

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Sulfan jako signální molekula

Bakalářská práce

Autor práce: Lenka Tajbrová

Vedoucí práce: prof. Mgr. Ing. Markéta Sedmíková, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Sulfan jako signální molekula" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20. 4. 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Mgr. Ing. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování bakalářské práce.

Sulfan jako signální molekula

Souhrn

Cílem této práce je shrnout poznatky o produkci a funkci sulfanu, a to zejména v jednotlivých orgánových soustavách. Práce se rovněž zabývá možnými látkami, ze kterých může sulfan vznikat, ať již cestou přírodní, či syntetickou. Práce má za cíl popsat fyziologický význam tohoto plynu, který byl v nedávné době začleněn do skupiny gasotransmiterů. Jsou zde zmíněny nejnovější poznatky o fungování sulfanu v orgánových soustavách savců.

Klíčová slova: sulfan, produkce, prekurzor, soustava

Hydrogen Sulphide as a signaling molecule

Summary

The aim of this work is to summarize the knowledge about production and function of hydrogen sulphide especially in individual organ systems. It also deals with possible substances from which hydrogen sulphide can be formed, either naturally or synthetic. The thesis aims at identifying the physiological significance of this gas, which has recently been included in the group of gas transmitters. There are mentioned the latest findings on hydrogen sulphide functioning in mammalian organ systems.

Keywords: hydrogen sulphide, production, prodrug, system

Obsah

1	Úvod	8
1.1	Fyzikálně – chemické vlastnosti	8
1.2	Funkce sulfanu	8
1.3	Produkce sulfanu	10
1.3.1	Enzymatický způsob produkce sulfanu z L-cysteinu	12
1.3.2	Enzymatický způsob produkce sulfanu z D-cysteinu	13
1.3.3	Neenzymatický způsob produkce sulfanu	14
1.4	Mechanismus signální transdukce	14
1.4.1	Interakce s thioley – proteinová S-sulhydratace	16
1.4.2	Reakce s NO a příbuznými druhy a organickými elektrofilly	17
1.4.3	Interakce s hemoproteiny	18
1.5	Metabolismus sulfanu	19
2	Sulfan v orgánových soustavách	20
2.1	Kardiovaskulární soustava	20
2.1.1	Výskyt CBS	21
2.1.2	Sulfan jako senzor kyslíku	21
2.1.3	Aorta	22
2.1.4	Mezenterické tepny	22
2.1.5	Mozkové tepny	23
2.1.6	Srdce jako model ischemie	23
2.2	Nervová soustava	23
2.2.1	Mozek jako model ischemie	24
2.3	Pohybová soustava	24
2.3.1	Sulfan v produkci a funkci mitochondriální energie	25
2.4	Endokrinní soustava	25
2.5	Vylučovací soustava	26
2.5.1	Ledviny jako model ischemie	28
2.6	Dýchací soustava	28
2.6.1	Plicní hypertenze	29
2.7	Gastrointestinální soustava	29
2.7.1	Játra	32
2.7.2	Játra jako model ischemie	32
3	Sulfanové prekurzory léčiv	32
3.1	Sulfan ve farmakoterapii	33
3.2	Přírodní produkty odvozené od rostlin	34
3.3	Prekurzory sulfanu na hydrolytické bázi	35

3.3.1	Anorganické siřičitanové soli	35
3.3.2	Lawessonova činidla a analogy	36
3.3.3	Arylthioamidové deriváty	37
3.3.4	1, 2 – dithiol – 3 – thiony a sulfanohybridní nesteroidní protizánětlivé léky	37
3.4	Prekurzory s řízeným uvolňováním	37
3.4.1	Aktivace thiolem.....	38
3.4.2	Světlem aktivované sulfanové prekurzory.....	38
3.4.3	Thioaminová kyselina.....	38
4	Závěr	39
5	Použitá literatura	39

1 Úvod

Sulfan (H_2S) byl dlouhý čas považován pouze za toxickou sloučeninu, ovšem v nedávné době bylo zjištěno, že v nízkých koncentracích hraje důležitou roli při mnoha fyziologických procesech. Spolu s dalšími již dobře známými sloučeninami – oxidem dusnatým (NO) a oxidem uhelnatým (CO) - je plynným intracelulárním signálním přenašečem - gasotransmitterem. Produkce těchto gasotransmitterů není založena na složitých chemických procesech nebo na dodávkách z několika substrátů. Jejich jednoduchost jim dovoluje se pohybovat intra- i intercelulárně rychle a s krátkou odezvou. Nacházejí se ve všech orgánech, buňkách a různých intracelulárních organelách ve významných množstvích. Každý z nich pozitivně či negativně ovlivňuje koncentraci a další vlastnosti těch ostatních (Olas, 2014).

1.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti

Sulfan je bezbarvý, hořlavý, toxický plyn se silným zápachem po zkažených vejcích. Je to malá lipofilní molekula, a proto může volně procházet buněčnými membránami. (Fukami et Kawabata, 2015). Je to slabá kyselina rozpustná ve vodě (až 80 mmol/l při 37°C) i v tucích. Existuje převážně ve dvou formách – jako neutrální molekula H_2S (méně než 20%) a v iontové podobě HS^- . Ion S^{2-} je minoritní částí vzhledem k vysoké disociační konstantě. Ačkoli je sulfan dobře rozpustný ve vodě, v roztoku je stále velmi nestabilní. Snadno oxiduje v přítomnosti kyslíku. Další komplikace při experimentech navíc způsobuje těkavost sulfanu. Jeho koncentrace klesá tak rapidně, že její přesné změření je na tomto poli velkou výzvou (Zheng et al., 2015).

1.2 Funkce sulfanu

Fyziologické účinky sulfanu byly poprvé prokázány v roce 1996 (Abe et Kimura, 1996). Jako plynná signální molekula sulfan volně difunduje buněčnými membránami nezávisle na receptoru a aktivuje různé buněčné cíle, čímž vytváří mnoho různých biologických účinků (od cytotoxických účinků po cytoprotektivní činnost). Tyto odlišné schopnosti dělají sulfan atraktivním farmakologickým činidlem pro léčbu různých chorobných stavů.

Sulfan reguluje buněčný cyklus, apoptózu a oxidační stres (Olas, 2014). Mnoho studií prokázalo účast sulfanu při různých fyziologických i patologických dějích zahrnujících regulaci oxidativního stresu odstraňováním reaktivních kyslíkových skupin, horečku, vazodilataci a přežití neuronů (Predmore et al., 2012). Stimuluje draslíkové kanály citlivé na ATP (K_{ATP}) ve vaskulárních hladkosvalových buňkách, neuronech, kardiomyocytech a

pankreatických β buňkách a rovněž může měnit aktivitu jiných draslíkových kanálů, intracelulární pH, fosfodiesterázovou činnost a TRP kanálů senzoričtých nervů. (Dunn et al., 2016). Může navíc reagovat s kyslíkovými nebo dusíkatými skupinami, kde omezuje jejich toxické působení a také zároveň zeslabuje jejich fyziologické funkce (Łowicka et Bełtowski, 2007).

Sulfan se účastní regulace cévního tonu, kontrakcí myokardu, neurotransmise a sekrece inzulínu. Jeho nedostatek byl pozorován na různých zvířecích modelech při arteriální i pulmonální hypertenzi, Alzheimerově chorobě, zraněních žaludeční sliznice a cirhóze jater. Na druhou stranu může nadbytečná produkce sulfanu přispět k patogenezi zánětlivých onemocnění, septickému šoku, mozkové mrtvici a mentální retardaci u pacientů s Downovým syndromem. V těchto případech tedy může mít snížení produkce sulfanu léčebný účinek (Łowicka et Bełtowski, 2007).

