του καρωτιδικού σωματίου απαιτεί την αλληλεπίδραση της CSE με την HO-2 (το ένζυμο που παράγει το CO). Το CO προκύπτει από

την αποδόμηση της αίμης από την HO, με την NADPH και την αναγωγή του κυτοχρώματος P-450 ως συμπαράγοντες και το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την ενζυματική γένεση του. Το ενδογενές CO είναι αναστολέας της δραστηριότητας του καρωτιδικού σωματίου. Το ίδιο ισχύει για χαμηλές συγκεντρώσεις εξωγενώς χορηγούμενου CO, αντίθετα με τη χορήγησή του σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις οπότε και διεγείρει τη δραστηριότητα του καρωτιδικού σωματίου. Στη νορμοξία, αυτό που διατηρεί τη δραστηριότητα του καρωτιδικού σωματίου χαμηλή είναι τα υψηλά επίπεδα CO, ενώ μειωμένος σχηματισμός CO οδηγεί σε διέγερση του καρωτιδικού σωματίου στην υποξία. Επιπλέον, οι αναστολές της μιτοχονδριακής οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι γνωστοί για τη διεγερτική δράση τους στο καρωτιδικό σωματίο, ανάμεσά τους και το CO (Prabhakar 2013).

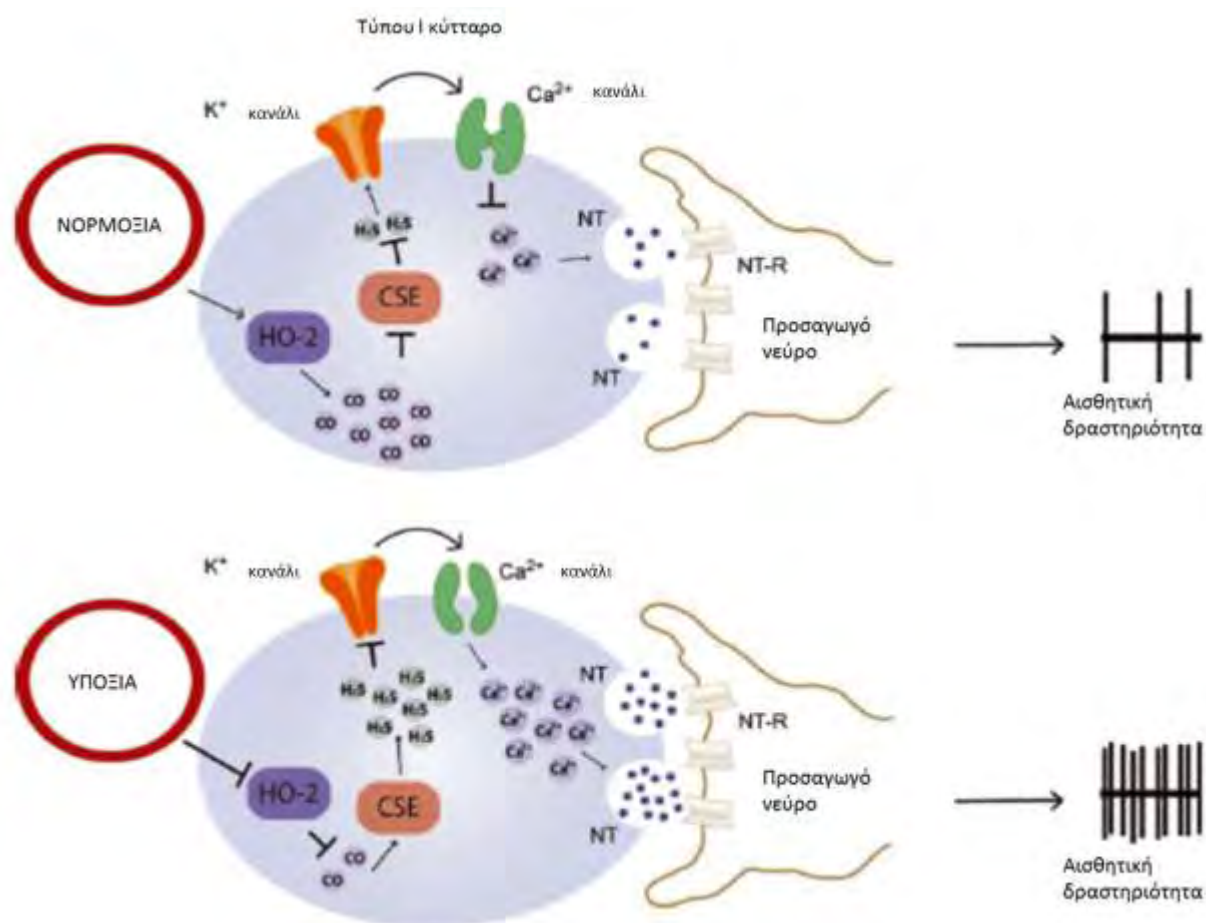
Σε πειράματα ποντικών που εκτέθηκαν σε συνθήκες υποξίας, φάνηκε ότι οι ποντικοί δεν μπορούν να επιβιώσουν σε υποξία με 5% οξυγόνο για πάνω από 15 λεπτά και η προσθήκη 150ppm H<sub>2</sub>S για 20 λεπτά τους το εξασφάλισε αυτό, μειώνοντας τη θερμοκρασία του πυρήνα και μειώνοντας αντίστοιχα το μεταβολικό ρυθμό (Zhao, Biggs et al. 2014).

Η συστηματική χορήγηση H<sub>2</sub>S έχει βρεθεί ότι διεγείρει την αναπνοή μέσω του χημειοαντανακλαστικού του καρωτιδικού σωματίου. Εξωγενώς χορηγούμενο, με τη μορφή του γρήγορου δότη NaHS (που η δράση του ξεκινά μέσα σε δευτερόλεπτα), το H<sub>2</sub>S αυξάνει την απόκριση των νευρώνων, υπεύθυνων για την αίσθηση μεταβολών στα επίπεδα οξυγόνου με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Το NaHS (υδροθειούχο νάτριο) αναστέλλει τους maxi-K<sup>+</sup> και τους TASK-like διαύλους K<sup>+</sup> και εκπολώνει τα κύτταρα τύπου I, με αποτέλεσμα να αυξάνει η [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, γεγονός που αναιρείται σε χαμηλή εξωκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου ή voltage clamping στο δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης (Prabhakar 2013)

Η σύνθεση του H<sub>2</sub>S στο καρωτιδικό σωματίο επηρεάζεται από το οξυγόνο. Τα επίπεδά του διατηρούνται χαμηλά σε νορμοξία και σε διέγερση του καρωτιδικού σωματίου σε συνθήκες υποξίας αυξάνουν. Το CO αναστέλλει τη γένεση του H<sub>2</sub>S με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, μέσω αναστολής της CSE. Σε συνθήκες υποξίας, τα μειωμένα επίπεδα CO, αίρουν την αναστολή στην CSE (μέσω μείωσης της HO-2) και τα επίπεδα H<sub>2</sub>S αυξάνουν. Έτσι, συσχετίστηκαν και τα χαμηλά επίπεδα H<sub>2</sub>S στην νορμοξία, ως απότοκο της ανασταλτικής δράσης του CO. Επιπρόσθετα, και η αναστολή της οξείδωσης του υδροθείου, λόγω της αναστολής της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην υποξία, φαίνεται ότι συνεισφέρει στα αυξημένα επίπεδά του σε συνθήκες υποξίας. Επομένως, το H<sub>2</sub>S με τα παρόντα δεδομένα συγκαταλέγεται ως “μεσολαβητής” στην αισθητική διέγερση του καρωτιδικού σωματίου στην υποξία και όχι ως “αισθητήρας του οξυγόνου”. Παρ’ όλα αυτά, το γεγονός ότι οι απαιτούμενες συγκεντρώσεις του H<sub>2</sub>S για την πρόκληση διέγερσης και αναπνευστικής απόκρισης είναι πολύ μεγαλύτερες από

αυτές του ενδογενώς παραγόμενου  $H_2S$ , συνιστούν ότι υπάρχει ακόμη πολύς δρόμος στη διαλεύκανση του φυσιολογικού ρόλου του  $H_2S$  (Prabhakar 2013).

Η ακετυλοχολίνη (ACh) και η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) είναι διεγερτικοί διαβιβαστές, που εμπλέκονται στην μεταβίβαση του υποξικού ερεθίσματος στο καρωτιδικό σωματίο. Ένας αναστολέας των νικοτινικών υποδοχέων, αποτρέπει την επαγόμενη από NaHS διέγερση του καρωτιδικού σωματίου. Το  $Na_2S$  (θειούχο νάτριο) ανέστειλε την απελευθέρωση ACh και είχε πολλαπλές επιδράσεις στην απελευθέρωση ATP από το καρωτιδικό σωματίο (Prabhakar and Semenza 2012).

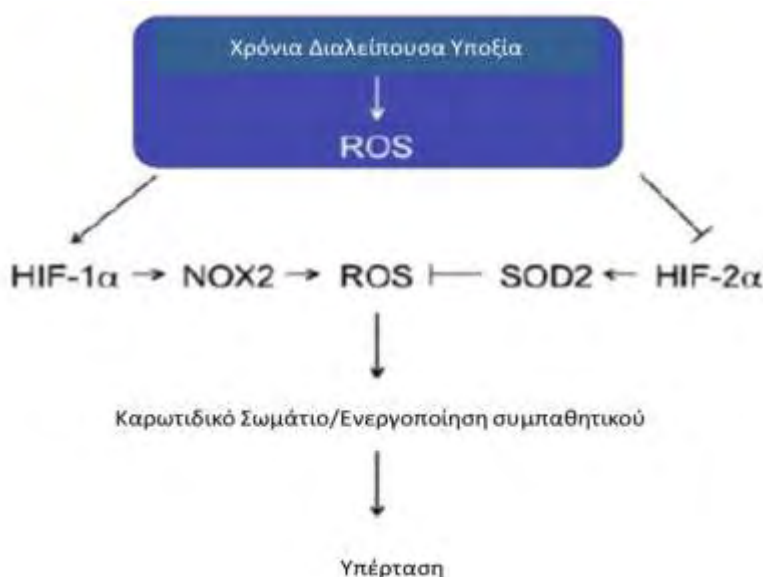


Εικόνα 26: Αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων του HO-2 (heme oxygenase-2) παραγόμενου CO με το  $H_2S$  που παράγεται μέσω CSE (cystathione-γ-lyase) και οι επιδράσεις τους στην αισθητική απόκριση του καρωτιδικού σωματίου σε νορμοξία και υποξία.

Η απόκριση του καρωτιδικού σωματίου στην υποξία ρυθμίζεται από τους μεταγραφικούς ενεργοποιητές HIFs. Τα τύπου I κύτταρα του καρωτιδικού σωματίου εκφράζουν τόσο HIF-1α όσο και HIF-2α με επικράτηση του δεύτερου ποσοτικά. Συγκεκριμένα, ποντίκια HIF-1α +/- παρουσίαζαν βλάβη στην απόκριση σε υποξία (υποευαίσθητα), σε αντίθεση με HIF-2α +/-

ποντίκια που εμφάνιζαν αυξημένη απόκριση του καρωτιδικού σωματίου με κλινική εικόνα άπνοιας, υπέρτασης και αυξημένων κατεχολαμινών στο αίμα (υπερευαίσθητα). Οι HIFs, όπως προαναφέρθηκε, μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση πληθώρας γονιδίων με αντικρουόμενες λειτουργίες, μεταξύ των οποίων είναι και γονίδια ιοντικών διαύλων ή αντιοξειδωτικά γονίδια. Για παράδειγμα, ο HIF-1 επηρεάζει την έκφραση των προ-οξειδωτικών γονιδίων (π.χ. NADPH οξειδάσες) και ο HIF-2 επηρεάζει την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Prabhakar 2013).

Στη χρόνια διαλείπουσα υποξία, το καρωτιδικό σωματίο απευαισθητοποιείται και αυξάνει η έκφραση iNOS. Εκεί, ο HIF-2α απαιτείται για την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων και την έκφραση SOD2 mRNA (που κωδικοποιεί τη δισμουτάση του υπεροξειδίου του μαγγανίου), ενώ αντίθετα σε HIF-1α<sup>+/−</sup> ποντικούς επηρεάζεται η έκφραση NOX2 mRNA (που κωδικοποιεί την NADPH οξειδάση). Τα αυξημένα επίπεδα ROS που προκύπτουν παίζουν βασικό ρόλο στη δυσρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και της αναπνοής (εικόνα 27) (Prabhakar and Semenza 2012). Προτεινόμενη λύση στο πρόβλημα της υπέρτασης που προκύπτει εδώ είναι η χορήγηση MnTMPyP (a superoxide scavenger) που καταστέλλει τη δραστηριότητα του HIF και των κατεχολαμινών (Semenza 2014)



Εικόνα 27: Συσχέτιση HIFs με την παραγωγή ROS και την υπέρταση σε ασθενείς με χρόνια διαλείπουσα υποξία. Ανατύπωση από (Prabhakar and Semenza 2012)

### 1.21.1. Επίδραση του HIF-1α στην παραγωγή και δράση του H<sub>2</sub>S

Οι ευεργετικές δράσεις του H<sub>2</sub>S σε υποξικές καταστάσεις, όπως οι ελκωτικές βλάβες στην κολίτιδα μεσολαβούνται από τη σταθεροποίηση του HIF-1α. Γενικά, η υποξία ρυθμίζει την έκφραση ενζύμων που παράγουν CSE, συμπεριλαμβανομένου και της αύξησης του CTH (γονίδιο CSE) mRNA (Kloesch, Steiner et al. 2016) και η sp1 επάγει την έκφραση της CTH,

ενός μεταγραφικού ρυθμιστή του CSE γονιδίου (Osmond JM 2014). Στα έλκη έχει βρεθεί ότι μειώνονται τα επίπεδα SQR και η CSE αναστέλλεται, μειώνοντας τα επίπεδα έκφρασης του TFF3 (προστατευτικού γονιδίου-στόχου του HIF). Θεραπεία με αναστολείς PHDs φάνηκε προστατευτική και οδηγούσε σε λύση της φλεγμονής, ενώ η σταθεροποίηση του HIF-1α ανέστειλε τα επίπεδα παραγωγής H<sub>2</sub>S από το κόλον, προτείνοντας ένα μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης. Μέχρι τώρα, δεν έχει αποσαφηνιστεί αν η σουλφυδρίωση του HIF ή των PHDs παρέχει μία λειτουργική αλλαγή στους μοριακούς στόχους (Flannigan, Agbor et al. 2015).

