

Το Υδρόθειο Επάγει την Αγγειογένεση

Αναστασία Πυριόχου¹, Αντωνία Μαραζιώτη¹, Csaba Szabo² και
Ανδρέας Παπαπετρόπουλος¹

¹Εργαστήριο Μοριακής Φαρμακολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πάτρας, Πάτρα, Ελλάς. ²Icaria, Inc, Seattle, Washington

Λέξεις κλειδιά: Υδρόθειο, αγγειογένεση, κινάσες, κανάλια K^+_{ATP} , hsp27

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το υδρόθειο (H_2S) αποτελεί ένα σημαντικό σηματοδοτικό μόριο, τόσο στο καρδιαγγειακό, όσο και το Νευρικό Σύστημα. Αν και το H_2S έχει αγγειοχαλαρωτικές ιδιότητες, κάτι που οδηγεί σε μείωση της αρτηριακής πίεσης, ο ρόλος του μορίου αυτού σε άλλες πτυχές της βιολογίας του καρδιαγγειακού συστήματος παραμένει κατά μεγάλο ποσοστό ανεξερεύνητος.

Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε το ρόλο του H_2S στην αγγειογένεση και σε ιδιότητες των ενδοθηλιακών κυττάρων που σχετίζονται με την αγγειογένεση.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Προκειμένου να μελετηθούν οι δράσεις του H_2S στην αγγειογένεση, χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα που απελευθερώνει H_2S . Σε όλα τα *in vitro* πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που απομονώθηκαν από φλέβα ανθρώπινου ομφάλιου λώρου (HUVEC). Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός προσδιορίστηκε από μετρήσεις του αριθμού των κυττάρων. Η κυτταρική μετανάστευση έγινε σε τροποποιημένο σύστημα Boyden ενώ ο σχηματισμός πλέγματος αγγειακού τύπου δομών εξετάστηκε σε υπόστρωμα Matrigel. Η φωσφορυλίωση κινασών μελετήθηκε σε ανοσοσύστημα κατά Western με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. *In vivo*, η δράση του H_2S εξετάστηκε στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη του εμβρύου όρνιθας (CAM).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επώαση EK με H_2S ενίσχυσε τις ιδιότητες των ενδοθηλιακών κυττάρων που σχετίζονται με την αγγειογένεση. Πιο συγκεκριμένα, προήγαγε τον πολλαπλασιασμό και τη μεταναστευτική ικανότητα των EK, καθώς και τη δημιουργία αγγειακού τύπου δομών, όταν τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα Matrigel. *In vivo* επώαση της CAM με H_2S οδήγησε σε δοσοεξαρτημένη αύξηση του μήκους των νεοσχηματιζόμενων αγγείων. Επιπλέον, έκθεση των EK στο H_2S οδήγησε σε ενεργοποίηση κινασών που συνδέονται με την αγγειογένεση, όπως την Akt κινάση και τις MAP κινάσες ERK και p38. Προεπώαση, δε, των EK με τον αναστολέα των ευαίσθητων στο ATP καναλιών ιόντων καλίου (K^+_{ATP}), γλυβουριδη, ή τον αναστολέα της p38 MAP κινάσης, SB203580, οδήγησε στην αναστολή της κυτταρικής μετανάστευσης που προκαλεί το H_2S . Επιπλέον, η γλυβουριδη εμπόδισε τη φωσφορυλίωση της p38 που προκαλείται από το H_2S , υποδηλώνοντας ότι τα κανάλια K^+_{ATP} βρίσκονται πάνω από την p38 στο σηματοδοτικό μονοπάτι και διαμεσολαβούν τις αγγειογενετικές δράσεις του H_2S . Ενεργοποίηση των K^+_{ATP} καναλιών οδηγούν στη φωσφορυλίωση της hsp27 από την p38 κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της κινητικότητας των EK. Καταστολή της έκφρασης της hsp27 με siRNA οδήγησε σε περιορισμένη κυτταρική μετανάστευση που προκαλεί το H_2S . Προκειμένου να καθορίσουμε αν το ενδογενώς παραγόμενο H_2S

έχει τις ίδιες αγγειογενετικές δυνατότητες με αυτό που εφαρμόζεται εξωγενώς στην CAM, χρησιμοποιήθηκε ένας αναστολέας της βιοσύνθεσης του H₂S, ο PAG. Πράγματι, επώαση των μεμβρανών με PAG οδήγησε, τόσο σε μείωση του μήκους των αγγείων της χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης, όσο και σε μείωση των εκβλαστήσεων στα αγγεία αυτά. Τέλος, προεπώαση EK με PAG ή γλυβουρίδη ανέστειλε την κυτταρική μετανάστευση που επάγει ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι το εξωγενώς χορηγούμενο ή το ενδογενώς παραχθέν H₂S ενισχύει τις ιδιότητες των EK που σχετίζονται με την αγγειογένεση και αυτό επιτελείται μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση MAP κινασών και των καναλιών K⁺_{ATP}.

Hydrogen Sulphide Induces Angiogenesis

Anastasia Pyriochou¹, Antonia Marazioti¹, Csaba Szabo² and Andreas Papapetropoulos¹

¹Laboratory of Molecular Pharmacology, Department of Pharmacy, University of Patras, Patras, Hellas; ²Ikaria, Inc, Seattle, Washington, USA

Key words: Hydrogen sulphide, angiogenesis, kinases, K⁺_{ATP} channels, hsp27

SUMMARY. Hydrogen sulphide (H₂S) is emerging as an important signalling molecule in the cardiovascular and neuronal systems. Although

H₂S is known to relax vascular smooth muscle leading to a reduction in blood pressure, the role of this gaseous mediator in other aspects of the biology of vascular cells remains largely unexplored. In order to study the effects of H₂S on neovascularisation, we have utilised an aqueous formulation of H₂S. Incubation of endothelial cells (EC) with H₂S enhanced their angiogenic potential as it promoted cell growth, migration and capillary morphogenesis on matrigel. In line with the in vitro observations, treatment of chicken chorioallantoic membranes (CAM) with H₂S increased vascular length. Moreover, exposure of EC to H₂S resulted in increased phosphorylation of kinases linked to angiogenic responses, namely Akt, ERK and p38. Pretreatment of cells with the K_{ATP} channel blocker glibenclamide or the p38 inhibitor SB203580 abolished H₂S-induced motility. Since glibenclamide inhibited H₂S-triggered p38 phosphorylation, we propose that K_{ATP} channels lay upstream of p38. Once activated, p38 phosphorylates the actin-binding protein hsp27 to promote cell motility, as hsp27 silencing reduced H₂S-driven migration. To determine whether endogenously produced H₂S, similarly to exogenously applied H₂S drives the angiogenic response, CAMs were treated with PAG, an inhibitor of H₂S biosynthesis; indeed, PAG-treated membranes displayed reduced vessel length and branching. Finally, pre-treatment of cells with PAG or glibenclamide blocked vascular-endothelial growth factor-induced migration. In conclusion, we provide evidence that endogenously produced or exogenously administered H₂S stimulates EC properties associated with angiogenesis through a K_{ATP} channel/MAPK pathway.