Byl popsán ochranný účinek na neuronální buňky a také aktivace primárně aferentních neuronů rozpustným sulfanem, což dává do úvahy sulfan jako nový neurotransmitter (Chen et al., 2015). Opravdu vysoké koncentrace sulfanu inhibují synaptické přenosy v hipokampu. Fyziologické koncentrace sulfanu zvyšují produkci cAMP v primárních kulturách mozkových buněk, neuronální a gliálních buněčných liniích (Kimura, 2000). Bylo také zjištěno, že sulfan má ochrannou funkci pro neurony od oxidačního stresu, kdy usnadňuje produkci glutathionu, hlavního intracelulárního antioxidantu, a vyplachuje reaktivní kyslíkové skupiny (ROS) v mitochondriích.

Sulfan produkováný enzymem CSE v hrudní aortě, portální žíle a v kyčelníku společně s NO uvolňuje tuto hladkou svalovinu. Navíc nitrosothiolové sloučeniny (NOSH), které jsou produkovány v endoteliálních buňkách lidské pupeční žíly (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) a uvolňují NO a sulfan, mají potenciální protirakovinné a protizánětlivé účinky (Kimura, 2014).

V sítnici sulfan ochraňuje fotoreceptorové buňky od světlem vyvolané degenerace tím, že potlačuje nadměrné převýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Sulfan rovněž reguluje stres endoplazmatického retikula a umožňuje v jádře navzájem regulovat transkripci genů pro antioxidanty a antiapoptózu (Mikami et al., 2011).

Sulfan také inhibuje rozvoj rakoviny v různých stádiích a sulfanové donory jsou cytotoxické pro lidské rakovinné buňky (Lee et al., 2011). Rovněž vyvolávají zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi a podněcují apoptózu, avšak nepodporují přežití normálních lidských buněk. Několik nedávných studií ukázalo, že sulfan uvolňující NSAIDs vykazují zlepšené chemopreventivní účinky na rakovinné buňky, zatímco NSAIDs sulfan neuvolňující

žádné takové příznivé účinky neposkytují (Chattopadhyay et al., 2012). Naproti tomu je CBS obsažen ve vyšší míře v kolorektálních a vaječnickových rakovinných buňkách, kde se sulfan podílí na podpoře buněčné bioenergetiky, proliferace a migrace (Szabo et al., 2013). V těchto rakovinných buňkách by potlačení aktivity CBS mohlo být využito jako potencionální terapie.

Sulfan je rovněž úzce spojený s vývojem kostry a kostí. Oxidativní poškození je významným přispěvatelem k morfologickým a funkčním změnám ve vývoji osteoporózy (Lee et al., 2013). Sulfan byl ověřen jako potencionální terapeutické činidlo pro léčbu periodontálních a zánětlivých nemocí kostí. Sulfan má vždy dvojitý ochranný účinek při remodelaci kostí - nejenom že inhibuje kostní absorpci osteoklastických buněk, ale rovněž vytváří více kostních formací osteoblastických buněk (Liu et al., 2014).

Bylo také dokázáno, že nízké koncentrace sulfanu zvyšují účinek hladkosvalové relaxace způsobené NO až 13 krát. Ostatní thioly, včetně endogenních látek jako cystein a glutathion, neuvolňují hladké svalstvo samy o sobě a nemají synergické účinky s NO. Tato pozorování naznačují, že účinek synergické relaxace s NO na hladké svalstvo je specifický pro sulfan (Hosoki et al., 1997).

1.3 Produkce sulfanu

Celkový objem sulfanu v těle v jakémkoli okamžiku je dynamický a může pocházet z rozdílných zdrojů. Sulfan je produkován endogenně určitými enzymy savčího těla a hraje rozhodující roli v nervové, kardiovaskulární, gastrointestinální, močové a endokrinní soustavě (Fukami et Kawabata, 2015). Játra jsou dokumentována jako producent většiny endogenního sulfanu, ledviny produkují rovněž významné množství. Produkce sulfanu v ostatních orgánech je relativně velmi malá. Kromě orgánově specifických rozdílů v produkci sulfanu byly zjištěny také specifické rozdíly v rámci jeho produkce. Mimoto lidská dieta, která je bohatá na organické sloučeniny obsahující síru například z česneku, cibule, pórku a pažitky, byla označena za přispívající ke zvýšení objemu sulfanu a má významný vliv na metabolický stav a hypertenzi (Veeranki et Tyagi, 2014).

Hlavním způsobem produkce sulfanu v savčích buňkách je cesta enzymatická. Enzymy využívají síru obsahující aminokyseliny cystein a homocystein jako substrát k produkci sulfanu v jedno- nebo několika krokovém procesu (Veeranki et Tyagi, 2014). Stěžejní čtyři enzymy pro výrobu sulfanu jsou cystathionin- γ -lyáza (CSE), cystathionin- β -syntáza (CBS) a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (3-MST) v kombinaci s cystein aminotransferázou (CAT), které zajišťují tři odlišné cesty pro konverzi L-cysteinu na H₂S (Fukami et Kawabata,

2015). CSE a CAT jsou regulovány ionty Ca^{2+} . Při stabilně nízké intracelulární koncentraci Ca^{2+} produkují sulfan CSE a 3MST. Při zvýšení této koncentrace ve stimulovaných buňkách se produkce sulfanu těmito enzymy snižuje (Kimura, 2014).

Nedávno byla identifikována čtvrtá cesta, kdy je sulfan produkován z D-cysteinu pomocí enzymů D-aminoacidoxidázy (DAO) a 3MST. Hlavním místem tohoto děje je mozeček (cerebellum) a ledviny. Tento způsob je 80 krát účinnější než produkce sulfanu z L-cysteinu v ledvinách a podávání D-cysteinu myším zmírňuje ischemické poškození ledvin účinněji než podávání L-cysteinu. Tyto výsledky ukazují, že D-cystein by mohl být používán k léčbě ledvinových onemocnění nebo dokonce zvýšit úspěšnost transplantací ledvin (Kimura, 2014).

Výroba enzymů k tvorbě H_2S může být specifická vzhledem ke tkáni, jelikož CBS je vysoce exprimován v hipokampu a mozečku v centrální nervové soustavě a CSE je daleko více obsažen v buňkách cév hladkého svalstva a buňkách endoteliálních, v játrech a ledvinách. Nicméně nedávné studie prokázaly CSE také v buňkách mikroglíí, v páteřní míše a granulárních neuronech mozečku (Munaron et al., 2012). Enzymy CBS a CSE jsou prokázány v cytoplasmě, 3MST je lokalizován hlavně v mitochondriích, ačkoli malé množství tohoto enzymu může být také přítomno v cytosolu (Veeranki et Tyagi, 2014).