### **1.21.2. Επίδραση του H<sub>2</sub>S στα επίπεδα και τη δράση του HIF-1α**

Πέρα από την επίδραση του HIF-1<sup>α</sup> στο H<sub>2</sub>S υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν και την ανάστροφη αλληλεπίδραση. Με εφαρμογή του δότη του H<sub>2</sub>S DADS (diallyl disulfide) που βρίσκεται στο σκόρδο και απελευθερώνει πολυσουλφίδια, σταθεροποιήθηκε η έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα εντερικού βλεννογόνου από κρατήρες ελκών και μειώθηκε η σοβαρότητα της φλεγμονώδους κολίτιδας. Επίσης, το DADS μετά την πάροδο 24 ωρών διατήρησε τα επίπεδα του HIF-1α και μετά από το χρονικό σημείο αναμενόμενης επανόδου τους στα φυσιολογικά επίπεδα (Flannigan, Agbor et al. 2015). Πειράματα που έγιναν σε νευρικά κύτταρα PC12 με υποξία επαγόμενη από CoCl<sub>2</sub> έδειξαν ότι το H<sub>2</sub>S προστατεύει τα κύτταρα μέσω ενίσχυσης της Hsp90 (Heat-shock protein 90). Στα νευρικά κύτταρα η ERK1/2 ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες, ενώ οι JNK και p38MAPK ενεργοποιούνται από περιβαλλοντικό stress και φλεγμονώδεις κυτταροκίνες προς κυτταρικό θάνατο. Παρόλο που το CoCl<sub>2</sub> καταστέλλει την έκφραση της CBS, το H<sub>2</sub>S που παράγεται είναι αρκετό για να καταστείλει και τα 3 μονοπάτια των κινασών αποτελεσματικά, προλαμβάνοντας την από υποξία επαγόμενη οξειδωτική βλάβη. Το υπεροξείδιο του οξυγόνου σε συνθήκες υποξίας φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις JNK, p38MAPK και τις ERK1/2, γεγονός που αντιστρέφει η NAC (N-acetylcysteine) (Lan, Liao et al. 2011).



## 2. Σκοπός εργασίας

Τα ΛΜΚ των αεραγωγών κατέχουν κεντρικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών στις χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους, όπως το άσθμα και η ΧΑΠ. Το χολινεργικό σύστημα επηρεάζει τη λειτουργία τους και το μικροπεριβάλλον που διαμορφώνεται από τα διάφορα ερεθίσματα τροποποιεί τη δράση τους.

Από μελέτες έχει φανεί ότι οι αεροδιαβιβαστές είναι πολλά υποσχόμενα μόρια για τη διάγνωση και θεραπεία μιας πληθώρας κλινικών οντοτήτων. Ανάμεσά τους το  $H_2S$  υποστηρίζεται ότι έχει διασταλτική επίδραση στα ΛΜΚ των αγγείων και των αεραγωγών και εμπλέκεται σε διάφορες σηματοδοτικές οδούς, επηρεάζοντας την κυτταρική απόκριση σε ερεθίσματα, ανάμεσα στα οποία συγκαταλέγεται και η υποξία. Σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου επάγεται η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1, που ρυθμίζει με τη σειρά του την έκφραση πολλών γονιδίων, συντελώντας στη διατήρηση της ομοιοστασίας του κυττάρου.

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να μελετηθεί ο ρόλος του  $H_2S$  στην απόκριση πρωτογενών ΛΜΚ αεραγωγών σε συνθήκες υποξίας και στη συστολή των ΛΜΚ.

Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε α. η έκφραση του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α, β. η επίδραση της αναστολής του ενζύμου CSE, το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή ενδογενούς  $H_2S$  στην έκφραση του HIF-1α και γ. η επίδραση του εξωγενούς  $H_2S$  στη σύσπαση των ΛΜΚΑ μετά από προσθήκη ACh σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Καλλιέργεια λείων μυϊκών κυττάρων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων τραχείας από κουνέλι. Η ταυτοποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων έγινε με χρώση με αντίσωμα κατά της α-ακτίνης του λείου μυός (SM-α actin). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες επιφάνειας 75cm<sup>2</sup> χρησιμοποιώντας θρεπτικό μέσο DMEM-F12 το οποίο περιείχε 10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100mg/ml στρεπτομυκίνη. Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε υγρανόμενο κλίβανο επώασης σε θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>. Κάθε 48-72h γινόταν αλλαγή του θρεπτικού μέσου. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν το 80-100% της επιφάνειας της φλάσκας γινόταν ανακαλλιέργεια. Συγκεκριμένα, γινόταν αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και μία πλύση της καλλιέργειας με αποστειρωμένο διάλυμα φωσφορικών αλάτων (1X PBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,46mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Ακολουθούσε προσθήκη διαλύματος 0,25% τρυψίνης-0,53mM EDTA, επώαση μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας, προσθήκη θρεπτικού μέσου, που περιείχε FBS, προκειμένου να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη και επαναιώρηση των κυττάρων. Τα κύτταρα μοιραζόντουσαν σε φλάσκες ή σε πιάτα καλλιέργειας και γινόταν προσθήκη θρεπτικού μέσου. Όλοι οι χειρισμοί έγιναν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, σε άσηπτες συνθήκες.

#### 3.2. Έναρξη καλλιεργειών

Για την έναρξη της καλλιέργειας, φυαλίδια (cryovial), που περιείχαν τα κύτταρα, μεταφέρθηκαν από τους -80 °C σε υδατόλουτρο των 37 °C ώστε να ξεπαγώσουν υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρωσης τύπου falcon και έγινε προσθήκη με αργό ρυθμό προ-θερμασμένου θρεπτικού μέσου. Ακολούθησε φυγοκέντρωση (1000 rpm για 3min), ώστε να απομακρυνθεί το DMSO από τα κύτταρα. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο και μεταφέρθηκαν σε φλάσκες. Μετά από 48h έγινε παρατήρηση της καλλιέργειας στο μικροσκόπιο και αλλαγή θρεπτικού μέσου, ώστε να απομακρυνθούν τα νεκρά και τα μη προσκολληθέντα κύτταρα από την καλλιέργεια.

#### 3.3. Κατεργασία των κυττάρων

Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 10cm. Περίπου 1 ώρα πριν την προσθήκη παραγόντων έγινε αλλαγή του θρεπτικού μέσου.

Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία του μιμητή υποξίας CoCl<sub>2</sub> (100μM), των δοτών H<sub>2</sub>S: NaHS (100μM και 1000mM-Sodium Hydrosulfide Hydrate, Sigma-Aldrich, USA) και

GY4137 (100μM και 250μM-GY4137 Dichloromethane Complex, Sigma Life Sciences, USA), και του αναστολέα του ενζύμου CSE (ένζυμο σύνθεσης H<sub>2</sub>S) PPG (DL-propargylglycine, 10Mm, Sigma Life Sciences, USA) για 4 ή 24h. Η προσθήκη του NaHS και της PPG έγινε 30min, ενώ του GY4137 1h πριν την προσθήκη CoCl<sub>2</sub>.

### **3.4. Παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τα ΑΜΚ**

Από τα τριβλία καλλιέργειας αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με διάλυμα 1X PBS που περιείχε τον αναστολέα πρωτεασών φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο-φοθρίδιο (phenylmethylsulfonyl fluoride – PMSF, 100μg/ml). Στα τριβλία προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (lysis buffer) (πίνακας 5) και πραγματοποιήθηκε αποκόλληση των κυττάρων με χρήση cell scraper. Τα κυτταρικά λύματα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες τύπου eppendorf, αναδεύτηκαν με τη βοήθεια πιπέτας και επώαστηκαν στον πάγο για 15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (10.000 rpm για 30 λεπτά στους 4 °C), και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέους σωλήνες. Μέρος του εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και στο υπόλοιπο δείγμα έγινε προσθήκη διαλύματος Laemmli 4X (πίνακας 5) σε αναλογία 1:3, προκειμένου, να αναλυθούν σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανάλυση κατά Western. Τέλος, τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95 °C για 3 λεπτά και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

### **3.5. Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης κυτταρικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Bradford.**

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης στα δείγματα έγινε με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, να προσδένεται στις πρωτεΐνες, σε όξινο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μία σταθερή ιονική μορφή της χρωστικής που απορροφά στα 595nm.

Κατά την πειραματική διαδικασία, αναμείχθηκαν 5μL δείγματος από κάθε υπερκείμενο με 795μL dH<sub>2</sub>O, προστέθηκαν 200μL αντιδραστηρίου Bradford (Biorad), και ακολούθησε ανάδευση των δειγμάτων και μέτρηση της απορρόφησης τους σε φωτόμετρο στα 595nm. Για τον μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε τυφλό-δείγμα το οποίο περιείχε 800μL dH<sub>2</sub>O και 200μL αντιδραστήριο Bradford.

Τέλος, η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης έγινε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς αλβουμίνης (BSA).

Διάλυμα λύσης (Lysis buffer)	
Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Tris-HCl pH 7.5	25mM
NaCl	150mM
MgCl <sub>2</sub>	1mM
Triton X-100	1%
DTT	0.5mM
PMSF	0.2mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1mM

Διάλυμα Laemmli 4X*	
Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Tris-HCl pH 6.8	250mM
SDS	9.2%
Γλυκερόλη	40%
Κυανό της βρωμοφαινόλης	0.2%
DTT	100mM

Πίνακας 5: Διαλύματα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE.

### 3.6. Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE

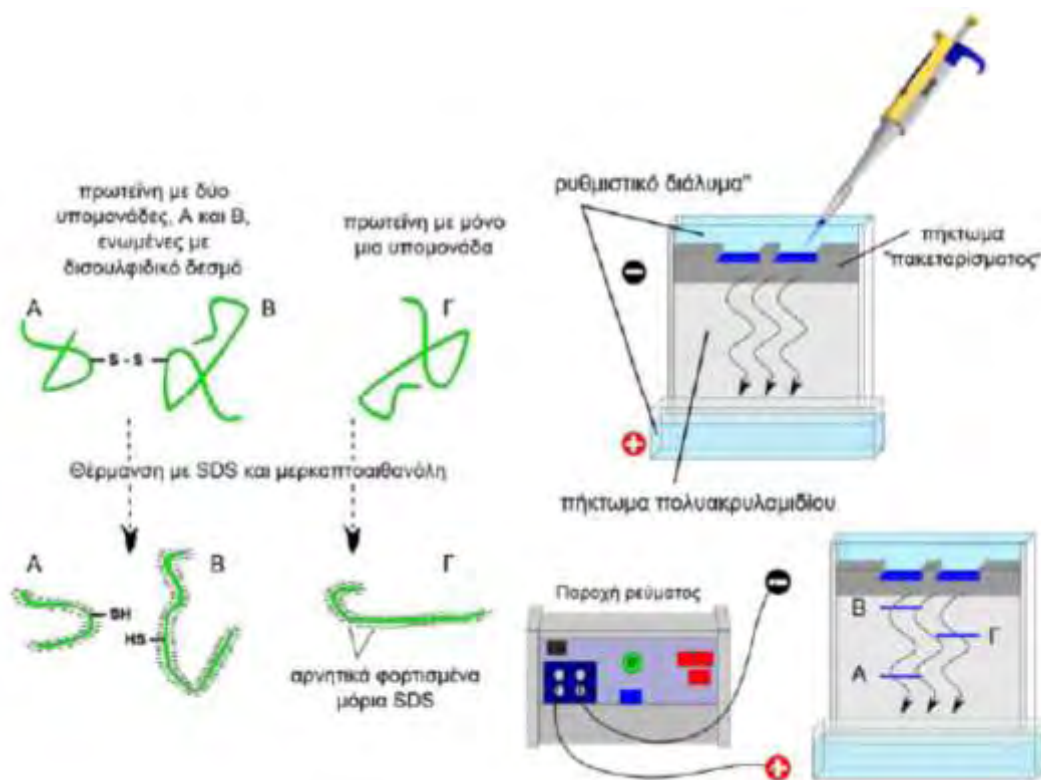
Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού που βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο.

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (MBA). Για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και το MBA χρησιμοποιούνται υπερθεϊκό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) και N,N,N,N-τετραμέθυλο-1,2-διάμινο-αιθάνιο (TEMED). Το TEMED επιταχύνει το ρυθμό σχηματισμού ελευθέρων ριζών οξυγόνου από το APS, και αυτές με τη σειρά τους καταλύουν τον πολυμερισμό.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μέσω πόρων που σχηματίζονται στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου, οι οποίοι λειτουργούν ως μοριακοί ηθμοί. Το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί επιλέγοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυακρυλαμιδίου και N-N μεθυλενο – δισ – ακρυλαμιδίου (MBA). Γενικά, πηκτή με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου έχει

μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο. Η ταχύτητα μετατόπισης των πρωτεϊνών στην πηκτή είναι ανάλογη του μοριακού βάρους και του φορτίου τους.

Το ανιονικό απορρυπαντικό δωδεκακυκλοθειικό νάτριο (SDS) είναι ένα απορρυπαντικό που μετά από βρασμό και σε συνδιασμό με έναν αναγωγικό παράγοντα (συνήθως DTT), διαταράσσει την ταταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών και μεταμορφώνει τις αναδιπλωμένες πρωτεΐνες σε γραμμικά μόρια, ενώ ταυτόχρονα καλύπτει την πρωτεΐνη με αρνητικό φορτίο, ούτως ώστε το φορτίο να είναι ανάλογο του μοριακού του βάρους. (εικόνα 28). Στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE), οι πρωτεΐνες κινούνται προς τη θετική άνοδο με διαφορετική ταχύτητα λόγω της τριβής με το gel και ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Οι μικρές πρωτεΐνες κινούνται πιο εύκολα μέσα στην πηκτή και προηγούνται των πιο μεγάλων πρωτεϊνών που κινούνται με πιο αργό ρυθμό. Για την αγωγή του ρεύματος απαιτείται ένα διακεκομμένο σύστημα ρυθμιστικού διαλύματος (Laemmli).



Εικόνα 28: Αποδιάταξη πρωτεϊνών από SDS. Προσαρμογή από (Campbell N. A. 2010)

Η SDS-PAGE είναι ασυνεχής ηλεκτροφόρηση και επιτυγχάνεται με την παρασκευή δύο διαφορετικών πηκτωμάτων: του πηκτώματος επιστοίβαξης (stacking gel) και του πηκτώματος διαχωρισμού (separating gel), τα οποία έχουν διαφορετικά μεγέθη πόρων, ιοντική ισχύ και pH (πίνακας 6).

