
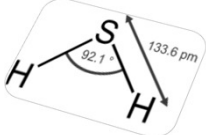



ΔΗΜΟΚΡΕΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
«Κλινική Φαρμακολογία και Θεραπευτική»
Ζόγou Μαρία Ελένη (Α.Ε.Μ. 453)
Επιβλέψη: Επικ. Καθηγήτρια Α. Ταυρίδου
 Διπλωματική εργασία
 «Η επίδραση της φαρμακολογικής τροποποίησης του υδρόθειου στην
 αλληλεπίδραση κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος»
 ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ
 2013

Τι είναι το υδρόθειο?


- ✗ Αχρόμο
- ✗ Εύφλεκτο
- ✗ Υδατοδιαλυτό
- ✗ Αέριο
- ✗ Χαρακτηριστική οσμή κλούβιου αυγού

- ✗ Παράγεται από την L-κυστεΐνη με το ένζυμο γ-λυσή της κυσταθειονίνης (CSE) και τη β-συνθάση της κυσταθειονίνης (CBS)
- ✗ Τα ένζυμα για την παραγωγή H₂S χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα την L-cysteine και ως συμπράγοντα το pyridoxal phosphate



Beauchamp *et al.*, 1984
 Boring *et al.*, 1998
 Reiffenstein *et al.*, 1992
 Dombkowski *et al.*, 2004
 Webb *et al.*, 2008
 Zhou *et al.*, 2012

Τοξικό ή Αναγκαίο?

Για πολλά χρόνια το H₂S θεωρείτο ένα τοξικό και επικίνδυνο για το περιβάλλον αέριο

Ωστόσο στην πραγματικότητα είναι ένα μόριο που απαντάται φυσικά στον οργανισμό μας

Επιτελεί σηματοδοτικούς ρόλους, μόνο ή από κοινού μαζί με CO & NO

Επιδράσεις του H₂S στον οργανισμό

- ✗ Το H₂S έχει δείχθει ότι ρυθμίζει ένα συνεχώς αυξανόμενο αριθμό φυσιολογικών λειτουργιών όπως:
 - τη ρύθμιση ανοσοβιολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων (Lee *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009a; Sodha *et al.*, 2009)
 - το κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα (Eto *et al.*, 2002; Kimura, 2002)
 - τον κυτταρικό κύκλο (Baskar *et al.*, 2011)
 - τη βιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος (Olson *et al.*, 2008; Beltowski, 2004; Tang *et al.*, 2005; Gallego *et al.*, 2008; Teague *et al.*, 2002)

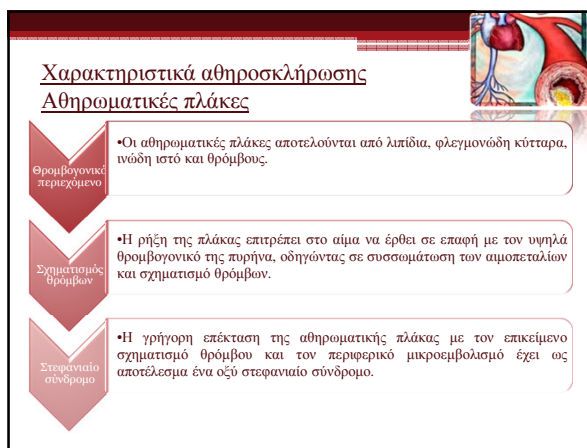


Χημικές ενώσεις-δότες H₂S

- ✗ Ανάλογα L-Cysteine
- ✗ NaHS
- ✗ Na₂S
- ✗ GYY4137
- ✗ Thiovaline, Thioglycine (θειοαμινοξέα)

NaHS
GYY4137

Zhou et al., 2012



Παθογένεια αθηροσκλήρωσης

Υπόθεση οξειδωμένης LDL (oxLDL)