Vedle endogenní produkce je používán exogenní sulfan při různých experimentech na zvířatech. Protože klasická forma inhalace je stále ztížena toxickými účinky na přítomné osoby, byly vyvinuty sulfidové soli jako hydrogensulfid sodný (NaHS) a sulfid sodný (Na_2S), které fungují jako exogenní sulfanové donory. Tyto sloučeniny jsou široce používané jako rychle uvolňující sulfanové donory v různých experimentálních modelech nemocí (Caliendo et al., 2010; Kashfi et Olson, 2013). Bohužel nabízí krátkodobé uvolňování sulfanu a někdy nedosáhnou cíle, zejména v mitochondriích. Proto byly syntetizovány pomalu uvolňující sulfanové donory jako GYY4137, které nabízejí udržitelnější a déletrvající uvolňování sulfanu než sulfidové soli (Li et al., 2008). Dále byly označeny přírodní zdroje sulfanu jako od česneku odvozené polysulfidy, diallyl disulfid a diallyl sulfid, a jsou momentálně zkoumány při léčbě kardiovaskulárních stavů (Benavides et al., 2007; Ginter et Simko, 2010)

Cystathionin beta syntáza (CBS), hemový protein závislý na pyridoxal-5'-fosfátu, může syntetizovat sulfan z L-cysteinu. Sulfan je vytvářen substitucí thiolové skupiny L-cysteinu s různými thiolovými sloučeninami, aby vytvořil odpovídající thioeter. CBS je lokalizován hlavně v cytosolu (Kamoun, 2005).

Cystathionine γ lyáza (CSE), rovněž protein závislý na pyridoxal-5'-fosfátu, jehož aktivita je regulována nízkými hodnotami intracelulárního vápníku. CSE hydrolyzuje L-cystein za vzniku sulfanu, pyruvátu a amoniových iontů (Dunn et al., 2016).

3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (MST) – aktivitu lze detekovat v mitochondriích (Koj et al., 1975; Ubuka et al., 1977) a cytosolových frakcích v krysích játrech a ledvinách (Nagahara et al., 1998; Ogasawara et al., 1994). MST, enzym závislý na zinku, je lokalizován převážně v epitelu proximálního tubulu ledvin, pericentrálních hepatocytech v játrech, srdečních buňkách v srdci a neuroglálních buňkách v mozku (Nagahara et al., 1998). V mitochondriích může MST vytvářet sulfan z 3-merkaptopyruvátu nebo převádí jeho síru na siřičitan, který potom vytváří thiosulfát (Kamoun, 2005).

1.3.1 Enzymatický způsob produkce sulfanu z L-cysteinu

Prvním způsobem tvorby sulfanu je hydrolýza L-cysteinu cystathioninem- β -syntázou (CBS), tímto způsobem vzniká stejné množství H_2S a L-serinu. Tato reakce je vratná při nízké koncentraci cysteinu nebo během fetálního vývoje.

Druhý způsob: dvě molekuly L-cysteinu podstoupí dimerizaci a vytvoří L-cystein, který je přeměněn na thiocystein, pyruvát a NH_3 pomocí cystathionin- γ -lyázy (CSE). Thiocystein může potom reagovat dvěma způsoby – CSE katalyzuje reakci thiocysteinu s dalším thiolem (R-SH) a vytvoří H_2S , nebo neenzymatickou cestou vytvoří cystein a H_2S .

Třetí způsob: cystein aminotransferáza (CAT) katalyzuje reakci L-cysteinu s ketokyselinou, vytvoří 3-merkaptopyruvát a aminokyselinu. 3-merkaptopyruvát je potom desulfurován 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázou (MPST) a vytvoří H_2S a pyruvát, nebo za přítomnosti siřičitanového aniontu vytvoří thiosulfát a pyruvát. V thiosulfátovém cyklu potom thiosulfát reaguje s redukováným glutathionem za vzniku H_2S , H_2SO_3 a oxidovaného glutathionu. (Li et al., 2009) Tato cesta se odehrává hlavně v mitochondriích (Bełtowski, 2014).

Dalším možným způsobem je přeměna L-cysteinu a siřičitanu za pomoci cystein lyázy na L-cysteát a H_2S . (Li et al., 2009)

Pro CBS, CAT, CSE a cystein lyázu je nutná přítomnost kofaktoru pyridoxal 5'-fosfátu (PPP, vitamin B_6), MPST je oproti nim závislý na přítomnosti zinku. CBS a CSE jsou enzymy vyžadující PPP a jsou zřejmě odpovědné za většinu endogenní produkce sulfanu v savčích tkáních.

L-cystein je široce používán v experimentálních studiích ke zvýšení endogenní produkce sulfanu. Avšak L-cystein není jeho dobrým prekurzorem, protože je metabolizován

mnoha dalšími způsoby, jako je syntéza glutathionu, taurinu nebo oxidací na síran. Několik syntetických cysteinových derivátů jako S-propyl-cystein (SPC), S-allyl-cystein (SAC) a S-propargyl-cystein (SPRC) je dobrými substráty pro CBS a CSE a jsou enzymaticky převáděny na sulfan. Navíc tyto sloučeniny posilují vyjádření CSE doposud neznámým mechanismem (Huang et al., 2013).

Intraperitoneálně podávaný SPC, SAC nebo SPRC chrání krysí srdce před ligací vyvolanou ischemicko-reperfúzním onemocněním koronární arterie jak dokazuje snížená velikost infarktu, snížená úmrtnost a peroxidace lipidů. U SPRC byl také prokázán protirakovinný efekt in vitro i in vivo. Tato sloučenina redukuje růst tumoru u bezsrstých myší s přenesenými lidskými gastrickými rakovinnými buňkami SGC-7901 (Ma et al., 2011). SPRC podávaný po dobu 6 týdnů zlepšil myokardiální kontraktilitu, snížil apoptózu kardiomyocytů a zlepšil aktivitu myokardiálních antioxidačních enzymů u krys se srdečním selháním vyvolaným infarktem myokardu (Huang et al., 2013).

1.3.2 Enzymatický způsob produkce sulfanu z D-cysteinu

Zatímco produkce sulfanu z D-cysteinu je optimální při pH 7,4, z L-cysteinu je to při pH 8,4. Aktivita je lokalizována na surovou mitochondriální frakci, která obsahuje ostatní orgány, např. peroxizómy. Mitochondrie a peroxizómy si vyměňují své metabolity a dokonce i enzymy specifickou formou vezikulárního obchodování a jsou v těsné blízkosti, pokud nejsou ve fyzickém kontaktu (Schumann et Subramani, 2008).

DAO je lokalizován v ledvinách a mozku, kde je obzvláště bohatý mozeček (Shibuya et al., 2013). 3MST je více přítomný než DAO a nachází se také v ledvinách a mozečku. Produkce sulfanu z D-cysteinu dobře koreluje s hladinami DAO a 3MST. Hladiny produkce sulfanu z L-cysteinu jsou mnohem nižší než ty z D-cysteinu.

Produkce sulfanu z D-cysteinu je vyšší v mozečku než v ostatních oblastech mozku. Nicméně produkce sulfanu v ledvinách je 7x vyšší než v mozečku. (Kimura, 2014)

D-cystein je metabolizován DAO (D-amino acid oxidáza) na 3MP, který je substrátem pro 3MST k produkci sulfanu. Tato cesta je funkční pouze v ledvinách a mozku, částečně v mozečku. V ledvinách je produkce sulfanu z D-cysteinu zhruba 80 krát mocnější než z L-cysteinu. Orální podávání D-cysteinu myším chrání ledviny před ischemicko-reperfúzním poškozením. Aplikace D-cysteinu do primárních struktur mozečkových neuronů ochraňuje neurony před oxidativním stresem způsobeným H₂O₂ (Shibuya et al., 2013). Protože D-cystein je méně toxický ve srovnání s L-cystein, poskytuje nové terapeutické postupy, jak přivést sulfan ke specifickým tkáním jak jsou ledviny a mozeček (Kimura, 2013).