<b>Πηκτή διαχωρισμού</b>	
Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Ακρυλαμίδιο/ Bis Ακρυλαμίδιο (50:1)	8%-12%
Tris-HCl (pH 8.8)	0.375M
EDTA	2mM
SDS	0.1%
APS	1.76mM
TEMED	13mM

<b>Πηκτή επιστοίβαξης</b>	
Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Ακρυλαμίδιο/ Bis Ακρυλαμίδιο (50:1)	4,5%
Tris-HCl (pH 8.8)	0.5M
EDTA	8mM
SDS	0.4%
APS	2.76mM
TEMED	21mM

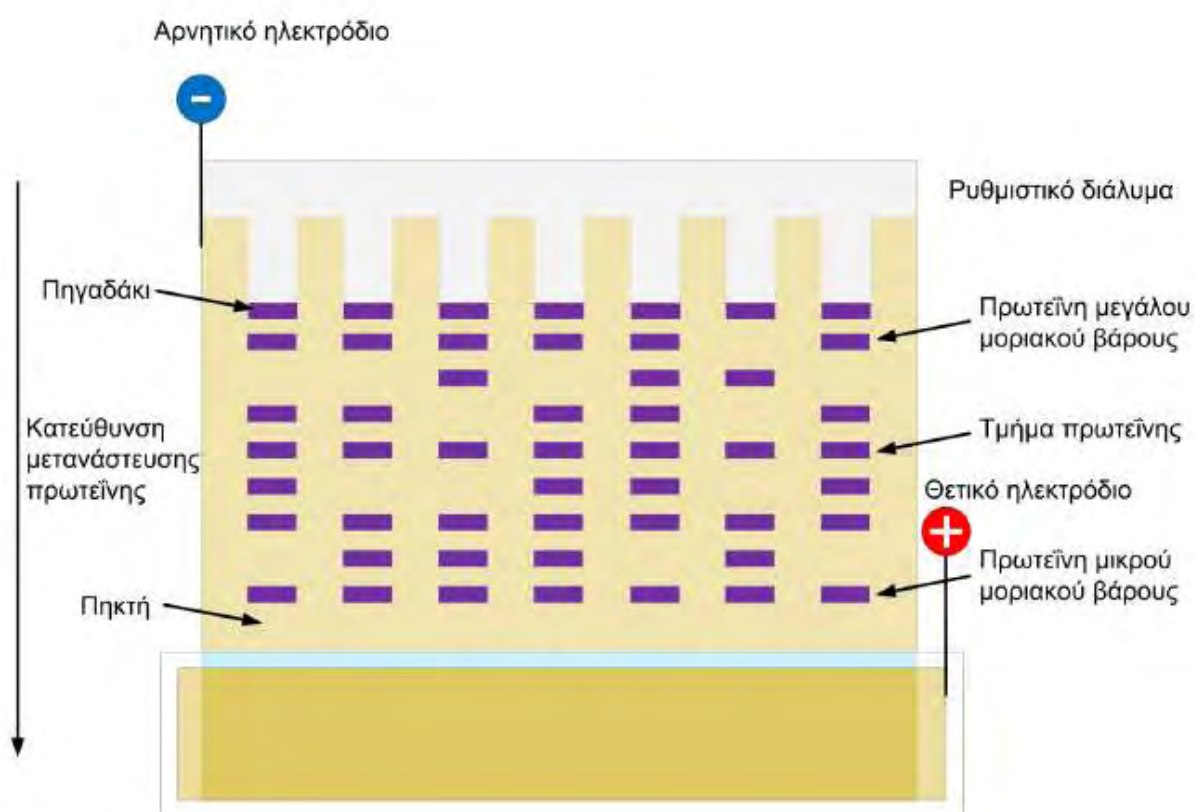
<b>Διάλυμα ηλεκτροφόρησης</b>	
Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Tris-HCl (pH 8.3)	50mM
Γλυκίνη	0.38M
SDS	0.1%
EDTA	2mM

*Πίνακας 6. Σύσταση διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE.*

Στην πηκτή επιστοίβαξης συμπυκνώνεται το πρωτεϊνικό δείγμα (λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης σε πολυακρυλαμίδιο) και στην πηκτή διαχωρισμού (που περιέχει περισσότερο ακρυλαμίδιο) πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Η συμπεριφορά των πρωτεϊνών στις δύο πηκτές καθορίζεται από το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, το οποίο περιέχει μεγάλη συγκέντρωση γλυκίνης. Η γλυκίνη εισερχόμενη στην πηκτή επιστοίβαξης αλλάζει το αρνητικό της φορτίο σε ουδέτερο με αποτέλεσμα να κινείται εξαιρετικά αργά στο ηλεκτρικό πεδίο. Τα ιόντα  $\text{Cl}^-$  από την άλλη κινούνται γρηγορότερα και σχηματίζουν ένα ιοντικό μέτωπο που μεταναστεύει μπροστά από τη γλυκίνη. Ο διαχωρισμός του  $\text{Cl}^-$  από το Tris δημιουργεί μία

στενή ζώνη με απότομη κλίση τάσης, που έλκει τη γλυκίνη πίσω του, οδηγώντας σε δύο στενά διαχωρισμένα μέτωπα μετακινούμενων ιόντων. Έτσι, όλες οι πρωτεΐνες που διατρέχουν το gel, συγκεντρωθείσες στη λεπτή ζώνη έχουν μία ενδιάμεση ηλεκτροφορητική κινητικότητα με μέγιστη αυτή που αντιστοιχεί στα ιόντα  $\text{Cl}^-$  και ελάχιστη αυτή που αντιστοιχεί στη γλυκίνη.

Όταν το πρωτεϊνικό δείγμα εισέλθει στο πήκτωμα διαχωρισμού, λόγω της αλλαγής του pH η γλυκίνη φορτίζεται αρνητικά, με αποτέλεσμα να κινείται γρηγορότερα από όλες τις πρωτεΐνες αυτή τη φορά. Με αυτόν τον τρόπο εξαλείφεται η διαφορά τάσης που προϋπήρχε μεταξύ  $\text{Cl}^-$  και γλυκίνης και οι πρωτεΐνες μειώνουν την ταχύτητά τους λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης του πολυακρυλαμιδίου, που δημιουργεί πόρους στην πηκτή κι έτσι αναπτύσσεται αντίσταση και επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος.

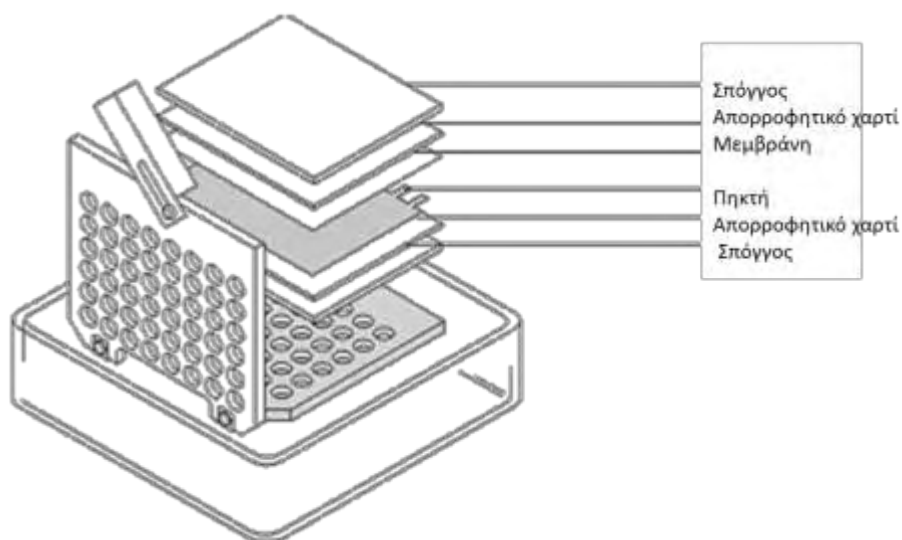


Εικόνα 29. Σχηματική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου Προσαρμογή από ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>: ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ, ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ-ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ, ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, [https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/5385/1/02\\_chapter\\_05.pdf](https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/5385/1/02_chapter_05.pdf), 31(3/9/16).

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε ειδική κατακόρυφη συσκευή ηλεκτροφόρησης (εικόνα 29) στα 120V, 350mA, για 1 ώρα περίπου, μέχρι το μέτωπο της χρωστικής που περιέχεται στο loading buffer να φτάσει στο άκρο του πηκτώματος διαχωρισμού.

### 3.6.1. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος σε υγρό περιβάλλον (εικόνα 30). Σε ειδική διάταξη (cassete) τοποθετήθηκαν η πηκτή και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί και σπόγγο, που είχαν εμποτιστεί σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) (πίνακας 7). Η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης έγινε εφαρμόζοντας τάση 100V και ένταση 350mA για 1 ώρα.



Εικόνα 30. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Προσαρμογή από *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Instruction Manual, Biorad*

Διάλυμα μεταφοράς	
Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Tris-HCl (pH 8.3)	48mM
Γλυκίνη	39M
SDS	0.037%
Μεθανόλη	20%

Πίνακας 7: Διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer)

Ο έλεγχος της μεταφοράς των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με χρώση της μεμβράνης με τη χρωστική Ponceau (Ponceau S solution for electrophoresis, Serva). Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα (0.1%(w/v) Ponceau S σε 5%(v/v) ακετοξικό με την παρακάτω σύσταση:



- ✓ 1g Ponceau S
- ✓ 50ml ακετοξικό
- ✓ Έως το 1L συμπλήρωση με ddH<sub>2</sub>O

Βυθίσαμε τη μεμβράνη σε επαρκή ποσότητα διαλύματος Ponceau, ώστε να την καλύπτει τελείως για 5 λεπτά. Κατόπιν, βυθίσαμε τη μεμβράνη σε υδατικό διάλυμα για 5 λεπτά και επαναλάβαμε την εμβύθιση για άλλα 5 λεπτά. (εικόνα 31) Επίσης, επισημάνθηκαν οι θέσεις των πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (protein marker). Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν Precision Plus (Protein unstained Standards, Biorad, California). Τέλος, μεταφέραμε τη μεμβράνη σε dH<sub>2</sub>O για 2 πλύσεις και στη συνέχεια η μεμβράνη είναι έτοιμη για blocking με αντισώματα.



Εικόνα 31.: Χρώση μεμβράνης νιτροκυταρίνης με διάλυμα Ponceau S.

### 3.6.2. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting).

Ο εντοπισμός των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων που αναγνωρίζουν και προσδένονται ειδικά σε αυτές. Η πρόσδεση πρωτεΐνης – αντισώματος ανιχνεύεται με τη χρήση αντισωμάτων κατά του πρώτου αντισώματος και τα οποία είναι συζευγμένα με ένζυμο δείκτη. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

1 <sup>ο</sup> Αντίσωμα	Προέλευση	Αραίωση
Πολυκλωνικό Anti-human HIF-1α (Lyberopoulou et al., 2007)	Κουνέλι	1:1000

Μονοκλωνικό Anti-human phospho-NF-κB p65 (Ser 536) (Cell Signaling)	Κουνέλι	1:1000
Μονοκλωνικό Anti-human NF-κB p65 (Cell Signaling)	Κουνέλι	1:1000
Anti-CSE (CTH monoclonal antibody (M02), clone 2E12-1C10 - Abnova)	Ποντίκι	1:400
Μονοκλωνικό Anti-SM-α-actin (SIGMA)	Ποντίκι	1:1000

2 <sup>ο</sup> Αντίσωμα	Προέλευση	Αραίωση
Anti-rabbit HRP IgG (Cell Signaling)	Κουνέλι	1:10.000
Anti-mouse HRP IgG (Amersham)	Ποντίκι	1:10.000
Μονοκλωνικό Anti-β-actin (SIGMA)	Ποντίκι	1:5000

Πίνακας 8. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

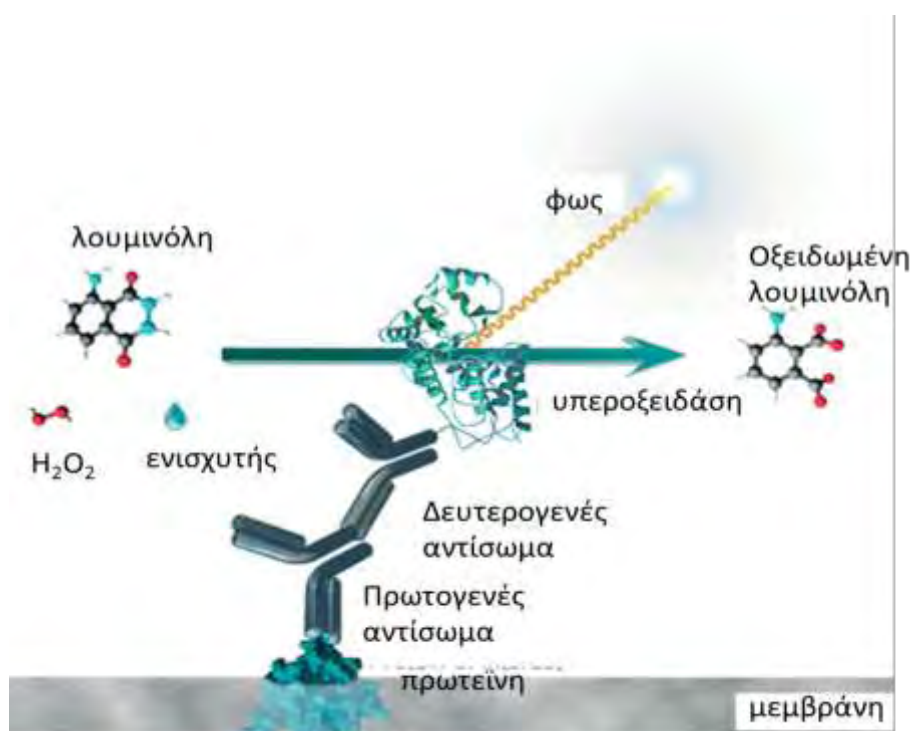
Κατά την πειραματική διαδικασία η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε για 1 ώρα σε διάλυμα κορεσμού (1 X PBS/0,1% Tween-20, 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη) σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε ολονύκτια επώαση με το πρώτο αντίσωμα στους 4 °C και τρεις πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα 1 X PBS/0,1% Tween-20. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα 1 X PBS/0,1% Tween-20.

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced chemoluminescence, ECL) (εικόνα 32). Για το σκοπό αυτό, έγινε επώαση της μεμβράνης για 1 λεπτό με διάλυμα λουμινόλης (πίνακας 9). Η οξειδάση της λουμινόλης από την υπεροξειδάση (που είναι συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα) προκάλεσε έκλυση φωτός το

οποίο ανιχνεύτηκε, στην παρούσα εργασία, σε συσκευή ανίχνευσης χημειοφωταύγειας (Imager Chemiluminescence).

Διάλυμα Λουμινόλης	
Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Tris-HCl (pH 8.6)	0.1M
Λουμινόλη	1.4mM
p-κουμαρικό οξύ (σε DMSO)	0.007mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30%

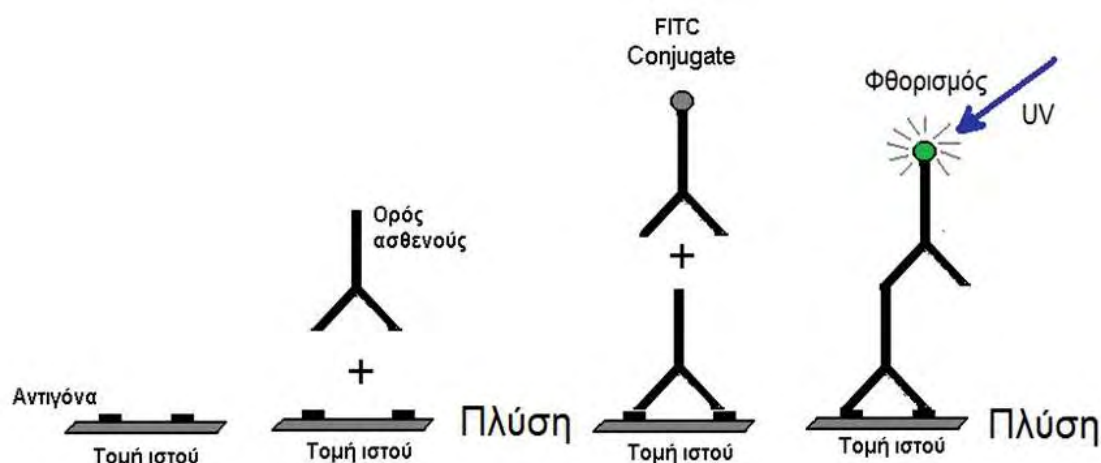
Πίνακας 9. Σύσταση διαλύματος λουμινόλης.