- ✘ Η λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) συσσωρεύεται στην υποενδοθηλιακή κυτταρική στοιβάδα των αγγείων.
- ✘ Η παγιδευμένη LDL είναι ευαίσθητη σε τροποποιήσεις, κυρίως σε οξείδωση, οδηγώντας στο σχηματισμό oxLDL.
- ✘ Η παρουσία oxLDL διεγείρει την ενεργοποίηση των αγγείων και οδηγεί στην επαγωγή έκφρασης προ-φλεγμονωδών γονιδίων, όπως μορίων προσκόλλησης και στη στρατολόγηση μονοκυττάρων στην υποενδοθηλιακή κυτταρική στοιβάδα (Hessler *et al.*, 1983)
- ✘ Όταν είναι παρόντα μονοκύτταρα, αυτά πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται σε μακροφάγα και προσλαμβάνουν oxLDL για να σχηματίσουν αφρώδη κύτταρα που ενισχύουν τη φλεγμονώδη απόκριση και συμβάλλουν στην εξέλιξη της νόσου.

Ο ρόλος του H₂S στην αθηροσκλήρωση



Σκοπός της μελέτης

- ✘ Να εξετάσει την επίδραση του H₂S πάνω στην αλληλεπίδραση δύο ειδών κυττάρων, των μονοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων.
- ✘ Επιμέρους δράσεις δύο δοτών H₂S, των NaHS και GYY4137.
- ✘ Το H₂S πιθανώς να μπορεί να αποτρέπει την αλληλεπίδραση των δύο ειδών κυττάρων όταν βρίσκονται σε μία φλεγμονώδη κατάσταση, όπως συμβαίνει στην αθηροσκλήρωση.
- ✘ Έλεγχος με πειράματα συνεπάωσης των δύο ειδών κυττάρων.
- ✘ Διερεύνηση της θεραπείας με H₂S στην τροποποίηση της προσκόλλησης των μονοκυττάρων πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα, υπό φλεγμονώδη κατάσταση.

Υλικά & Μέθοδοι

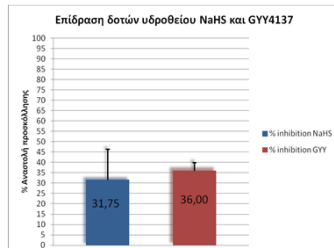
N/A	Αντιβιοτικό	Εταιρεία
1	DMEM (high glucose)	Gibco
2	RPMI 1640	Biosera
3	FBS	Biosera
4	Τρυπσίν 0.25% EDTA	Gibco
5	FBS Mg ²⁺ Ca ²⁺ 10x	Biosera
6	Penicillin- Streptomycin	Gibco
7	HAT 10x	Gibco
8	TNFα	Acris
9	NaHS	Cayman
10	GYY4137	Cayman
11	Paraformaldehyde	MP Biomedical

- ✘ Καλλιέργεια ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων EA.Hy926
- ✘ Καλλιέργεια ανθρώπινων μονοκυττάρων THP-1

Πρωτόκολλο συνεπώσεως

1. Γίνεται επίτρωση των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.Hy926 σε 12 well-plate με συγκέντρωση κυττάρων 300.000 κύτταρα/ml ανά well σε θρεπτικό DMEM (+ FBS, HAT, Penicillin, Streptomycin).
2. Γίνεται καλλιέργεια των κυττάρων στο 12 well-plate για 33 ώρες.
3. Αφού τα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση 90% confluent στα wells, γίνεται πρωτόκολλο starvation για 12 ώρες, όπου τα κύτταρα καλλιερρούνται σε θρεπτικό χωρίς FBS.
4. Μετά το βήμα του starvation τα κύτταρα επωάζονται με φαρμακολογικό δότη H_2S :
 - 4α. Δότης NaHS (100 μ M): επώαση 30 λεπτών
 - 4β. Δότης GYY4137 (100 μ M - 300 μ M): επώαση 30 λεπτών - 1 ώρα
5. Γίνεται επώαση των κυττάρων με 10ng/ml TNF α για 6 ώρες.
6. Μετά την 6ωρη επώαση αφαιρείται το θρεπτικό των ενδοθηλιακών κυττάρων το οποίο περιέχει το φαρμακολογικό δότη και τον TNF α και γίνεται προσθήκη THP-1 50.000-400.000 κύτταρα/ml ανά well, σε θρεπτικό RPMI 1640 (+ FBS, Penicillin, Streptomycin). Γίνεται συνεπώαση των δύο κυττάρων για 30 λεπτά έως 1 ώρα.
7. Μετά το πέρας της συνεπώσεως, αφαιρείται το θρεπτικό και ακολουθούν 3 πλύσεις των wells με PBS.
8. Κατόπιν, πραγματοποιείται μονιμοποίηση των κυττάρων με προσθήκη 4% paraformaldehyde.
9. Ακολουθεί παρατήρηση στο μικροσκόπιο και υπολογισμός της προσκόλλησης των κυττάρων.