Enzymatické reakce související s produkcí sulfanu (Beltowski, 2015)

Substrát	Produkt	Enzym
L-homocystein + L-serin	L-cystathionin + H ₂ O	CBS
L-homocystein + L-cystein	L-cystathionin + H ₂ S	CBS, CSE
L-cystein + L-cystein	L-lanthionin + H ₂ S	CBS, CSE
L-homocystein + L-homocystein	L-homolanthionin + H ₂ S	CBS, CSE
L-cystathionin	L-cystein + α -ketobutyrát + NH ₄ ⁺	CSE
L-cystein	Pyruvát + H ₂ S + NH ₄ ⁺	CSE
L-homocystein	α -ketobutyrát + H ₂ S + NH ₄ ⁺	CSE
L-cystein	L-thiocystein + pyruvát + NH ₄ ⁺	CBS, CSE
L-cystein + glutamát	3-merkaptopyruvát + α -ketoglutarát	CAT
D-cystein	3-merkaptopyruvát + NH ₄ ⁺	DAO
3-merkaptopyruvát	Pyruvát + H ₂ S	3-MST

1.3.3 Neenzymatický způsob produkce sulfanu

Neenzymaticky probíhá výroba sulfanu redukcí thiolů a molekul thioly obsahujících (Li et al., 2009).

Endogenní výroba sulfanu může nastat také neenzymatickými procesy, které probíhají přes glukózu, glutathion, anorganické a organické sulfidy (přítomné v česneku) a elementární síru. Sulfan může být vytvořen z glukózy také glykolýzou. Glukóza reaguje s methioninem, homocysteinem nebo cysteinem za produkce plyných sloučenin síry – metanthiolu a sulfanu. Sulfan je také produkován přímou redukcí glutathionu a elementární síry (Kolluru et al., 2013)

1.4 Mechanismus signální transdukce

Sulfan je silné redukční činidlo, proto je za jeden z jeho efektů považována ochrana proteinových thiolových skupin proti oxidaci. Nicméně všechny studie provedené k dnešnímu dni nasvědčují tomu, že účinky sulfanu aplikovaného ve fyziologických koncentracích nejsou

reprodukovány nebo jsou pouze částečně napodobeny thiol-ochraňujícími činidly, což naznačuje, že to není hlavní mechanismus působení sulfanu (Abe et Kimura, 1996). V mnoha systémech je účinek sulfanu zprostředkován ATP sensitivními draslíkovými kanály K_{ATP} . Tyto závěry jsou většinou založeny na pozorování, že mnohé účinky sulfanu jsou napodobovány K_{ATP} otevírači jako pinacidil nebo diazoxid a jsou rušeny jejich inhibitory. Pouze v několika studiích byl prokázán stimulační účinek sulfanu na K_{ATP} kanály přímo měřením proudu K_{ATP} kanálů (Cheng et al., 2004; Tang et al., 2005). Přímý mechanismus, kterým sulfan stimuluje K_{ATP} kanály, není znám. (Łowicka et Bełtowski, 2007).

Sulfan je vysoce reaktivní molekula a může snadno reagovat s dalšími sloučeninami, zejména s reaktivními formami kyslíku a dusíku (ROS, RNS). Bylo prokázáno, že sulfan reaguje s nejméně čtyřmi různými ROS - radikálový superoxidový aniont (Mitsubishi et al., 2005), peroxid vodíku (Geng et al., 2004), peroxyinitrit (Whiteman et al., 2004) a chlornanový aniont (Whiteman et al., 2005). Všechny z nich jsou fyziologicky relevantní ROS nebo RNS. Superoxidový aniont (O_2^-) je produkován NADPH oxidázou přítomnou ve fagocytech, jakož i příbuznými nefagocytárními NADPH oxidázami přítomnými v mnoha typech buněk, zejména v kardiovaskulárním systému a v ledvinách. Peroxid vodíku je produkován ze superoxidového aniontu v reakci katalyzovanou superoxid dismutázou. Peroxyinitrit ($ONOO^-$) je produkt spontánní reakce mezi superoxidem a oxidem dusnatým, kdežto chlornanový aniont (ClO^-) je produkován z peroxidu vodíku neutrofilní myeloperoxidázou (MPO). Všechny tyto sloučeniny jsou vysoce reaktivní a jejich interakce se sulfanem vyúsťuje v ochranu proteinů a lipidů před škodou způsobenou ROS/RNS (Whiteman et al., 2005; Whiteman et al., 2006). Význam reakce sulfanu s O_2^- je dvojznačný, protože produkt, sulfid, může mít jak toxické (Collin et Thiernemann, 2005), tak antioxidační (Mitsubishi et al., 2001) vlastnosti, které jsou s největší pravděpodobností závislé na jeho koncentraci. Sulfan rovněž reaguje s NO za vzniku nitrosothiolové sloučeniny s dosud nedefinovanou chemickou strukturou (Whiteman et al., 2006). Zajímavé je, že na rozdíl od dalších nitrosothiolů (R-S-NO), které jsou považovány za rezervoár oxidu dusnatého a často napodobují jeho aktivitu, nitrosothiol pocházející ze sulfanu a oxidu dusnatého je neaktivní. Bylo naznačeno, že sulfan může vyhledávat přebytky oxidu dusnatého vyprodukovaného v zánětlivém stavu (Whiteman et al., 2006), ale může taktéž omezovat dostupnost NO kontinuálně produkovaného ve fyziologických koncentracích (Ali et al., 2006). Dalším mechanismem, kdy sulfan může působit antioxidačně, zahrnuje stimulaci transportu cysteinu k buňkám a zvýšení syntézy glutathionu (Kimura et Kimura, 2004).

Biologické efekty sulfanu vyplývají z jeho interakce se třemi cílovými skupinami – thioley, reaktivními kyslíkovými a dusíkovými druhy stejně jako s oxidačními produkty makromolekul a s kovy a metaloproteiny (Bełtowski, 2014).

1.4.1 Interakce s thioley – proteinová S-sulfhydratace

Sulfhydratace (sulfurace) byla navržena jako režim akce sulfanu, kdy je síra přidána na thiol cysteinového zbytku cílového proteinu a způsobuje strukturální změny a modifikuje jejich aktivitu (Mustafa et al., 2009). Je také definována jako produkce vázané sulfanové síry, která se skládá z cysteinových persulfidů a polysulfidů v proteinech.

Je obecně uznáváno, že hlavní molekulární mechanismus signalizace sulfanu je S-sulfhydratace (nebo sulfurace) zbytků proteinu cysteinu; to je konverze skupin thiolových (-SH) na persulfidové (-SSH).