Εικόνα 32. Αρχή της μεθόδου της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Προσαρμογή από: [www.covalab.com](http://www.covalab.com), 1 (3/9/16)

### 3.7. Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό.

Κατά τον έμμεσο ανοσοφθορισμό, οι υπό μελέτη πρωτεΐνες λειτουργούν ως αντιγόνα που αναγνωρίζονται από τα αντίστοιχα αντισώματα. Στη συνέχεια, προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα κατά του πρώτου αντισώματος που είναι συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική π.χ. CY3 (χρώση κυανίνης) ή FITC (χρώση ισοθειακυανική φλουορεσείνης) και αυτό μας επιτρέπει τον κυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης. (εικόνα 33).



Εικόνα 33. Αρχή της μεθόδου του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Προσαρμογή από: Ανοσοφθορισμός: Κεφάλαιο 9, <http://slideplayer.gr/slide/3944578/>, 75(3/9/16)

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού για τον κυτταρικό εντοπισμό της  $\alpha$ -ακτίνης του λείου μυός (SM- $\alpha$  actin) και του HIF-1 $\alpha$  με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων (πίνακας 10).

Κατά την πειραματική διαδικασία, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας, που περιείχαν αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες. Μετά την κατάλληλη κατεργασία των κυττάρων έγινε αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και 2 πλύσεις με διάλυμα 1 X PBS. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 3,65% φορμαλδεΰδης/1X PBS για 15 λεπτά στους 4 °C και 2 πλύσεις με 1 X PBS. Το επόμενο στάδιο περιλάμβανε την επώαση των κυττάρων με διάλυμα 1% Triton X-100/1X PBS για 15 λεπτά στους 4 °C, προκειμένου η κυτταρική μεμβράνη να καταστεί διαπερατή στα αντισώματα. Ακολούθησαν 2 πλύσεις με διάλυμα 1 X PBS και επώαση των κυττάρων με διάλυμα κορεσμού 1X PBS/ 0.1% Tween 20/ 3% BSA για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια έγινε ολονύκτια επώαση στους 4 °C με το πρώτο αντίσωμα σε διάλυμα 1X PBS/ 0.1% Tween 20/ 1% BSA. Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα 1X PBS/ 0.1% Tween 20/ 1% BSA και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα που ήταν συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική σε διάλυμα 1X PBS/ 0.1% Tween 20/ 1% BSA για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι. Μετά το τέλος της επώασης, αφαιρέθηκε το δεύτερο αντίσωμα και έγιναν μία πλύση των 5 λεπτών με διάλυμα 1X PBS/ 0.1% Tween 20/ 1% BSA και 2 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα 1X PBS/ 0.1% Tween 20. Τέλος, οι καλυπτρίδες εμβαπτίστηκαν σε H<sub>2</sub>O, στέγνωσαν και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες πάνω σε 3μl Mowiol-DAPI (Vector Laboratories, Peterborough, UK.), ώστε να γίνει και η χρώση του DNA των κυττάρων. Ακολούθησε παρατήρηση σε οπτικό, ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss Inc., NY, USA). Ελήφθησαν φωτογραφίες με φίλτρα ειδικά για

DAPI και CY3 με κάμερα Leica DFC480, Leica cameras, Solms, Germany. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη φωτογραφιών είναι το Leica Microsystems.

1 <sup>ο</sup> Αντίσωμα	Αραίωση
Anti-HIF-1α (Lyberopoulou et al., 2007)	1:1000
Anti-SM-α-actin (SIGMA)	1:400
2 <sup>ο</sup> Αντίσωμα	
Anti-rabbit FITC (Jackson ImmunoResearch Europe, Ltd., Suffolk, UK)	1:50
Anti-rabbit CY-3 (Jackson ImmunoResearch Europe, Ltd., Suffolk, UK)	1:50

Πίνακας 10. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού.

### 3.8. Πειράματα μέτρησης της ανταποκρισιμότητας των ΛΜΚ στην ACh.

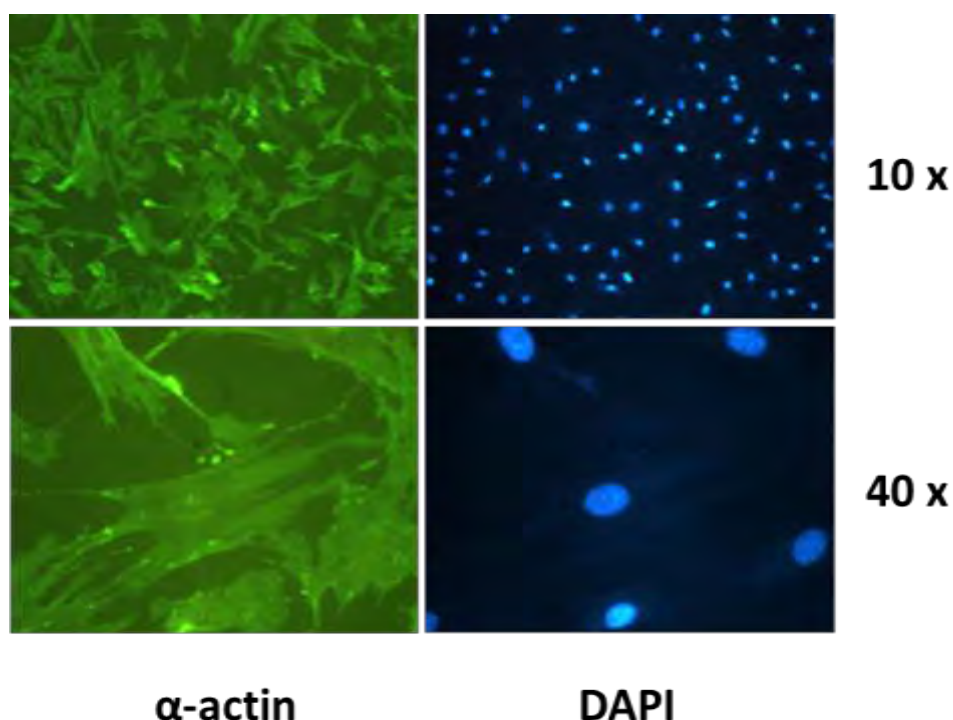
Για να επιβεβαιώσουμε ότι η συσπαστική απόκριση των κυττάρων ήταν ως άμεσο αποτέλεσμα της δράσης της ACh, στα control πειράματα (προ της προσθήκης της ACh) προστέθηκε ατροπίνη ( $10^{-6}$  M). ΛΜΚΑ στρώθηκαν σε τριβλία καλλιέργειας 12 θέσεων, έως ότου καλύψουν το 100% της επιφάνειας του τριβλίου. Στη συνέχεια έγινε πλύση δις με 1 X PBS και τα κύτταρα επώαστηκαν σε θρεπτικό χωρίς ορό (FBS free DMEM F12, 100U/ml penicillin and 100μg/ml streptomycin) για 72h. Στα κύτταρα έγινε προεπώαση με GYY4137 (100μM και 250μM) για 1 ώρα και/ή προσθήκη  $\text{CoCl}_2$  (100μM) για 24h. Για να μετρηθεί η συστολή των κυττάρων παρουσία ακετυλοχολίνης, από τα τριβλία αφαιρέθηκε το θρεπτικό, έγινε πλύση δις με 1 X PBS, αποκόλληση για 5 min σε διάλυμα θρυψίνης-EDTA και μετά έγινε προσθήκη ACh ( $10^{-3}$  M). Η συστολή των κυττάρων παρατηρήθηκε σε οπτικό, ανάστροφο μικροσκόπιο Nikon Diaphot 300 (Nikon Inc., Melville, NY, USA). Ελήφθησαν φωτογραφίες πριν και μετά την έκθεση σε ACh ( $t=0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10$ ) με κάμερα Leica DFC480. Η επιφάνεια των κυττάρων σε κάθε φωτογραφία μετρήθηκε με το πρόγραμμα Image J. Υπολογίστηκε ο λόγος της ολικής επιφάνειας του κυττάρου πριν και μετά την έκθεση σε ACh, η μέση τιμή καθώς και η standard deviation για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε διάγραμμα.

### 3.9. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.

Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft Office Excel 2010. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων και η τυπική απόκλιση, καθώς και ο λόγος της επιφάνειας του κάθε κυττάρου 10 λεπτά μετά την προσθήκη ACh προς την αρχική προ της προσθήκης αυτής.

#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προκειμένου να ελέγξουμε την επίδραση του  $H_2S$  στην απόκριση των ΛΜΚΑ στην υποξία χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Η ταυτοποίηση των καλλιιεργειών έγινε εφαρμόζοντας την τεχνική του ανοσοφθορισμού με αντίσωμα κατά της  $\alpha$ -ακτίνης του λείου μυός. Τα κύτταρα, όπως φαίνεται στην εικόνα 34, αποτυπώνονται σε μικρή και μεγάλη μεγέθυνση να φέρουν ατρακτοειδές σχήμα με ευμεγέθη πυρήνα και η  $\alpha$ -ακτίνη που είναι ειδική πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού τους απεικονίζεται πράσινη μετά από χρώση με FITC.



*Εικόνα 34: Ταυτοποίηση των ΛΜΚΑ και ανάλυση της έκφρασης της  $\alpha$ -ακτίνης με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά του  $\alpha$ -ακτίνης και η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI. Μεγέθυνση 10X και 40X.*

##### 4.1. Επίδραση εξωγενούς χορηγούμενου $H_2S$ στην επαγωγή του HIF-1α στα ΛΜΚΑ

Με σκοπό να μελετήσουμε την επίδραση του  $H_2S$  στην πρωτεΐνη του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, καλλιιεργήσαμε τα ΛΜΚΑ τραχείας κουνελιού σε τριβλία των 10cm, σε πλήρες θρεπτικό για 72h.

#### **4.1.1. Επίδραση του γρήγορου δότη του $H_2S$ , NaHS στην επαγωγή του HIF-1α στα ΛΜΚΑ**

Αρχικά, μελετήσαμε την επίδραση του γρήγορου δότη  $H_2S$ , υδροθειούχο νάτριο (NaHS). Για το σκοπό αυτό, οι καλλιέργειες προεπώαστηκαν με NaHS (0,1mM και 1mM) για 30min πριν την προσθήκη (όπου αναφέρεται)  $CoCl_2$  (10μM) για 4 και για 24h, το οποίο μιμείται την υποξία αναστέλλοντας τις PHDs (Chachami, Simos et al. 2004). Ακολούθησε λύση των κυττάρων και ανάλυση της έκφρασης του HIF-1α με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά της α-ακτίνης του λείου μυός. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

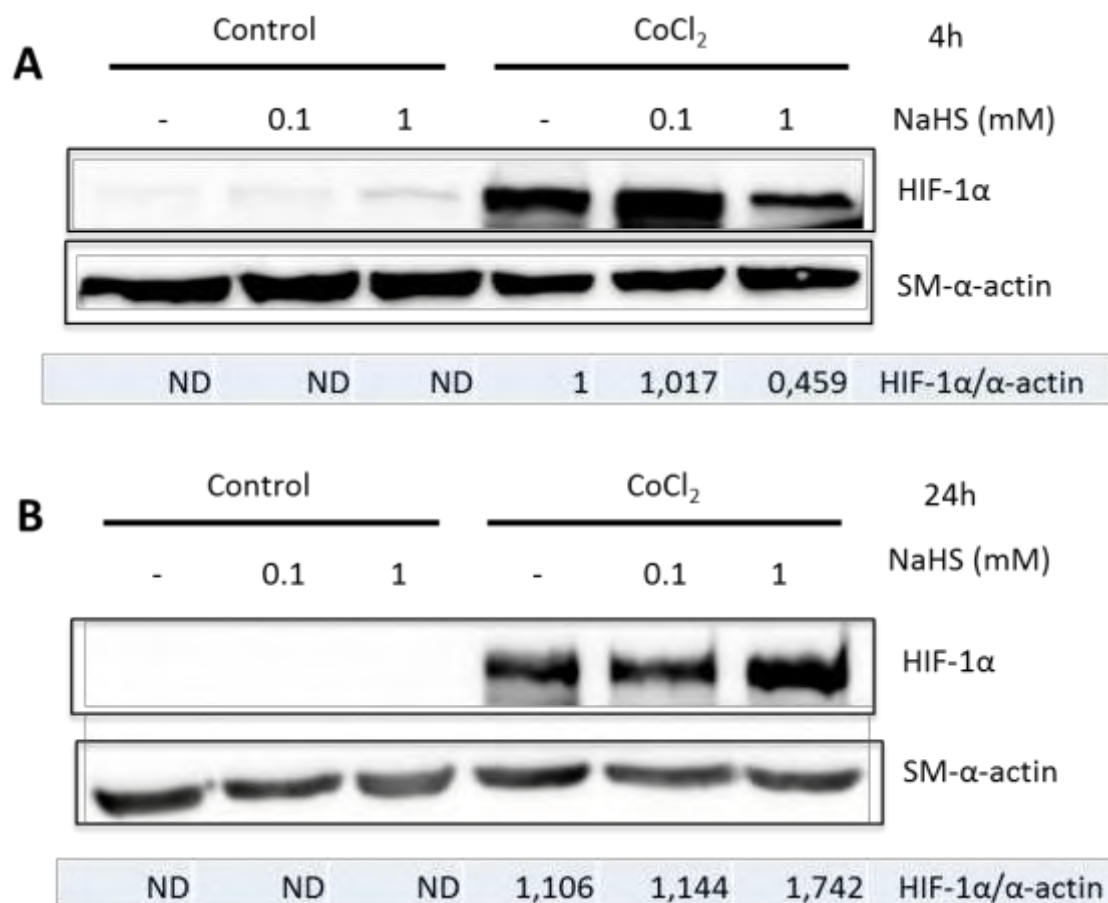
Σε συνθήκες νορμοξίας τα επίπεδα της HIF-1α πρωτεΐνης είναι μόλις ανιχνεύσιμα. Η προσθήκη στα κύτταρα NaHS σε συγκέντρωση 0,1mM ή 1mM για 4h δεν προκάλεσε σημαντική αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης. Αντίθετα, η επώαση των κυττάρων παρουσία  $CoCl_2$  για 4h οδήγησε σε σημαντική επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α, παρουσία ή απουσία NaHS. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-1α, ωστόσο, δεν επηρεάστηκαν από την παρουσία NaHS στη μικρή (0,1mM) ή τη μεγάλη (1mM) συγκέντρωση (εικόνα 35).