Αποτελέσματα



Γράφημα παρουσίασης της επίδρασης των δοτών υδροθείου NaHS (100 μ M, προθεραπεία διάρκειας 30 λεπτών) και GYY4137 (100-300 μ M, προθεραπεία διάρκειας 30 λεπτών ή 1 ώρα). Στη γραμική παράσταση παρουσιάζεται η επί των εκατό ποσοστιαία μείωση της προσκόλλησης των μονοκυττάρων THP-1 (50.000-400.000cells/ml) πάνω σε εαυτοφωμένους EA.Hy926 κύτταρα συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου.

Παρατηρήθηκε αναστολή στην προσκόλληση των κυττάρων THP-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα της τάξεως του $31,75 \pm 14,7\%$ για το δότη NaHS και $36,00 \pm 4\%$ για το δότη GYY4137.

Συζήτηση

- Δεν υπάρχει δημοσιευμένη μελέτη η οποία να εξετάζει την αλληλεπίδραση των συγκεκριμένων δύο ειδών κυττάρων.
- Το H_2S αποτρέπει την προσκόλληση των μονοκυττάρων πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα.
- Η αναστολή που παρατηρήθηκε με το NaHS είναι παρόμοια με αυτή που περιγράφεται στη μελέτη των Pan et al. (2011), όπου πραγματοποιείται ένα παρόμοιο πρωτόκολλο προθεραπείας με NaHS και παρατηρείται αναστολή προσκόλλησης κατά 45%.
- Το GYY4137 αναστέλλει την προσκόλληση ισχυρότερα συγκριτικά με το NaHS.
- Σύγκριση GYY4137 και NaHS.

Συζήτηση

- Το H_2S δρα με πολλαπλούς τρόπους, είτε πάνω στη γονιδιακή έκφραση, είτε με την τροποποίηση βιολογικών μορίων, είτε με τη μείωση ή την αύξηση βιοχημικών δεικτών.
- Αναφορικά με τα πειράματα προσκόλλησης, αρκετές μελέτες έχουν δείξει την επίδραση του H_2S στην έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως τα VCAM-1, ICAM-1, και P- των E-selectins, καθώς και του πυρηνικού υποδοχέα ρύθμισης των μορίων προσκόλλησης NOR-1 ή του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B.

Συμπεράσματα

1. Η προθεραπεία με δότες H_2S αναστέλλει την προσκόλληση μονοκυττάρων πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα
2. Ο δότης GYY4137 προκαλεί μεγαλύτερη αναστολή προσκόλλησης σε σχέση με το δότη NaHS
3. Το μόριο του H_2S λειτουργεί με αντιφλεγμονώδη τρόπο, προλαμβάνοντας την εμφάνιση φλεγμονής στα ενδοθηλιακά κύτταρα και αποτρέποντας την πρόσδεση των κυττάρων της φυσικής ανοσίας πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος.

Ευχαριστίες

Εργ. Φαρμακολογίας, Ιατρική, Α.Π.Θ
Επ. Καθ. Α. Ταυρίδου
Αν. Καθ. Ε. Μανωλόπουλος
Καθ. Γ. Κολιός

Εργ. Μοριακής Φαρμακολογίας, Ιατρική, Παν. Πατρών
Καθ. Α. Παπαπετρόπουλος

Εργ. Βιοχημείας, Ιατρική, Παν. Κρήτης
Καθ. Δ. Καρδάση

Γιόργο
Κρίνα
Νιτσάκι
Νικόλα

Όλα τα παιδιά του εργαστηρίου.....



Ευχαριστώ πολύ!!!