Proteinová S-sulfhydratace a její funkční důsledky (Bełtowski, 2014):

Protein	Efekt na aktivitu	Důsledky
K _{ATP} kanály (ATP-senzitivní draslíkové kanály)	↑	Vazorelaxace
SK _{Ca} (málo vodivé vápníkem aktivované K ⁺ kanály), IK _{Ca} (středně vodivé vápníkem aktivované K ⁺ kanály)	↑	Ochrana myokardu od ischemie/reperfuze; hyperpolarizace endoteliálních buněk, vazorelaxace
Na napětí citlivé K ⁺ kanály	↓	Kontrakce žaludečních hladkosvalových buněk
VEGFR1 (receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru 1)	↑	angiogeneze
Parkin	↑	Neuroprotektce
GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza)	↑	?
Aktin	↑	↑chodu polymerizace
NF-κB	↑	↓apoptózy
Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)	↓	Aktivace Nrf2 (NFE2 příbuzný faktor 2)
eNOS (endoteliální NO syntáza)	↑	↑produkce NO, vazorelaxace

PKG (protein kináza G)	↑	Vazorelaxace
PTB1B (protein tyrosin fosfatáza 1B)	↓	↑aktivity PERK (kináze podobný protein kinázy endoplazmatického retikula), ↓ napětí endoplazmatického retikula
PTEN (fosfatáza a tensin homolog)	↓	?
Fosfolamban	↓	Deaktivace SERCA (Ca ²⁺ -ATP-áza hladkého endoplazmatického retikula), snížení myokardické relaxace
MEK1 (mitogenem aktivovaný protein kináza 1)	↑	Aktivace PARP-1 (poly (ADP-ribóza) polymeráza 1), zdokonalená oprava DNA

Zprvu bylo navrhováno, že S-sulhydratace vždy končí zvýšením proteinové aktivity, avšak byly také prokázány účinky inhibiční. Sulfan nemůže proteiny přímo sulhydratovat; tato reakce se stává možnou po předchozí oxidaci thiolové skupiny nebo sulfanu samotného. Oxidace protein-thiolů na disulfidy nebo sulfenovou kyselinu (-SOH) je běžným signálním mechanismem reaktivních kyslíkových skupin jako je peroxid vodíku. Protein cysteinsulfenát se stává dobrým substrátem pro sulfanem zprostředkovanou sulhydrataci. Alternativně je sulfan snadno v biologických systémech oxidován na polysulfidy (HS_nH) obsahující 2 až 8 atomů síry, které mohou pak sulhydratovat intaktní protein thiolové skupiny. Polysulfidy jsou také spontánně tvořeny v roztoku obsahujícím hydrosulfid sodný, běžně užívaný jako sulfanový donor, a je nyní stále více uznáváno, že polysulfidy jsou spíše než sulfan samotný důležité signální molekuly (Bełtowski, 2014).

1.4.2 Reakce s NO a příbuznými druhy a organickými elektrofilny

Ačkoli je sulfan redukčním činidlem a bylo prokázáno, že ochraňuje buňky před různými reaktivními kyslíkovými skupinami, přímé odstranění ROS nehraje důležitou roli v signalizaci sulfanu, protože jeho koncentrace je mnohem nižší než ostatních antioxidantů, třeba glutathionu. Nicméně nedávné studie naznačily, že sulfan může reagovat s NO a souvisejícími druhy (Bełtowski, 2014).

Nitrosothioly (R – S – NO) vznikají jako výsledek reakce mezi NO a cysteinovými thiolovými skupinami. Proteinová S – nitrosylace je důležitým signálním mechanismem NO, navíc nitrosothioly jsou zdrojem NO, ze kterých může být uvolňován (Bełtowski, 2014).

Při přebytku sulfanu s ním může HSNO reagovat za vzniku H₂S₂ a HNO, redukované formy NO (Yong et al., 2010). HNO byl dlouhý čas považován za endogenní produkt, ačkoli to nebylo definitivně prokázáno. Má velmi zajímavé farmakologické vlastnosti. Podobně jako NO vyvolává vazorelaxaci. Nicméně na rozdíl od NO je odolný vůči degradaci ROS a nevyvolává toleranci při prodlouženém podávání. Navíc HNO na rozdíl od NO zvyšuje myokardiální kontraktilitu (Sivakumaran et al., 2013). Kombinace vazodilatace, pozitivního a lusitropního účinku dělá donory HNO vynikajícími léky pro léčbu srdečního selhání (Eberhardt et al., 2014).

1.4.3 Interakce s hemoproteiny

Sulfan snadno reaguje s přechodnými kovy; v biologických systémech jsou nejvýznamnějším cílem hemoproteiny. Vazba sulfanu na cytochrom c oxidázu je hlavním mechanismem jeho toxicity. Navíc se sulfan váže na hemoglobin a myoglobin za tvorby sulfhemoglobinu a sulfmyoglobinu (Pietri et al., 2011). Ačkoli reakce mezi sulfanem a hemoproteiny je považována hlavně za molekulární základ jeho toxicity, může být také zapojena do některých fyziologických /ochranných účinků (Bełtowski, 2014).

Vystavení myši nízkým koncentracím sulfanu v okolním vzduchu vyvolalo hibernaci podobný stav charakterizovaný hypometabolismem, sníženou tělesnou teplotou, spotřebou kyslíku a sníženou tepovou frekvencí (Blackstone et al., 2005). Tento efekt je výsledkem inhibice termogeneze. V důsledku toho ochraňuje zvířata vystavená sulfanu před škodlivými následky následné hypoxie (Blackstone et Roth, 2007). Ačkoli se tato zjištění zdají být specifická pro malá zvířata, inhibice cytochrom c oxidázy může přispívat k ochranným účinkům sulfanu u dalších modelů například při renálním ischemicko-reperfúzním poranění (Bos et al., 2009). Přechodný pokles produkce ATP může přispět k aktivaci ATP-senzitivních draslíkových kanálů a sulfanem vyvolané vazorelaxaci (Collman et al., 2009).

Nedávno bylo prokázáno, že sulfan inhibuje myeloperoxidázu (MPO) v koncentracích tak nízkých jako 1 μM. MPO – enzym polymorfonukleárních leukocytů – katalyzuje reakci peroxidu vodíku s chloridovým aniontem za vzniku HOCl, který hraje zásadní roli při odpovědi na zánět. Navíc dlouhotrvající přebytek MPO nízké kvality je spojen s kardiovaskulárními a dalšími onemocněními souvisejícími s oxidačním stresem. Kromě

inhibice katalytické přeměny MPO může být sulfan oxidován tímto enzymem na polysulfidy, důležité signální molekuly odvozené od sulfanu (Pálinkás et al., 2014).

1.5 Metabolismus sulfanu

Sulfan byl po desetiletí znám jako jeden z nejdůležitějších jedů v lidské toxikologii. Hlavní mechanismus jeho toxicity je inhibice mitochondriálního dýchacího řetězce navázáním se na cytochrom c oxidázu. Sulfan je vlastně druhým nejsilnějším inhibítorem tohoto enzymu po kyanidu (Cooper et Brown 2008). Avšak jedním z nejpřekvapivějších zjištění nedávných let bylo, že sulfan může být v mitochondriích taktéž enzymaticky metabolizován. Sulfan je první a dosud i jediný známý anorganický substrát pro mitochondriální dýchací řetězec, který může poskytovat energii pro výrobu ATP (Bełtowski, 2014).

Předpokládá se, že mitochondrie eukaryotických buněk vznikly ze starověkých sulfan oxidujících bakterií žijících v prostředí bohatém na sulfidy. Schopnost oxidovat sulfidy je vlastně společná také nyní pro mnohé mikroorganismy a bezobratlé. Obecně je nepravděpodobné, že sulfan je co do množství významný energetický substrát pro savčí buňky. Výjimkou můžou být epitelální buňky tlustého střeva, kde je velké množství sulfanu produkováno anaerobními bakteriemi; je odhadováno, že množství sulfanu může být dominantním energetickým substrátem pro kolonocyty (Blachier et al., 2010). Tento mikrobioticky odvozený sulfan je produkován bez energetických výdajů pro hostitele a nevyžaduje žádný transportní mechanismus nebo biochemickou přípravu před oxidací. Mitochondriální oxidace sulfanu hraje důležitou roli při detoxikaci sulfanu; je to opětovně zvláště nezbytné pro kolonocyty vystavené vysoké koncentraci sulfidu (Bełtowski, 2014). Mělo by být ovšem zdůrazněno, že mitochondrie mohou oxidovat sulfan pouze v nízkých koncentracích (obecně méně než 10 μM). Vyšší koncentrace sulfanu inhibují cytochrom c oxidázu podobně jako další gasotransmitery CO a NO a stejně jako kyanid. Přidání sulfanu v nízké koncentraci do izolované mitochondrie zvyšuje spotřebu kyslíku a syntézu ATP, zatímco vyšší koncentrace sulfanu má opačný efekt (Bełtowski, 2014).