Επιπλέον, η προσθήκη στα κύτταρα NaHS σε συγκέντρωση 0,1mM ή 1mM για 24h δεν προκάλεσε σημαντική αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης, τα οποία δεν είναι ανιχνεύσιμα. Αντίθετα, η επώαση των κυττάρων παρουσία  $CoCl_2$  για 24h οδήγησε σε σημαντική επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α. Η προσθήκη NaHS (0,1mM ή 1mM) δεν επηρέασε τα επίπεδα του HIF-1α, όπως φαίνεται από το λόγο HIF-1α/α-ακτίνης σε σύγκριση με τις αντίστοιχες συνθήκες στη νορμοξία δεν είναι αξιολογήσιμος. Οι διαφορές στα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-1α συγκρίνοντας τη μικρή και τη μεγάλη συγκέντρωση του NaHS τόσο στη νορμοξία, όσο και στην υποξία, αποδείχθηκαν της ίδιας τάξης (εικόνα 35).

Σε όλα τα πειράματα παρουσία  $CoCl_2$  παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α. Η προσθήκη στα ΛΜΚΑ τραχείας κουνελιού του γρήγορου δότη του  $H_2S$ , NaHS δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-1α τόσο παρουσία όσο και απουσία  $CoCl_2$  (εικόνα 35).

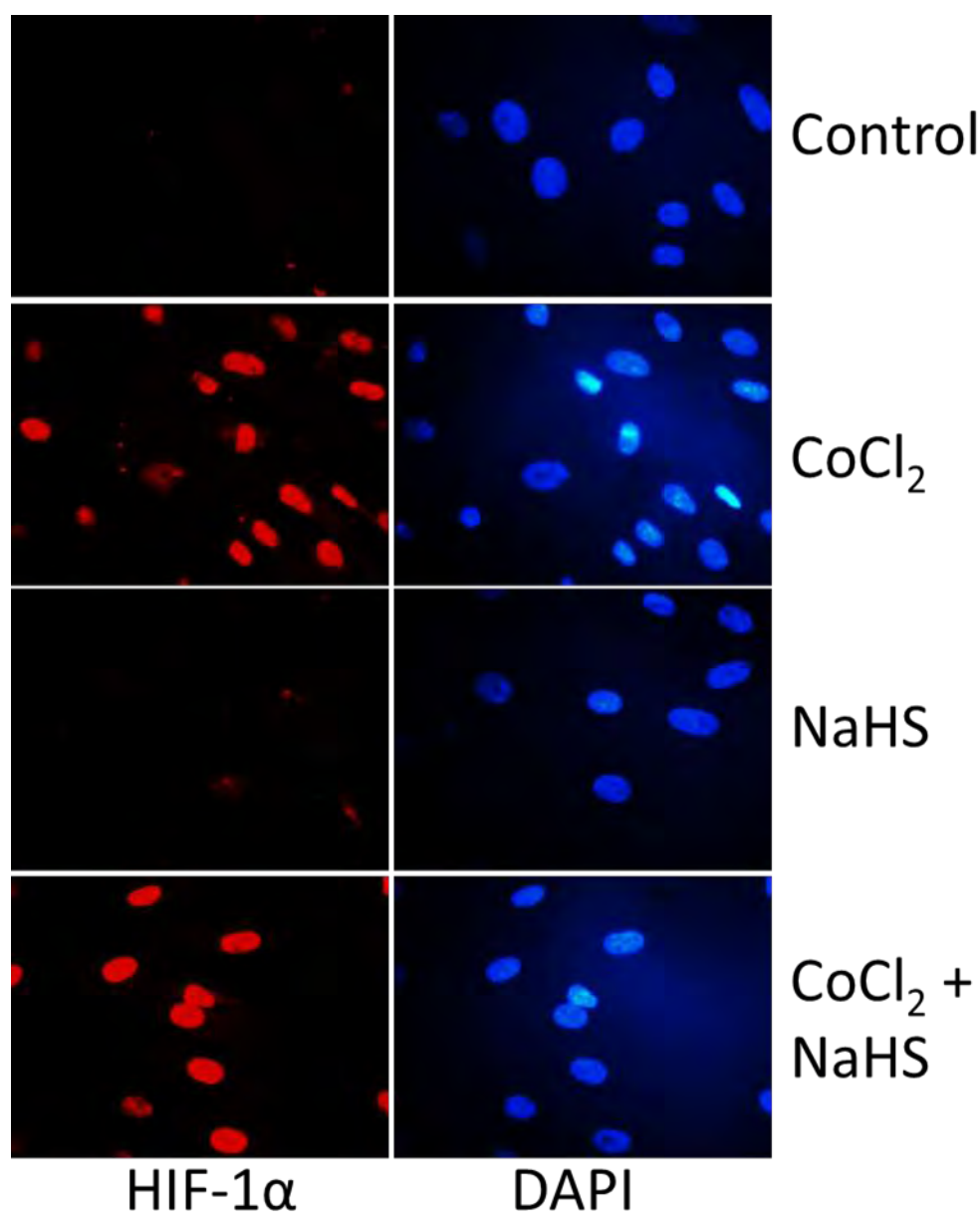
Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση του NaHS στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες και καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία NaHS (1mM) για 30min προεπώαση και  $CoCl_2$  (10μM) για 4h (εικόνα 36).

Στα δείγματα όπου υπήρχε  $CoCl_2$  παρατηρήσαμε τον εντοπισμό του HIF-1α στον πυρήνα, με ελαφρώς εντονότερο σήμα στις καλυπτρίδες που συνδιάζαν το δότη του  $H_2S$ , NaHS και  $CoCl_2$  (εικόνα 36).



Εικόνα 35: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου φαίνεται η επίδραση στα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-1α παρουσία ή απουσία του γρήγορου δότη NaHS με ή χωρίς CoCl<sub>2</sub>, για (A) 4h και (B) 24h. Ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά της α-ακτίνης λείων μυϊκών κυττάρων. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση του HIF-1α εκφρασμένου ως λόγος HIF-1α/α-ακτίνη (ND=μη ανιχνεύσιμο).





*Εικόνα 36: Ανάλυση της επαγωγής της έκφρασης του HIF-1α σε ARSMCs μετά από 24 ώρες επώαση με CoCl<sub>2</sub> και NaHS, με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά του HIF-1α και η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI. Μεγέθυνση 40X.*

#### **4.1.2. Επίδραση του γρήγορου δότη του H<sub>2</sub>S, GYY4137 στην επαγωγή του HIF-1α στα ΛΜΚΑ**

Παρομοίως, μελετήσαμε την επίδραση του αργού δότη H<sub>2</sub>S, GYY4137. Για το σκοπό αυτό, οι καλλιέργειες προεπώσθηκαν με GYY4137 (100 και 250μM) για 1h πριν την προσθήκη (όπου αναφέρεται) CoCl<sub>2</sub> (10μM) για 4 και για 24h. Ακολούθησε λύση των κυττάρων και ανάλυση της έκφρασης του HIF-1α με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά της α-ακτίνης του λείου μυός και της β-ακτίνης και ακολούθησε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

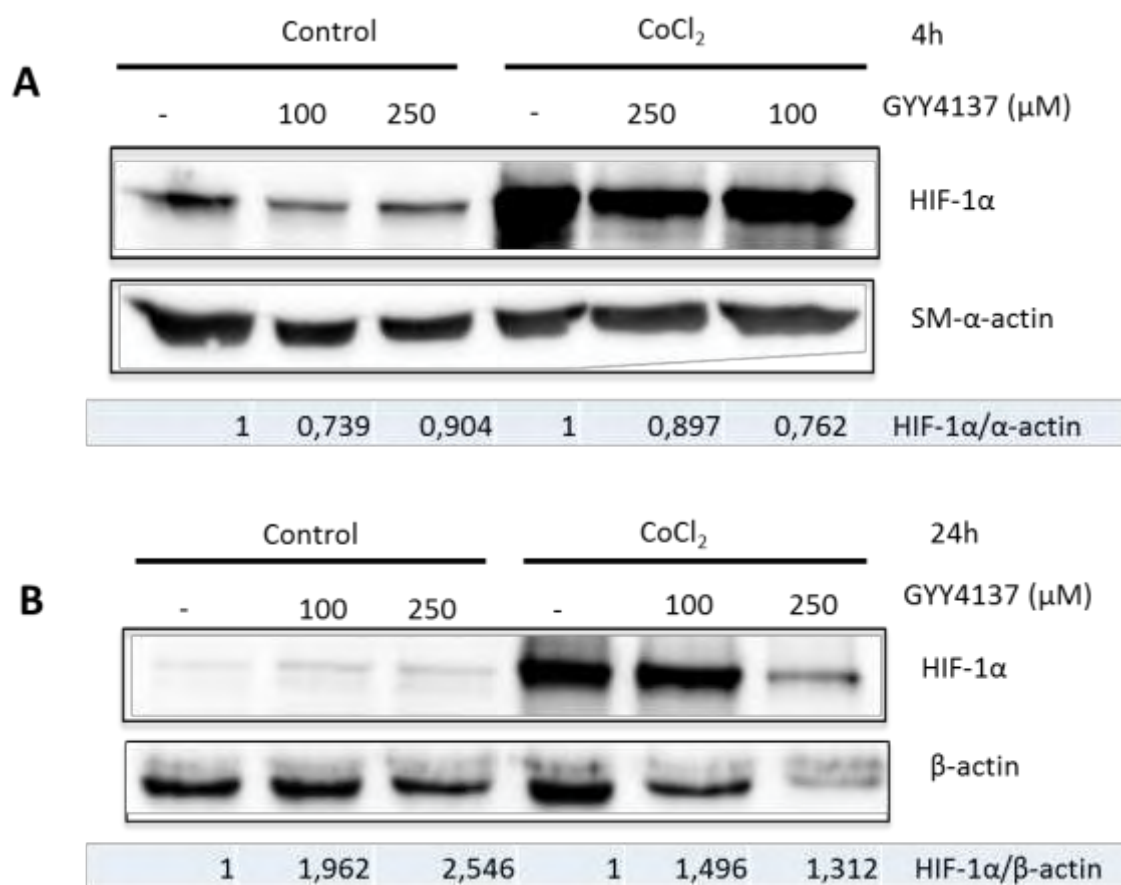
Σε ΛΜΚΑ σε συνθήκες νορμοξίας τα επίπεδα της HIF-1α πρωτεΐνης είναι μόλις ανιχνεύσιμα στο πείραμα με τις 4h. Η προσθήκη στα κύτταρα GYY4137 σε συγκέντρωση 100μM ή 250μM δεν προκάλεσε σημαντική αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης. Αντίθετα, η επώαση των κυττάρων παρουσία CoCl<sub>2</sub> για 4h οδήγησε σε εμφανή επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α, ενώ η προσθήκη GYY4137 τόσο στη μικρή (100μM) όσο και στη μεγάλη (250μM) συγκέντρωση δεν επηρέασε τα επίπεδα του HIF-1α, όπως φαίνεται και από το λόγο HIF-1α/α-ακτίνης (εικόνα 37).

Η προσθήκη στα κύτταρα GYY4137 σε συγκέντρωση 100μM ή 250μM για 24h σε συνθήκες νορμοξίας δεν προκάλεσε σημαντική αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης. Αντίθετα, η επώαση των κυττάρων παρουσία CoCl<sub>2</sub> για 24h οδήγησε σε σημαντική επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α που και πάλι δεν επηρεάστηκε από την παρουσία του αργού δότη του H<sub>2</sub>S, GYY4137. Οι διαφορές στα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-1α συγκρίνοντας τη μικρή και τη μεγάλη συγκέντρωση του GYY4137 αποδείχθηκαν της ίδιας τάξης (εικόνα 37).

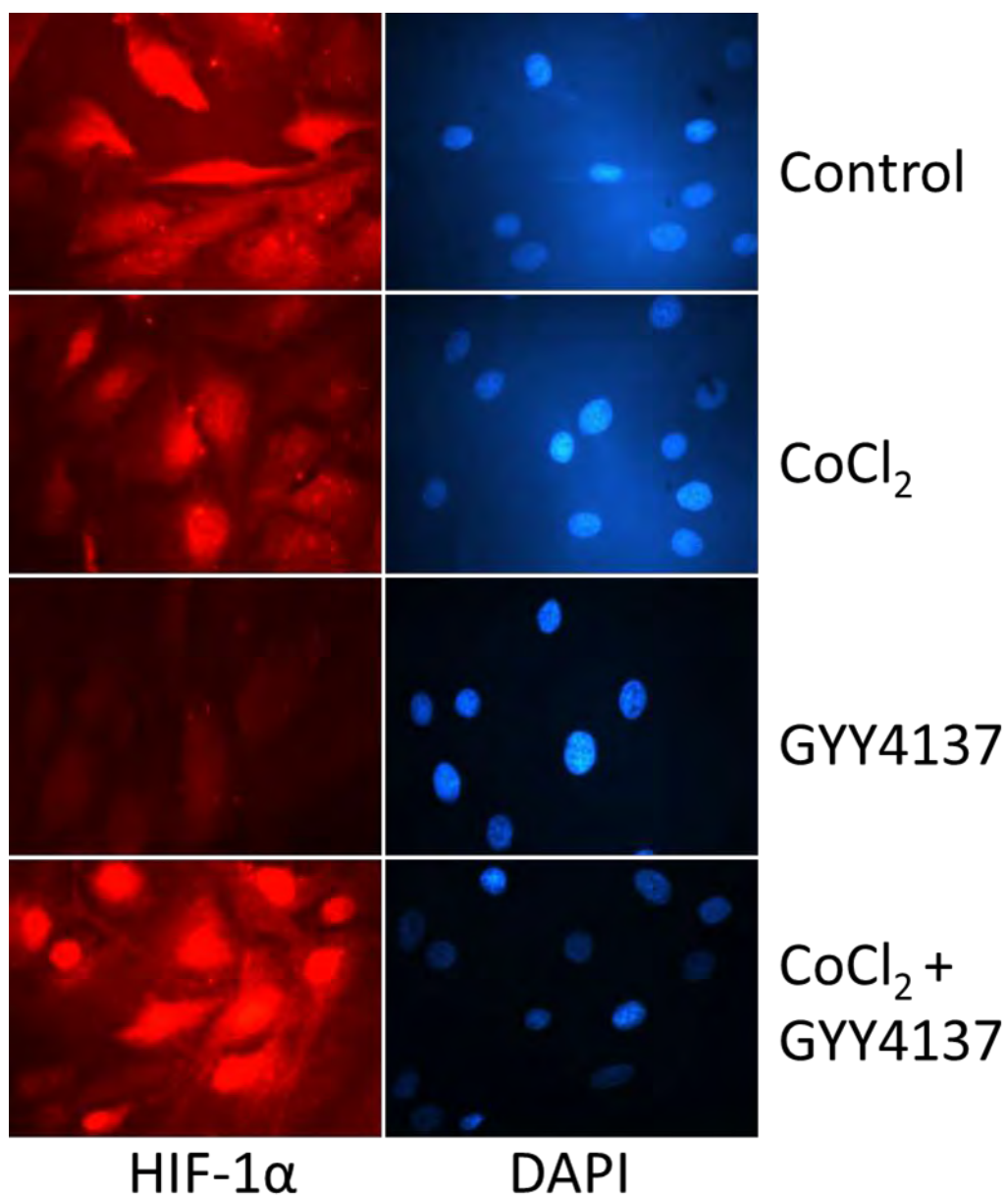
Σε όλα τα πειράματα σε συνθήκες υποξίας αποδείχθηκε επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α. Η προσθήκη στα ΛΜΚΑ τραχείας κουνελιού του αργού δότη του H<sub>2</sub>S, GYY4137 δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-1α τόσο παρουσία όσο και απουσία CoCl<sub>2</sub> (εικόνα 37).

Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση του GYY4137 στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες και καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία GYY4137 (250μM) για 1h προεπώαση και CoCl<sub>2</sub> (10μM) για 4h (εικόνα 38).

Στα δείγματα όπου υπήρχε CoCl<sub>2</sub> παρατηρήσαμε τον εντοπισμό του HIF-1α στον πυρήνα, με σαφώς εντονότερο σήμα στις καλυπτρίδες που συνδιάζαν το δότη του H<sub>2</sub>S, NaHS και CoCl<sub>2</sub> (εικόνα 38).



Εικόνα 37: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου φαίνεται η επίδραση στα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-1α παρουσία ή απουσία του αργού δότη GYY4137 με ή χωρίς CoCl<sub>2</sub>, για (A) 4h και (B) 24h. Ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά της (A) α-ακτίνης και (B) β-ακτίνης. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση του HIF-1α εκφρασμένου ως λόγος (A) HIF-1α/α-ακτίνη και (B) HIF-1α/β-ακτίνη.



*Εικόνα 38: Ανάλυση της επαγωγής της έκφρασης του HIF-1α σε ARSMCs μετά από 24 ώρες επώαση με CoCl<sub>2</sub> και GYY4137, με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά του HIF-1α και η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI. Μεγέθυνση 40X.*

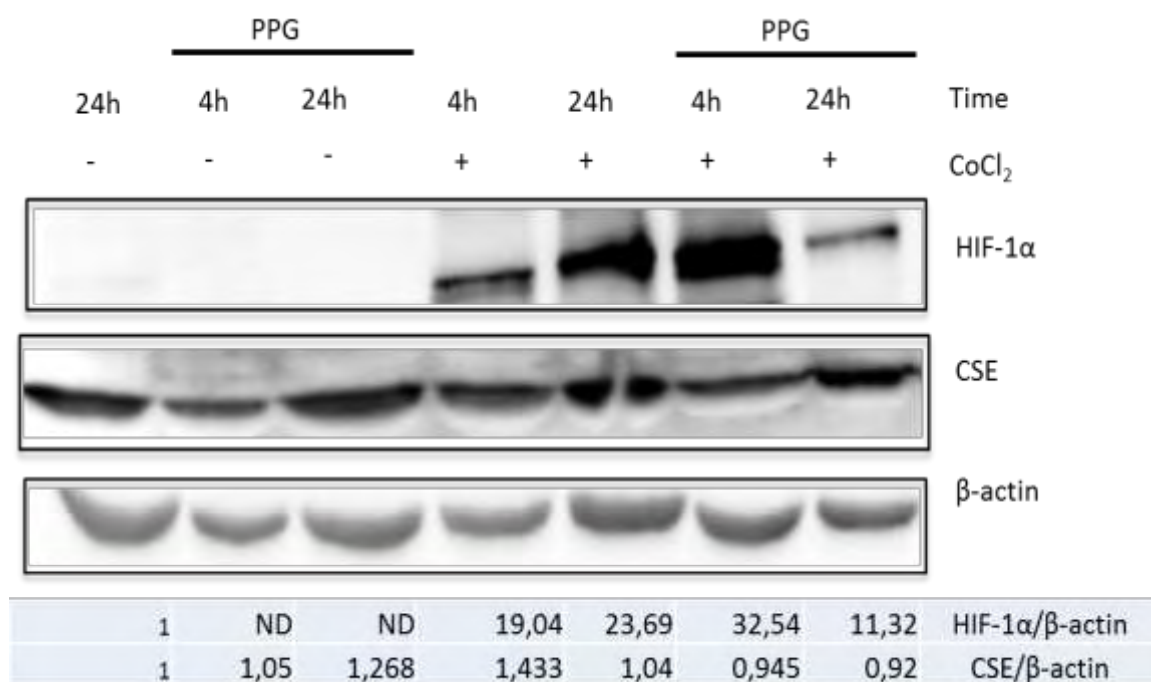
## **4.2. Επίδραση της αναστολής της παραγωγής του ενδογενούς H<sub>2</sub>S στην επάγωγή του HIF-1α σε ΛΜΚΑ.**

Το H<sub>2</sub>S παράγεται στα ΛΜΚ από 3 ένζυμα: CSE, CBS και 3-MST. Η CSE να αποτελεί το πιο επαγωγίμο ένζυμο μεταξύ των (Chen and Wang 2012). Προκειμένου να μελετήσουμε την επίδραση του H<sub>2</sub>S, το οποίο παράγεται ενδογενώς από τη CSE, στα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-1α, έγινε προσθήκη του αναστολέα του ενζύμου παραγωγής H<sub>2</sub>S CSE, PPG (DL-propargylglycine). Αναλυτικότερα, οι καλλιέργειες προεπώαστηκαν με PPG (10mM) για 1h πριν την προσθήκη (όπου αναφέρεται) CoCl<sub>2</sub> (10μM) για 4 και για 24h, το οποίο μιμείται την υποξία αναστέλλοντας τις PHDs (Chachami, Simos et al. 2004). Ακολούθησε λύση των κυττάρων και ανάλυση της έκφρασης του HIF-1α με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά της β-ακτίνης. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Σε συνθήκες νορμοξίας τα επίπεδα της HIF-1α πρωτεΐνης δεν είναι ανιχνεύσιμα και η προσθήκη του αναστολέα της CSE (PPG, 10mM) δεν τα επηρεάζει. Αντίθετα, η επώαση των κυττάρων παρουσία CoCl<sub>2</sub> για 4h και 24h οδήγησε σε σημαντική επάγωγή της έκφρασης του HIF-1α, κύρια στις 24h. Συγκριτικά με την προσθήκη PPG (10mM) σε συνδιασμό με CoCl<sub>2</sub> για 4h, ο λόγος HIF-1α/β-ακτίνης αυξάνει κατά 13,5 φορές, ενώ με την προσθήκη PPG (10mM) σε συνδιασμό με CoCl<sub>2</sub> για 24h, ο λόγος HIF-1α/β-ακτίνης μειώνεται κατά 12 φορές.

Σε συνθήκες νορμοξίας τα επίπεδα της CSE πρωτεΐνης είναι ανιχνεύσιμα και η προσθήκη του αναστολέα της CSE (PPG, 10mM) δεν τα επηρεάζει. Η επώαση των κυττάρων παρουσία CoCl<sub>2</sub> για 4h και 24h προκαλεί ήπια μόλις αύξηση της έκφρασης της CSE της ίδιας τάξης, κύρια στις 4h. Συγκριτικά με την προσθήκη PPG (10mM) σε συνδιασμό με CoCl<sub>2</sub> για 4h και 24h, ο λόγος CSE/β-ακτίνης μειώνεται ανεπαίσθητα, σε σύγκριση με τις control συνθήκες.

Σε όλα τα πειράματα σε συνθήκες υποξίας αποδείχθηκε επάγωγή της έκφρασης του HIF-1α. Αποδείχθηκε ότι επώαση των ΛΜΚΑ τραχείας κουνελιού με τον αναστολέα PPG για 4h αύξησε τα επίπεδα της HIF-1α πρωτεΐνης, ενώ παράταση επώασης για 24h είχε τα αντίθετα αποτελέσματα, δηλαδή μείωση στην επάγωγή της έκφρασης του HIF-1α, ενώ όσον αφορά τα επίπεδα της πρωτεΐνης της CSE στις ίδιες συνθήκες, δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές.



Εικόνα 39: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου φαίνεται η επίδραση στα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-1α παρουσία ή απουσία του αναστολέα της CSE (PPG) με ή χωρίς CoCl<sub>2</sub>, για 4h και 24h. Ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά της β-ακτίνης. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση του HIF-1α εκφρασμένου ως λόγος HIF-1α/β-ακτίνη (ND=μη ανιχνεύσιμο).

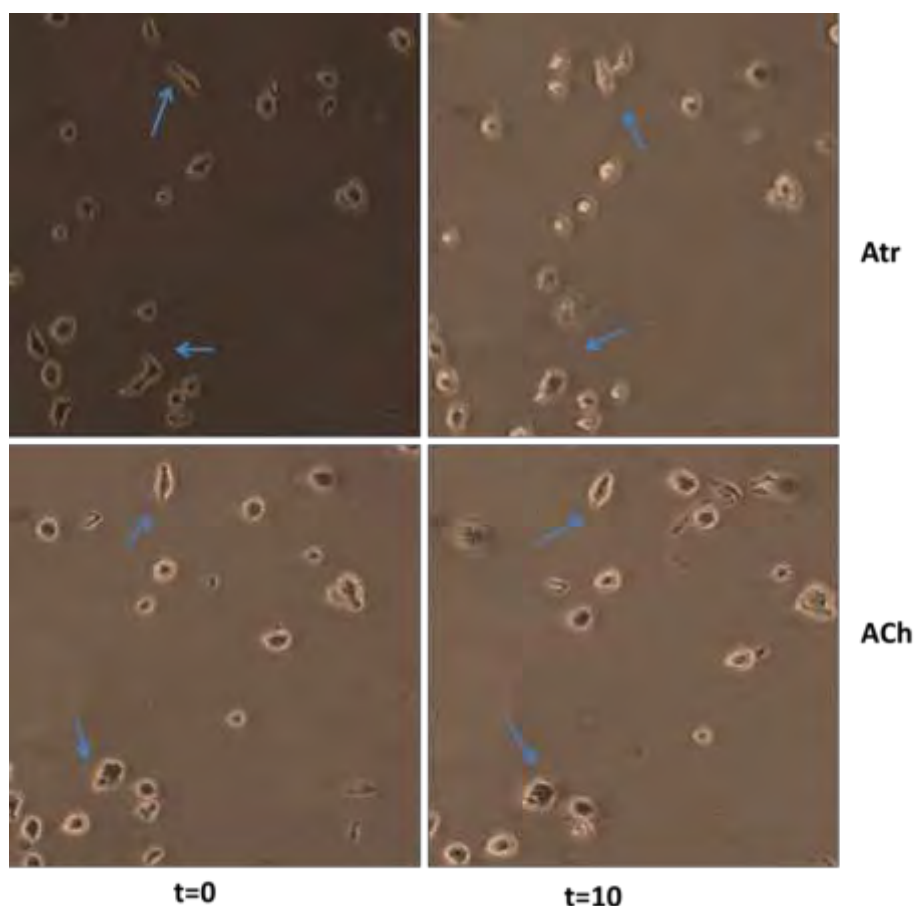
### 4.3. Επίδραση του δότη GYY4137 στην απόκριση των ΛΜΚΑ σε ACh σε συνθήκες υποξίας.

Όπως έχουμε ήδη προαναφέρει, τα ΛΜΚΑ συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών σε χρόνιες αναπνευστικές νόσους. Διαφορετικά ερεθίσματα οδηγούν στη μετάβασή τους από το συνθετικό στο συσταλτό φαινότυπο και η αύξηση της έκφρασης των M3 μουσκαρινικών υποδοχέων στην επιφάνειά τους είναι ένα από αυτά (Stamatiou, Paraskeva et al. 2014). Επίσης, από τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα γνωρίζουμε ότι το H<sub>2</sub>S βοηθά στη χάλαση των ΛΜΚΑ και η δράση του οξύνεται σε συνθήκες υποξίας (Wang 2012). Στόχος μας είναι να διερευνήσουμε τις μεταβολές στη συσπαστική ικανότητα των ΛΜΚΑ μετά από παρατεταμένη έκθεση σε ακετυλοχολίνη (ACh), που είναι αγωνιστής των μουσκαρινικών υποδοχέων, μετά από την επίδρασή τους με δότη H<sub>2</sub>S σε συνθήκες υποξίας.

Πρώτα διεξήχθη πείραμα ελέγχου με την εφαρμογή Ατροπίνης (Atr, 10<sup>-6</sup>M) σε ΛΜΚΑ τραχείας κουνελιού, η οποία είναι ανταγωνιστής των μουσκαρινικών υποδοχέων και στη συνέχεια έγινε έκθεση σε ACh (10<sup>-3</sup>M) με σκοπό να αποδείξουμε ότι η προκύπτουσα σύσπαση είναι άμεσο αποτέλεσμα της επίδρασης της ACh. Καλλιεργήσαμε, λοιπόν, ΛΜΚΑ τραχείας κουνελιού σε πιάτο 6 θέσεων για 72h, εφαρμόζοντας στέρηση ορού στις 2 εκ των 6 θέσεων. Κατόπιν, προστέθηκε ατροπίνη (10<sup>-6</sup>M) και ελήφθησαν φωτογραφίες τη στιγμή της έγχυσης και 10 λεπτά μετά. Τέλος, προστέθηκε ACh (10<sup>-3</sup>M) και ελήφθησαν φωτογραφίες με κάμερα προσαρτημένη στο μικροσκόπιο τη στιγμή της έγχυσης και ανά λεπτό έως 10 λεπτά μετά. Όπως φαίνεται στην εικόνα 40, τα κύτταρα ενώ αρχικά έχουν ένα ομοιόμορφο, ατρακτοειδές σχήμα, στην πορεία με την προσθήκη ACh λαμβάνουν ένα ωοειδές σχήμα και το μήκος τους συρρικνώνεται, αποκτώντας μία φωτεινή άλω περιμετρικά. Αντίθετα, με την προσθήκη Atr, το σχήμα διατηρείται χωρίς ιδιαίτερη μεταβολή. Ο υπολογισμός της σύσπασης των ΛΜΚΑ έγινε με τη χρήση ηλεκτρονικού προγράμματος που μετρά της συνολική επιφάνεια του κάθε κυττάρου και κατόπιν με τη χρήση του τύπου (1).

$$\chi = A0 \div A10 \quad (1)$$

Όπου A0: το εμβαδόν της ολικής επιφάνειας ενός ΛΜΚΑ στο χρόνο t=0, που προστέθηκε ACh και A10: το εμβαδόν της ολικής επιφάνειας ενός ΛΜΚΑ στο χρόνο t=10, δηλαδή 10 λεπτά μετά την προσθήκη ACh.