Hlavní faktor, který řídí míru oxidace sulfanu, je koncentrace kyslíku. Je naznačeno, že sulfan zprostředkovává mnoho fyziologických efektů hypoxie jako je vazodilatace tepen a vazokonstrikce žil. Efekty hypoxie na vaskulární tonus jsou často napodobeny sulfanovými donory a rušeny inhibitory sulfanové syntézy. Sulfan se může podílet na vnímání kyslíku v cévách, arteriálních chemoreceptorech a centrálních dýchacích neuronech. Sulfan může hrát důležitou roli jako senzor kyslíku v těchto tkáních, protože inhibuje transport Na^+ . Tedy

hypoxií vyvolaný vzestup sulfanu inhibuje resorpci Na^+ v závislosti na spotřebě kyslíku a obnovuje rovnováhu kyslíku (Bełtowski, 2010).

Je velmi dobře známo, že mírná přechodná hypoxie zvyšuje odolnost mnoha tkání k následným závažnějším ischemickým příhodám; tento jev se uvádí jako „ischemická stabilizace“. Sulfan uplatňuje ochranné účinky proti ischemicko-reperfúznímu poškození podobné ischemické stabilizaci a může dokonce zprostředkovávat stabilizační jev v myokardu, ledvinách a játrech (Bos et al., 2014).

Přidání sulfanu k izolované mitochondrii nebo buňkám zvyšuje transport elektronů a syntézu ATP nejenom přímým vstupem do oxidačního procesu. Kromě toho sulfan stimuluje mitochondriální oxidaci organických substrátů při způsobu závislém na cAMP. Sulfan vlastně zvyšuje intramitochondriální koncentraci cAMP deaktivací fosfodiesterázy (Módis et al., 2013b). Výrazná intramitochondriální produkce sulfanu cestou CAT/3-MST naznačuje důležitou roli tohoto gasotransmiteru v této organelle (Módis et al., 2013a).

2 Sulfan v orgánových soustavách

2.1 Kardiovaskulární soustava

Zatímco CBS je hlavním enzymem generujícím sulfan v mozku, sulfan v kardiovaskulárním systému je produkován hlavně CSE. Imunohistochemické studie a reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce odhalily, že CSE je vyjádřen ve vaskulárním hladkém svalstvu, ale ne v endoteliálních buňkách (Zhao et al., 2001).

Hosoki et al. (1997) provedli první důkaz, že sulfan by mohl být endogenně vytvářen cévní tkání. Dokázali, že na rozdíl od mozku je to CSE, který je vyjádřen v portální žíle a krysí aortě, a homogenáty těchto preparátů by mohly vyrábět sulfan z L-cysteinu. Kromě toho exogenní sulfanový donor, NaHS, způsobil uvolnění v obou cévních preparátech; účinek byl zvýšený v krysí aortě, když byl používán současně s donorem NO, což naznačuje synergickou interakci mezi sulfanem a NO (Dunn et al., 2015).

Sulfan dilatuje cévy aktivací K_{ATP} kanálů. Příklady cév relaxovaných sulfanem in vitro (buď jako plyn ve vodě nebo za použití NaHS jako donoru) zahrnují izolovanou krysí aortu a portální žílu (Zhao et al., 2001; Hosoki et al., 1997; Ali et al., 2006), králičí topořivé těleso (Srilatha et al., 2007) a cévy krysí mezenterické (Cheng et al., 2004) a jaterní (Fiorucci et al., 2005b), ovšem ne koronární (Johansen et al., 2006). V těle živočichů intravenózní injekce

NaHS vyvolává krátký, ale na dávce závislý pokles krevního tlaku (Zhao et al., 2001; Ali et al., 2006).

2.1.1 Výskyt CBS

Donovan et al. (2017) ve své studii provedli experiment v segmentech koronární artérie s odstraněným endotelem, aby prostudovali, které buňky (endoteliální nebo hladkosvalové) jsou zapojeny do hypoxické produkce sulfanu závislé na CBS. Odstranění endotelu nemělo žádný efekt na hypoxickou relaxační odpověď. Tyto údaje ukazují, že CBS v hladkém svalstvu je nejdůležitější přispěvatel sulfanu k hypoxické relaxaci prasečí koronární artérie. Jejich na protilátkách založené studie na kultivovaných buňkách potvrdily expresi CBS v hladké svalovině prasečí koronární artérie a rovněž pozorovali expresi CBS v kultivovaných buňkách hladké svaloviny lidské koronární artérie stejnou metodou. Jejich data ukazují nejprve expresi CBS v koronární vaskulatuře a následně roli CBS vaskulárního hladkého svalstva v odpovědi koronární artérie na hypoxii. Naproti tomu hypoxická kontrakce byla velmi ztlumena vyjmutím endotelu, kdy zůstaly pouze malé zbytkové kontrakce v oblastech s obnaženým endotelem. Tím pádem, s ohledem na hypoxickou kontrakci, je odpověď závislá na endotelu (vyžaduje NO) a vyžaduje na CBS závislou produkci sulfanu endoteliem a/nebo hladkým svalstvem.

2.1.2 Sulfan jako senzor kyslíku

V souladu s rolí sulfanu jako mediátora hypoxické odpovědi, objevili Donovan et al. (2017), že exogenní sulfan (Na_2S a NaHS) vytváří odpověď, která napodobuje odpověď na hypoxii. Odpověď na hypoxii byla dvoufázová, skládající se z přechodné kontrakce následované uvolněním, odrážející změny v lokální koncentraci endogenních metabolitů a jejich působení vzhledem ke změnám v jejich vzniku/hromadění s hypoxií v průběhu času. Soli sulfanu, Na_2S a NaHS, podobně vyvolávají dvoufázovou odpověď; cévní kontrakce v nízkých koncentracích následována relaxací při vysokých koncentracích. Bylo označeno množství vazoaktivních mediátorů, které jsou zapojeny při hypoxické odpovědi. Nicméně pouze sulfan vytváří vazomotorickou odpověď, která přesně odpovídá dvoufázovému profilu hypoxické odpovědi. Adenosin například vytváří pouze vazodilataci koronární artérie; další mediátory (např. purinové nukleotidy) mohou vyvolat dvoufázovou odpověď, ale typicky vytváří vazodilataci v nízkých koncentracích a vazokonstrikci při vysokých koncentracích.

Snížení metabolismu sulfanu zvýší jeho dostupnost, což mu dovoluje vytvářet jeho kardioprotektivní účinky. Navíc ke ztrátě metabolismu sulfanu bylo navrženo, že aktivity

CBS a CSE jsou změněné v závislosti na redoxním prostředí (Banerjee et Zou, 2005; Stipanuk, 2004), což naznačuje, že jejich aktivita může být rovněž řízena dostupností kyslíku. Časový průběh studie Donovan et al. (2017), vystavení účinkům hypoxie po dobu 30 minut, nebyl dostatečně dlouhý k vyvolání změn v hladinách exprese sulfan produkujících enzymů (Wang et al., 2014), ale aktivita existujících endogenních enzymů může být v tomto časovém rámci změněna.