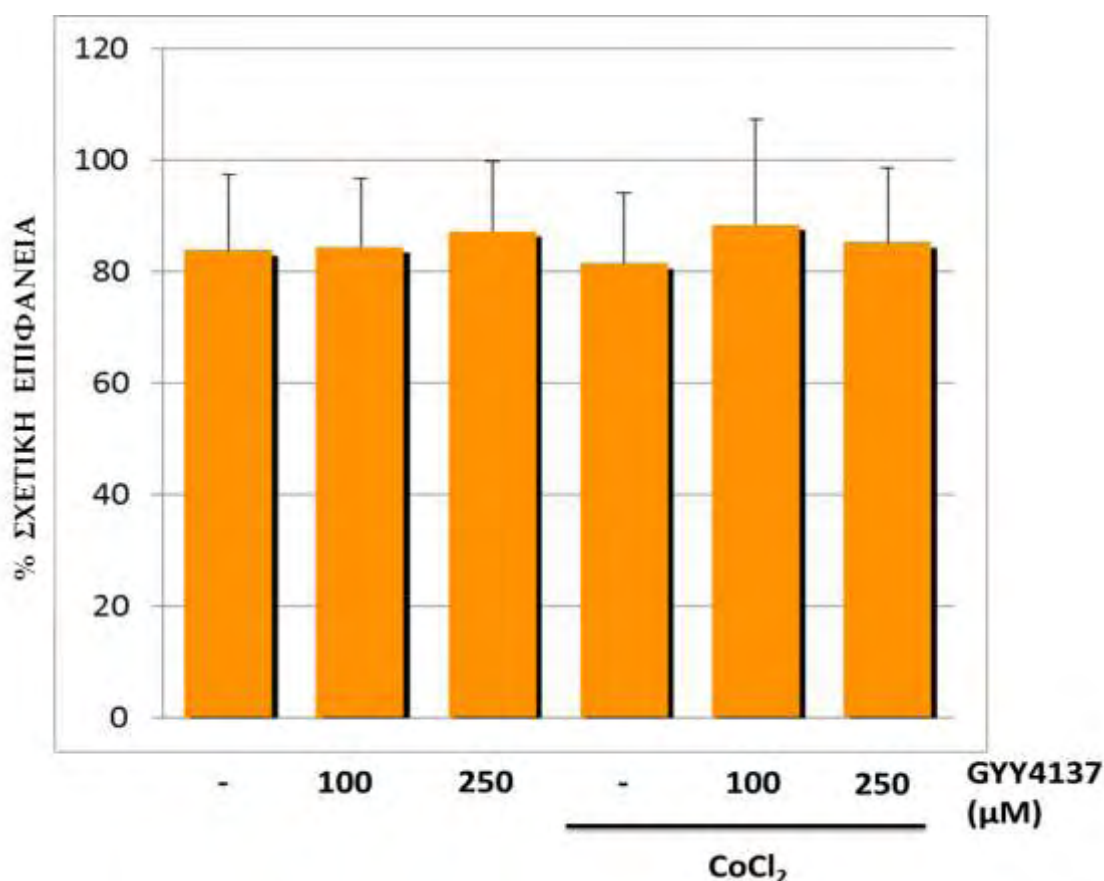
Εικόνα 40: Επίδραση αγωνιστών (ACh) και ανταγωνιστών (Atr) μουσκαρινικών υποδοχέων στο φαινότυπο και το μήκος των ΛΜΚ. Οι λήψεις έγιναν την ώρα της προσθήκης του παράγοντα ( $t=0$ ) και 10 λεπτά μετά ( $t=10$ ).

Μετά το πείραμα ελέγχου, επιστρώσαμε ΛΜΚΑ τραχείας κουνελιού σε πιάτο 12 θέσεων έως ότου καλύψουν όλη την επιφάνεια και τα καλλιιεργήσαμε εφαρμόζοντας στέρηση ορού για 72h. Ακολούθως, τα κύτταρα προεπώσθηκαν με GYY4137 (100 ή 250 $\mu$ M) για 1h και προστέθηκε  $\text{CoCl}_2$  (100 $\mu$ M) στις 6 από τις 12 θέσεις, για 24h. Τα κύτταρα πλύθηκαν σε PBS, θρυψινοποιήθηκαν και εκτέθηκαν σε θρεπτικό χωρίς FBS και στο τέλος προστέθηκαν 100 $\mu$ l ACh ( $10^{-3}$ M). Σύσπαση προκλήθηκε με την προσθήκη ACh και έγινε καταγραφή του φαινοτύπου των κυττάρων με λήψη φωτογραφιών με κάμερα προσαρτημένη στο μικροσκόπιο, από τη χρονική στιγμή της προσθήκης έως και 10 λεπτά μετά, ανά λεπτό. Στις φωτογραφίες με τη βοήθεια του προγράμματος, μετρήθηκε η ολική επιφάνεια κυττάρων σε κάθε θέση του πιάτου για όλες τις χρονικές στιγμές και υπολογίστηκε ο λόγος της επιφάνειας προ της προσθήκης ACh και 10 λεπτά μετά την προσθήκη της. Έγινε, επίσης υπολογισμός του μέσου όρου επιφάνειας από όλους τους χρόνους σύσπασης για κάθε θέση του πιάτου, καθώς και της τυπικής απόκλισης αυτών.



Παρατηρήσαμε ότι σε συνθήκες νορμοξίας, η προσθήκη του αργού δότη GYY4137 σε συγκέντρωση 100μM δεν προκαλεί αξιόλογη μεταβολή στη συσπαστικότητα των ΛΜΚΑ τραχείας κουνελιού και η προσθήκη του σε συγκέντρωση 250μM προκαλεί μικρή αύξηση της τάξης μόλις 5%. Σε συνθήκες υποξίας για 24h, αντίθετα, ο πληθυσμός των κυττάρων που επιβιώνουν με την προσθήκη CoCl<sub>2</sub> (100 μM) είναι μικρότερος σε σχέση με τις control συνθήκες. Παρουσία CoCl<sub>2</sub>, η προσθήκη 100μM GYY4137 αυξάνει τη συσπαστικότητα των ΛΜΚΑ κατά 10% περίπου, ενώ η προσθήκη 250μM GYY4137 μειώνει ελάχιστα τη συσπαστικότητα σε σχέση με τις control συνθήκες. Στις συνθήκες υποξίας επομένως, οι μεταβολές που προκαλεί ο αργός δότης GYY4137 φαίνονται να είναι μεγαλύτερου εύρους. Παρ' όλα αυτά, μετά από υπολογισμό της τυπικής απόκλισης για κάθε μία εκ των ανωτέρων τιμών, προκύπτει ότι αυτή η μεταβολή δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Τελικά, η επώαση των ΛΜΚ με τον αργό δότη GYY4137 παρουσία ή απουσία CoCl<sub>2</sub>, προκάλεσε μία ήπια μείωση στη συσπαστικότητα των κυττάρων λόγω Ach.



*Εικόνα 41: Ποσοτικοποίηση της επίδρασης του αργού δότη του H<sub>2</sub>S, GYY4137 στη συσπαστικότητα των ΛΜΚ παρουσία ή απουσία CoCl<sub>2</sub> για 24h. Η απόκριση εκτιμήθηκε ως το ποσοστό της επιφάνειας των ΛΜΚ 10 λεπτά μετά την προσθήκη Ach (10<sup>-3</sup> M) σε σχέση με την αρχική επιφάνεια προ της προσθήκης αυτής.*

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ΛΜΚΑ εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία χρόνιων αναπνευστικών νόσων, όπου συχνά υπάρχει υποξία. Το  $H_2S$  αναφέρεται ότι έχει κυτταροπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές δράσεις έναντι ιστικών βλαβών προκαλούμενων από υποξία, της οποίας κύριος ρυθμιστής είναι ο HIF. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος του  $H_2S$  στην απόκριση πρωτογενών ΛΜΚΑ σε συνθήκες υποξίας και στη συστολή αυτών. Αποδείχθηκε ότι το  $H_2S$  δεν επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-1α και ότι ασκεί ήπια χάλαση στα ΛΜΚΑ στην υποξία.

Συγκεκριμένα, διερευνήσαμε την επίδραση στα ΛΜΚΑ τραχείας κουνελιού του εξωγενώς χορηγούμενου  $H_2S$  με τη χρήση γρήγορου (NaHS) και αργού (GYY4137) δότη, σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, χρησιμοποιώντας το μιμητή της υποξίας  $CoCl_2$ . Από τα πειράματα αυτά βρέθηκε ότι επώαση των ΛΜΚΑ τόσο με το NaHS όσο και με το συνδιασμό NaHS και  $CoCl_2$  δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα της HIF-1α πρωτεΐνης (εικόνα 35). Παρόμοια ήταν τα ευρήματά μας ύστερα και από επώαση με τον αργό δότη GYY4137 υπό τις ίδιες συνθήκες (εικόνα 37). Βιβλιογραφικά δεδομένα από πειράματα σε λεία μυϊκά κύτταρα αορτής επίμυος αναφέρουν ότι το NaHS ως δότης υδροθείου προκάλεσε αύξηση των επαγόμενων από  $CoCl_2$  επιπέδων της πρωτεΐνης HIF-1α και της δράσης του HIF (Liu, Pan et al. 2010), ενώ το NaHS αναφέρεται ότι αναστέλει την ενεργοποίηση του HIF-1 επαγόμενη από την υποξία μέσω μηχανισμού εξαρτώμενου από τον vHL και τα μιτοχόνδρια (Kai, Tanaka et al. 2012). Από την άλλη, σε ανθρώπινα ΜΦ το GYY4137 ως δότης του υδροθείου αύξανε τη συσσώρευση της HIF-1α πρωτεΐνης ενδοκυτταρικά (Lohninger, Tomasova et al. 2015). Ένας άλλος αργός δότης του  $H_2S$ , το DADs, φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα του HIF-1α σε εντεροκύτταρα τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες φλεγμονής, οδηγώντας σε λύση της φλεγμονής στην κολίτιδα (Flannigan, Agbor et al. 2015).

Επιπλέον, στις ίδιες συνθήκες εξετάστηκε η επίδραση του  $H_2S$  στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α σε ΛΜΚΑ τραχείας κουνελιού. Για το σκοπό αυτό εφαρμόσαμε την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Παρατηρήσαμε συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα στα δείγματα που επώαστηκαν με  $CoCl_2$  με ελαφρώς εντονότερο σήμα στις καλυπτρίδες που συνδιάζαν τους δότες του  $H_2S$  (NaHS ή GYY4137 έκαστος) και  $CoCl_2$ . Η σημασία του εντοπισμού του HIF-1α έγκειται στο γεγονός ότι ο HIF-1α εισέρχεται στον πυρήνα και μετέπειτα ετεροδιμερίζεται και σταθεροποιείται για να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας στον υποκινητή γονιδίων-στόχων, επαγόμενων στην υποξία (Mylonis, Chachami et al. 2008, Semenza 2009).

Στη συνέχεια, θελήσαμε να μελετήσουμε σε ΛΜΚΑ την επίδραση του ενδογενώς παραγόμενου  $H_2S$  στα επίπεδα του HIF-1α στη νορμοξία και στην υποξία επαγόμενη από  $CoCl_2$ . Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε τον αναστολέα του πιο επαγωγίμου ενζύμου σύνθεσης του  $H_2S$  (CSE), την PPG. Η επώαση των ΛΜΚΑ τραχείας κουνελιού με τον αναστολέα PPG αύξησε τα επίπεδα της HIF-1α πρωτεΐνης, ενώ παράταση επώασης για 24h είχε τα αντίθετα αποτελέσματα, δηλαδή μείωση στην επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α (εικόνα 39). Όσον αφορά τα επίπεδα της πρωτεΐνης της CSE στις ίδιες συνθήκες, δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές. Είναι γνωστό ότι σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου των ωοθηκών εφαρμόστηκε υποξία μετά από προσθήκη PPG, που είχε ως αποτέλεσμα μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης του HIF-1α (Verschoor and Singh 2013), ενώ σε κύτταρα φαιοχρωμοκυτώματος ποντικού σε υποξία παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του βιοσυνθετικού ενζύμου CBS του υδροθείου (Lan, Liao et al. 2011). Το ίδιο φάνηκε και σε μελέτη ανθρώπινων νεφρικών κυττάρων του εγγύς εσπειραμένου, που ετέθησαν σε συνθήκες υποξίας/επανοξυγόνωσης και η πρωτεϊνική έκφραση τόσο της CBS όσο και της CSE ήταν μειωμένη (Wang, Isaak et al. 2014).

Τελευταία, μελετήθηκε η επίδραση του αργού δότη του υδροθείου, GYY4137 στην απόκριση των ΛΜΚΑ τραχείας κουνελιού σε ACh (έναν αγωνιστή των χολινεργικών υποδοχέων) παρουσία ή απουσία  $CoCl_2$ . ΛΜΚΑ τραχείας κουνελιού υπέστησαν στέρηση ορού για 72h, ώστε να αποκτήσουν το συστατικό φαινότυπο των ΛΜΚ. Ακολούθησε επώαση με το δότη GYY4137 παρουσία ή απουσία  $CoCl_2$  και πρόκληση σύσπασης με ACh. Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα έδειξαν ότι σε όλες τις συνθήκες επώασης παρατηρείται μία μείωση της συσπαστικής απόκρισης των ΛΜΚΑ, η οποία ήταν πιο εμφανής σε συνθήκες επώασης με  $CoCl_2$ , χωρίς όμως τα αποτελέσματα να είναι στατιστικά σημαντικά. Φαίνεται λοιπόν ότι ο αργός δότης GYY4137, και κατά συνέπεια το  $H_2S$  προκαλεί μείωση της σύσπασης των ΛΜΚΑ από ACh σε υποξία και νορμοξία.

Είναι γνωστό, ότι το  $H_2S$  συμμετέχει τόσο σε φυσιολογικές, όσο και σε παθολογικές λειτουργίες του αναπνευστικού και προτείνεται ως βιοδείκτης σε φλεγμονώδεις καταστάσεις (Hatziefthimiou A. 2015). Ταυτόχρονα, στις χρόνιες νόσους του αναπνευστικού επικρατεί υπεροχή του παρασυμπαθητικού με αύξηση της έκφρασης των μουσκαρινικών υποδοχέων στην επιφάνεια των ΛΜΚΑ, με αποτέλεσμα αύξηση της συσπαστικότητας των λείων μυϊκών ινών και την αναδιαμόρφωση των αεραγωγών (Chen and Wang 2012, Stamatiou, Paraskeva et al. 2014). Επίσης, η παρατεταμένη στέρηση ορού σε ΛΜΚ προωθεί την έκφραση στην κυτταρική επιφάνεια μουσκαρινικών υποδοχέων, γεγονός που κάνει τα κύτταρα πιο ευαίσθητα σε διέγερση με ACh (Halayko and Amrani 2003). Ο λόγος που επιλέχθηκε ο αργός δότης του  $H_2S$  είναι

επειδή προσομοιάζει καλύτερα την παραγωγή και απόδοση του  $H_2S$  στους ιστούς που γίνεται υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Περαιτέρω, θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνήσουμε το ρόλο του  $H_2S$  στην αναδιαμόρφωση των ΛΜΚ των αγγείων. Σε πολλές παθοφυσιολογικές οντότητες του αναπνευστικού συνυπάρχει υποξική πνευμονική υπέρταση, καταδεικνύοντας ως αιτία τη χρόνια διαλείπουσα υποξία (Evans, Hardie et al. 2011), που αυξάνει την παραγωγή του  $H_2S$  μέσω σημάτων που λαμβάνονται από τους χημειοϋποδοχείς του καρωτιδικού σωματίου (Prabhakar and Semenza 2012, Prabhakar 2013), επιτείνοντας έτσι τη φλεγμονώδη απόκριση και την αναδιαμόρφωση των πνευμονικών και συστηματικών αγγείων (Wu, Teng et al. 2015). Επιπλέον και σε μελέτες ισχαιμίας-επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι τώρα, το  $H_2S$  επιδεικνύει κυτταροπροστατευτικό ρόλο (Elrod, Calvert et al. 2007) και δυνητικά μπορεί να αξιοποιηθεί θεραπευτικά η συνδιαστική του δράση.

Ανακεφαλαιώνοντας, η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία μελέτησε τη σχέση  $H_2S$  και HIF-1α καθώς και τη σύσπαση από ACh στα ΛΜΚΑ σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το  $H_2S$  δεν επηρεάζει σημαντικά την έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-1α, αλλά και μία ροπή προς μείωση της συσπαστικότητας των ΛΜΚΑ μετά από έκθεση σε ACh στην υποξία, λόγω της προσθήκης σε αυτά του εξωγενώς χορηγούμενου  $H_2S$ . Ίσως θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνήσουμε τις δράσεις του δύσοσμου  $H_2S$  και σε ανθρώπινες σειρές κυττάρων αεραγωγών. Άλλωστε, όπως αναφέρεται και στους Άθλιους του Βίκτωρος Ουγκώ: “ό,τι φαίνεται να είναι φρικτό, δύσοσμο απόβλητο ήταν πραγματικά η ψυχή του λαού αυτής της πόλης και εκπροσωπεί όλες τις πτυχές της ανθρωπότητας” (Boron W. F. 2006, Al-Muhsen, Johnson et al. 2011)

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Instruction Manual, Biorad.
2. Acker, T. and K. H. Plate (2004). "Hypoxia and hypoxia inducible factors (HIF) as important regulators of tumor physiology." Cancer Treat Res **117**: 219-248.
3. Al-Muhsen, S., et al. (2011). "Remodeling in asthma." J Allergy Clin Immunol **128**(3): 451-462; quiz 463-454.
4. An, S. S., et al. (2007). "Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma." Eur Respir J **29**(5): 834-860.
5. Baea SH, J. J., Parka JA, Kima SH, Baec MK, Choid SJ (2004). "Sumoylation increases HIF-1 $\alpha$  stability and its transcriptional activity. ." Biochem Biophys Res Commun: 394-400.
6. Bardos II, A. M. (2005). "Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network." Biochim Biophys Acta: 107-120.
7. Bibli, S. I., et al. (2015). "Role of cGMP in hydrogen sulfide signaling." Nitric Oxide **46**: 7-13.
8. Boron W. F., B. E. L. (2006). Ιατρική Φυσιολογία, Κυτταρική και Μοριακή Προσέγγιση. Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
9. Borsi, E., et al. (2015). "Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factor 1 alpha in multiple myeloma." Transl Res **165**(6): 641-650.
10. Brat, D. J., et al. (2003). "Genetic modulation of hypoxia induced gene expression and angiogenesis: relevance to brain tumors." Front Biosci **8**: d100-116.
11. Bruzzese, L., et al. (2014). "NF-kappaB enhances hypoxia-driven T-cell immunosuppression via upregulation of adenosine A(2A) receptors." Cell Signal **26**(5): 1060-1067.
12. Campbell N. A., R. J. B., Urry L.A. (2010). Campbell Biology. USA, Pearson.

13. Chachami, G., et al. (2009). "Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha into the nucleus involves importins 4 and 7." Biochem Biophys Res Commun **390**(2): 235-240.
14. Chachami, G., et al. (2004). "Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism." Am J Respir Cell Mol Biol **31**(5): 544-551.
15. Chan, M. V. and J. L. Wallace (2013). "Hydrogen sulfide-based therapeutics and gastrointestinal diseases: translating physiology to treatments." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **305**(7): G467-473.
16. Chen, Y. and R. Wang (2012). "The message in the air: hydrogen sulfide metabolism in chronic respiratory diseases." Respir Physiol Neurobiol **184**(2): 130-138.
17. Chiba, Y., et al. (2010). "RhoA, a possible target for treatment of airway hyperresponsiveness in bronchial asthma." J Pharmacol Sci **114**(3): 239-247.
18. Depping, R., et al. (2008). "Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway." Biochim Biophys Acta **1783**(3): 394-404.
19. Doe MR, A. J., Kaur M, Cole MD (2012). "Myc posttranscriptionally induces HIF1 protein and target gene expression in normal and cancer cells." Cancer research: 949-957.
20. Dunn, W. R., et al. (2016). "Effects of hydrogen sulphide in smooth muscle." Pharmacol Ther **158**: 101-113.
21. Elrod, J. W., et al. (2007). "Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(39): 15560-15565.
22. Eltzschig, H. K. and P. Carmeliet (2011). "Hypoxia and inflammation." N Engl J Med **364**(7): 656-665.
23. Evans, A. M., et al. (2011). "Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms of oxygen-sensing." Curr Opin Anaesthesiol **24**(1): 13-20.
24. Flannigan, K. L., et al. (2015). "Proresolution effects of hydrogen sulfide during colitis are mediated through hypoxia-inducible factor-1alpha." FASEB J **29**(4): 1591-1602.

25. Flugel, D., et al. (2007). "Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner." Mol Cell Biol **27**(9): 3253-3265.
26. Gosens, R., et al. (2006). "Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD." Respir Res **7**: 73.
27. Guo, W., et al. (2013). "Hydrogen sulfide and translational medicine." Acta Pharmacol Sin **34**(10): 1284-1291.
28. Halayko, A. J. and Y. Amrani (2003). "Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma." Respir Physiol Neurobiol **137**(2-3): 209-222.
29. Hatziefthimiou A., S. R. (2015). "Role of hydrogen sulphide in airways." World Journal of Respiriology **5**: 152-159.
30. Hu, Y., et al. (2013). "Recent agents targeting HIF-1alpha for cancer therapy." J Cell Biochem **114**(3): 498-509.
31. Hughes, M. N., et al. (2009). "Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review." Free Radic Biol Med **47**(10): 1346-1353.
32. Hunter J.A.A., B. N. A., Colledge N.R., Walker B.R. (2009). Davidson's Γενικές Αρχές και Κλινική Πράξη της Ιατρικής. Αθήνα, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου.
33. Jeong, J. W., et al. (2002). "Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation." Cell **111**(5): 709-720.
34. Jude, J. A., et al. (2008). "Calcium signaling in airway smooth muscle." Proc Am Thorac Soc **5**(1): 15-22.
35. Kai, S., et al. (2012). "Hydrogen sulfide inhibits hypoxia- but not anoxia-induced hypoxia-inducible factor 1 activation in a von hippel-lindau- and mitochondria-dependent manner." Antioxid Redox Signal **16**(3): 203-216.
36. Kaliner M.A., B. P. J., Persson C.G.A. (1991). Asthma, Its Pathology and Treatment. NY, Marcel Dekker.

37. Kalousi, A., et al. (2010). "Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1." J Cell Sci **123**(Pt 17): 2976-2986.
38. Kloesch, B., et al. (2016). "Hydrogen sulfide inhibits endothelial nitric oxide formation and receptor ligand-mediated Ca(2+) release in endothelial and smooth muscle cells." Pharmacol Rep **68**(1): 37-43.
39. Kolluru, G. K., et al. (2013). "A tale of two gases: NO and H<sub>2</sub>S, foes or friends for life?" Redox Biol **1**: 313-318.
40. Kumar V., C. R., Robbins S. (2008). Robbin's Βασική Παθολογική Ανατομία. Athens, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου.
41. Lambert, J. P., et al. (2014). "Hydrogen sulfide provides cardioprotection against myocardial/ischemia reperfusion injury in the diabetic state through the activation of the RISK pathway." Med Gas Res **4**(1): 20.
42. Lan, A., et al. (2011). "Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced injury by inhibiting ROS-activated ERK1/2 and p38MAPK signaling pathways in PC12 cells." PLoS One **6**(10): e25921.
43. Lando, D., et al. (2002). "FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor." Genes Dev **16**(12): 1466-1471.
44. Li F, S. P., Rabbani ZN, Liu S, Yan B, Huang Q (2007). "Regulation of HIF-1 $\alpha$  Stability through S-nitrosylation." Mol Cell: 63-74.
45. Liu, X., et al. (2010). "Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is involved in the pro-angiogenic effect of hydrogen sulfide under hypoxic stress." Biol Pharm Bull **33**(9): 1550-1554.
46. Lohninger, L., et al. (2015). "Hydrogen sulphide induces HIF-1 $\alpha$  and Nrf2 in THP-1 macrophages." Biochimie **112**: 187-195.
47. Lotvall J., P. J. Respiratory Research, BioMed Central. **12931**.
48. Luo, J. C. and M. Shibuya (2001). "A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  and 3 $\alpha$ )." Oncogene **20**(12): 1435-1444.
49. Majmundar, A. J., et al. (2010). "Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress." Mol Cell **40**(2): 294-309.



50. Marien E.M., H. K. (2007). Human Anatomy and Physiology. San Francisco, Pearson International Edition.
51. Mylonis, I., et al. (2008). "Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK." J Biol Chem **283**(41): 27620-27627.
52. Noble, P. B., et al. (2014). "Airway smooth muscle in asthma: linking contraction and mechanotransduction to disease pathogenesis and remodelling." Pulm Pharmacol Ther **29**(2): 96-107.
53. Olson, K. R. (2011). "The therapeutic potential of hydrogen sulfide: separating hype from hope." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **301**(2): R297-312.
54. Olson, K. R. (2015). "Hydrogen sulfide as an oxygen sensor." Antioxid Redox Signal **22**(5): 377-397.
55. Osmond JM, K. N. (2014). "Modulation of hydrogen sulfide by vascular hypoxia." Hypoxia.
56. Paul, B. D. and S. H. Snyder (2015). "H<sub>2</sub>S: A Novel Gasotransmitter that Signals by Sulfhydration." Trends Biochem Sci **40**(11): 687-700.
57. Pelaia, G., et al. (2008). "Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: implications for asthma." Respir Med **102**(8): 1173-1181.
58. Podar K., A. K. (2010). "A therapeutic role for targeting c-Myc/Hif-1-dependent signaling pathways." Cell cycle: 1722-1728.
59. Polhemus, D. J. and D. J. Lefer (2014). "Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease." Circ Res **114**(4): 730-737.
60. Prabhakar, N. R. (2013). "Sensing hypoxia: physiology, genetics and epigenetics." J Physiol **591**(9): 2245-2257.
61. Prabhakar, N. R. and G. L. Semenza (2012). "Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2." Physiol Rev **92**(3): 967-1003.
62. Prabhakar, N. R. and G. L. Semenza (2012). "Gaseous messengers in oxygen sensing." J Mol Med (Berl) **90**(3): 265-272.

63. Prakash, Y. S. (2013). "Airway smooth muscle in airway reactivity and remodeling: what have we learned?" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **305**(12): L912-933.
64. Semenza, G. L. (2009). "Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1." Physiology (Bethesda) **24**: 97-106.
65. Semenza, G. L. (2010). "Oxygen homeostasis." Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med **2**(3): 336-361.
66. Semenza, G. L. (2012). "Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine." Cell **148**(3): 399-408.
67. Semenza, G. L. (2014). "Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology." Annu Rev Pathol **9**: 47-71.
68. Sha Y, M. H. (2012). "S-nitrosylation in the regulation of gene transcription." Biochim Biophys Acta: 701-711.
69. Shim H. S., L. V. D. (2015). "A protein Restriction-Dependent Sulfur Code for Longevity." Cell: 15-17.
70. Stamatiou, R., et al. (2012). "Cytokines and growth factors promote airway smooth muscle cell proliferation." ISRN Inflamm **2012**: 731472.
71. Stamatiou, R., et al. (2014). "Long-term exposure to muscarinic agonists decreases expression of contractile proteins and responsiveness of rabbit tracheal smooth muscle cells." BMC Pulm Med **14**: 39.
72. Szabo, C. (2016). "Gasotransmitters in cancer: from pathophysiology to experimental therapy." Nat Rev Drug Discov **15**(3): 185-203.
73. Tiwari P., D. S., Singh M.P., Mishra R., Chandy A. (2013). "Basic and modern concepts on cholinergic receptor: a review." Asian Pacific Journal of Tropical Diseases.
74. Tsapournioti, S., et al. (2013). "TNFalpha induces expression of HIF-1alpha mRNA and protein but inhibits hypoxic stimulation of HIF-1 transcriptional activity in airway smooth muscle cells." J Cell Physiol **228**(8): 1745-1753.
75. Verschoor, M. L. and G. Singh (2013). "Ets-1 regulates intracellular glutathione levels: key target for resistant ovarian cancer." Mol Cancer **12**(1): 138.

76. Wallace, J. L. and R. Wang (2015). "Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter." Nat Rev Drug Discov **14**(5): 329-345.
77. Wang, P., et al. (2014). "Downregulation of cystathionine beta-synthase and cystathionine gamma-lyase expression stimulates inflammation in kidney ischemia-reperfusion injury." Physiol Rep **2**(12).
78. Wang, R. (2012). "Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed." Physiol Rev **92**(2): 791-896.
79. Wang, R. (2014). "Gasotransmitters: growing pains and joys." Trends Biochem Sci **39**(5): 227-232.
80. Webb, R. C. (2003). "Smooth muscle contraction and relaxation." Adv Physiol Educ **27**(1-4): 201-206.
81. Wolffa M., J. W., Dunstb J., Deppinga R. (2013). "The Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT/HIF-1 $\beta$ ) is Influenced by Hypoxia and Hypoxia-Mimetics." Cellular Physiology and Biochemistry **32**: 849-858.
82. Wu, B., et al. (2015). "Interaction of Hydrogen Sulfide with Oxygen Sensing under Hypoxia." Oxid Med Cell Longev **2015**: 758678.
83. Yasinka IM, S. V. (2003). "S-nitrosation of Cyst-800 of HIF-1K protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity." FEBS letters: 105-109.
84. Yoon H., L. J., Cho CH, Huang LE, Park JW (2011). "CITED2 controls the hypoxic signaling by snatching p300 from the two distinct activation domains of HIF-1 $\alpha$ ." Biochim Biophys Acta: 2008-2016.
85. Zhao, Y., et al. (2014). "Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) releasing agents: chemistry and biological applications." Chem Commun (Camb) **50**(80): 11788-11805.
86. K., Σ. (2008). Πνευμονολογία, Παθοφυσιολογία των Πνευμονικών Νόσων. Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.