2.1.3 Aorta

V roce 2001 Zhao a kolegové prokázali, že sulfan zvyšuje průtoky K_{ATP} kanály v disociovaných hladkosvalových aortických buňkách. Následná zpráva ukázala, že sulfan by mohl být vyráběn z L-cysteinu v krysí aortě a že endogenní sulfan podporoval vazorelaxaci inhibicí fosfodiesterázových enzymů (PDE), čímž umocňuje činnost NO (Bucci et al., 2010). Podobně Colleta et al. (2012) podali zprávu, že sulfan a oxid dusnatý kooperují při vyvolávání vazorelaxace krysí aorty. Ali et al. (2006) prokázali, že při nízkých koncentracích ($< 400\mu\text{M}$) sulfanový donor NaHS způsobuje v krysí aortě kontrakce, vazorelaxace je patrná pouze při vyšších koncentracích. Nízké hodnoty NaHS také ruší oxidem dusnatým zprostředkovanou vazorelaxaci vytvořenou acetylcholinem (ACh). Od té doby, co bylo prokontraktálním účinkům sulfanu zabráněno odstraněním endotelu, je naznačeno, že sulfan působí tak, že odstraní základní vazorelaxační účinek oxidu dusnatého a vytváří kontrakce (Dunn et al., 2015).

V další fyziologické studii Koenitzer et al. (2007) prokázali, že účinek sulfanu je závislý na převládajícím napětí O_2 . V krysí aortě vystavené vysokým hodnotám O_2 nízké koncentrace sulfanu způsobily kontrakce, které byly přeměněny na uvolnění, když byly hodnoty O_2 sníženy na fyziologickou úroveň. Zajímavé je, že při fyziologických hodnotách O_2 byl sulfan mnohem silnější vazorelaxant. Kiss et al (2008) také prokázali lepší vazorelaxační odpověď na sulfan při nízkém obsahu O_2 (Dunn et al., 2015).

2.1.4 Mezenterické tepny

V krysí cévní soustavě Cheng et al. (2004) prokázali, že NaHS a endogenní H_2S způsobují vazodilataci. Odstranění endotelia saponinem snížilo odpověď na sulfan. Tito autoři také prokázali, že L-cystein způsobuje vazodilataci, která byla zmírněna inhibicí CSE, a později popsali, že L-cystein by mohl také regulovat průtoky K_{ATP} , což ukazuje na roli endogenního sulfanu (Cheng et al., 2004; Tang et al., 2005).

2.1.5 Mozkové tepny

V mozkových vlasečnicích novorozeneých prasat sulfan vyvolává vazodilataci aktivací K_{ATP} kanálů, stejně tak L-cystein vyvolává vazodilataci zprostředkovanou CSE (Cheang et al., 2010). Han et al. (2013) prokázali, že sulfan způsobuje hyperpolarizaci mozkových tepen izolovaných z krys a s tím spojenou vazorelaxaci (Dunn et al., 2015). V krysích středních mozkových artériích NaHS také způsobuje vazodilataci, ale zdá se, že mechanismus zahrnuje inhibici toku vápníku přes vápníkové kanály, spíše než by zahrnovala draslíkové kanály (Tian et al., 2012). Streeter et al. (2012) prokázali, že L-cystein způsobuje vazorelaxaci a že CSE byl přítomný v endotelu a hladkosvalových buňkách střední mozkové artérie.

2.1.6 Srdce jako model ischemie

Myokardiální ischemie je jedním z hlavních modelů používaných ke studiu ochranných účinků sulfanu. Intravenózní podání Na_2S 24 hodin před kardiální ischemií tlumí velikost infarktu, hodnoty sérového troponinu, lipidu hydroperoxidu a apoptózu, zatímco upravuje kardiální funkci (Calvert et al., 2009). Injekce Na_2S do levé ventrikulární dutiny při reperfuzi tlumí velikost myokardiálního infarktu, hodnoty troponinu, zánět, apoptózu a ztrátu srdeční funkce. Na_2S zachovává mitochondriální spotřebu kyslíku a integritu po myokardiální ischemii (Elrod et al., 2007). Na_2S zlepšil myokardiální funkci po srdeční zástavě a kardiopulmonální resuscitaci (Minamishima et al., 2009). Na_2S rovněž vyvolává výrazné zlepšení v obnově myokardiální a epiteliální funkce na psím modelu kardiopulmonálního bypassu s hypotermickou zástavou srdce (Szabó et al., 2011) a má antiapoptické účinky na prasečím modelu při kardiopulmonálním bypassu (Osipov et al., 2010). Bos et al. (2015) udávají, že z jejich vlastních experimentů zjistili kardioprotektivní účinky plynného sulfanu v hypometabolických stejně jako nehypometabolických koncentracích. Sub-hypometabolické koncentrace sulfanu před ischemií chrání srdce před ischemií vyvolanou fibrózou a zánětem, zatímco hypometabolismus nabízí dodatečnou ochranu před krátkodobou myokardiální nekrotou (Snijder et al., 2013). Nový orální sulfanový donor (SG-1002) prokázal slibné účinky na modelu příčného zúžení aorty, kdy snižuje parametry srdečního selhání a oxidativního stresu (Kondo et al., 2013).

2.2 Nervová soustava

V roce 1996 Abe a Kimura poprvé prokázali vysoký výskyt CBS v krysím hipokampu a mozečku a produkci sulfanu mozkovými homogenáty *in vitro* (Abe et Kimura, 1996). Sulfan,

produkovaný astrocyty, neurony a mikroglie, je esenciálním fyziologickým produktem mozku a působí jako endogenní protizánětlivý a neuroprotektivní činitel v centrální nervové soustavě (Deng et al., 2014). Sulfan je v mozku syntetizován primárně enzymem CBS (Lee et al., 2009). Jako převládající zdroj sulfanu v mozkové tkáni může CBS hrát výraznou roli v cerebrovaskulární patofyziologii (Grobely et al., 2011).

Vzhledem k tomu, že sulfan je toxický plyn, je představa o jeho neuroprotektivě paradoxní. Kimura et al. (2013) objevili, že sulfan chrání neurony od oxidativního stresu a ischemicko-reperfučního poranění. Toto zjištění vedlo k obeznámení s kardio- a renálněprotektivními vlastnostmi této molekuly (Elrod et al., 2007; Tripatara et al., 2008).

Sulfan také chrání neurony regulací zatížení endoplazmatického retikula a stabilizací membránového potenciálu aktivací K_{ATP} (Krishnan et al., 2011; Kimura et al., 2006).

2.2.1 Mozek jako model ischemie

Při uzavření střední mozkové artérie u krys plynný sulfan podávaný po dva dny po reperfuzi zlepšuje neurologický výsledek a snižuje velikost infarktu a zánětu (Florian et al., 2008). Injekce NaSH zvýšila výkon při úniku z bludiště a snížila poškození v oblasti hypokampu po bilaterální společné uzávěře karotid (Li et al., 2011). Ovšem ne všechny modely mrtvice ukazují jednoznačné ochranné účinky sulfanu. Při globální mozkové ischemii u krys nízké dávky NaSH ochraňují neurony, zatímco vysoké dávky zhoršují neuronální poškození (Ren et al., 2010). Další studie ukázala, že velikost infarktu se zvýšila u zvířat léčených NaSH. Oba inhibitory CBS a CSE snížily kortikální produkci sulfanu a všechny inhibitory snížily velikost infarktu 24 hodin po ischemii (Qu et al., 2006). Tato odlišná pozorování se mohou objevit, protože v nízkých koncentracích se sulfan chová jako vazokonstriktor inhibicí produkce a dostupnosti NO (Liu et al., 2011). Na myším modelu srdeční zástavy a kardiopulmonální resuscitace Na_2S zvyšuje přežití, neurologické funkce a neuronální přežití. Myši nadměrně exprimující CSE v kardiomyocytech měly zvýšené hodnoty přežití a neurologické výsledky po srdeční zástavě/KPR (Minamishima et al., 2009). V další studii byl krátkodobý neurologický výsledek lepší v sulfidové skupině, ale byl podobný jeden týden po srdeční zástavě/KPR. Zde nebyla apoptóza a neuronální smrt Na_2S dotčena (Knapp et al., 2011).

2.3 Pohybová soustava

Lidské kosterní svalstvo vylučuje významné množství CBS a CSE. Nedávné zprávy ukázaly, že všechny tři enzymy (CBS, CSE, 3MST) byly přítomny v detekovatelných

hodnotách v kryším kosterním svalstvu (Du et al., 2013). Nicméně jejich hodnota je velmi nízká v porovnání s těmi vylučovanými játry a ledvinami. Pouze lidské kosterní svaly vylučují CBS a CSE v množství srovnatelném s hodnotami v játrech v relativním množství. S ohledem na kosterní svalstvo jako dominantní orgán, důsledky takových rozdílných hodnot CBS a CSE u cysteinového a homocysteinového metabolismu a signalizací sulfanu nejsou v současné době známy. Hladiny 3MST nebyly dosud v hlodavčích kosterních svalech stanoveny. Výsledky naznačují, že myší kosterní svalstvo vylučuje nedetekovatelné množství tohoto enzymu. Studie ovčích a hovězích tkání také ukazují, že kosterní svalstvo vylučuje menší množství 3MST ve srovnání s ostatními tkáněmi. (Aminlari et al., 1989).

Studie naznačují, že s věkem narůstá množství homocysteinu (Hcy) v plazmě (prekurzor sulfanu), což je korelováno se zvýšeným rizikem poklesu fyzických funkcí. Není však známo, zda takový pokles fyzických funkcí je způsoben rovněž změnami hladiny sulfanu (Kado et al., 2002; Veeranki et Tyagi, 2013).

2.3.1 Sulfan v produkci a funkci mitochondriální energie

Pro mnohé prokaryoty a eukaryoty může sulfan sloužit jako zdroj ATP syntézy (Lloyd, 2006). Proto byla studována jeho role v produkci mitochondriální energie a jeho vliv na různé mitochondriální enzymy. Byly zjištěny další ochranné účinky sulfanu na mitochondriální integritu a funkci. Mimoto bylo naznačeno, že sulfan ochraňuje koncové orgány proti nízkému zásobení kyslíkem a živinami a bylo zjištěno, že jeho doplňování chemickými donory nebo enzymatickou produkcí chrání před ischemickými zraněními v mnohých orgánech včetně kosterního svalstva. Ve velmi vysokých koncentracích sulfan utlumuje cytochrom oxidázu a metabolismus vedoucí k hypotermii a konzervaci tkání. Tyto zvláštní schopnosti sulfanu by mohly poskytovat ochranu proti prostředí s nízkým obsahem kyslíku a živin a mohly by také generovat dost ATP pro přečkání dočasných nepříznivých podmínek (Leschelle et al., 2005).

2.4 Endokrinní soustava

V poslední době bylo prokázáno, že vysoký obsah glukózy, který je sám o sobě stimulem pro β buňky, zvyšuje produkci CSE a vznik sulfanu v β buňkách normoglykemických zvířat. Exogenní sulfan potlačuje vysokými hodnotami glukózy vyvolanou apoptózu β buněk, tudíž glukózou vyvolaná zvýšená produkce endogenního sulfanu může být považována za ochranný mechanismus, který chrání β buňky před glukotoxicitou a zmírňuje apoptickou smrt pankreatických β buněk způsobenou vysokým

obsahem glukózy (Kaneko et al., 2009). Vzhledem k blízké korelaci mezi diabetem a jeho kardiovaskulárními komplikacemi a klíčovým regulačním rolím sulfanu na kardiovaskulární úrovni tato zjištění naznačují, že nedostatek sulfanu může být relevantním patogenickým krokem v progresi s diabetem souvisejícími kardiovaskulárními nemocemi (Martelli et al., 2012).

Slinivka břišní obsahuje relativně velké množství CSE i CBS (Yusuf et al., 2005). Místní (pankreatický) vznik sulfanu může pomáhat regulovat uvolňování inzulínu za fyziologických podmínek a abnormálně vysoká produkce sulfanu hraje roli v deficitním uvolňování inzulínu při cukrovce. Protože koncentrace L-cysteinu v plazmě stejně jako exprese CBS a CSE v různých tkáních je zvýšená u pacientů s diabetem (Jacobs et al., 1998), nadprodukce sulfanu se může podílet na zhoršení sekrece inzulínu. Exprese CBS ve slinivce byla také vyšší u zvířat s diabetem a všechny tyto abnormality byly upraveny inzulínovou terapií (Yusuf et al., 2009).

Velká část práce je zaměřena na dobře známou roli K_{ATP} kanálů v kontrolování funkce pankreatických β buněk vylučujících inzulín, kde jsou K_{ATP} kanály hojně zastoupeny a hrají důležitou roli v regulaci inzulínové sekrece. Zvýšená koncentrace glukózy vede k akumulaci ATP v buňkách, blokadě K_{ATP} kanálů, depolarizaci plazmatické membrány, přítoku Ca^{2+} a sekreci inzulínu. Exogenní sulfan inhibuje glukózou vyvolanou sekreci inzulínu, která je spojená se zvýšenou pravděpodobností otevření K_{ATP} kanálů. Oproti tomu snížení endogenního sulfanu má opačný účinek. Tato data nasvědčují tomu, že endogenní sulfan inhibuje sekreci inzulínu. Navíc glukóza redukuje produkci sulfanu ostrůvky, což nasvědčuje, že snížení sulfanu může přispět ke glukózou vyvolané sekreci inzulínu (Yang et al., 2005). Podobné výsledky byly prokázány za použití izolovaných myších pankreatických ostrůvků (Kaneko et al., 2006). Mohlo by se tak zdát, že exogenně i endogenně produkováný sulfan inhibuje sekreci inzulínu.

Další endokrinní účinky sulfanu byly také prokázány. Sulfan v závislosti na koncentraci snižuje K^+ evokované uvolňování kortikotropin releasing hormonu v krysím hypotalamu a tento účinek může být důležitý při regulaci odezvy hypotalamo-hypofýzární osy na stres (Dello Russo et al., 2000).

2.5 Vylučovací soustava

Sulfan reguluje exkreční funkci ledvin pravděpodobně inhibičním účinkem sodíkových přenašečů na buňkách renálních tubulů. Rovněž také ovlivňuje uvolnění reninu

z juxtaglomerulárních buněk a tím reguluje krevní tlak. Možná role sulfanu jako senzoru kyslíku byla také projednávána, zvláště v ledvinové dřeni.

Nedávno bylo zaznamenáno, že CBS je primárně lokalizován v proximálním vinutém tubulu vnější kůry, kdežto CSE se nachází nejvýznačněji v proximálním rovném tubulu ve vnitřní kůře stejně jako ve vnější dřeni (Ishii et al., 2004; Li et al., 2006). Jedno z možných vysvětlení tohoto rozdílného umístění CSE a CBS je, že CSE je potřeba ke katabolizmu cysteinu, který vzniká z glutathionu syntézy v proximálním rovném tubulu nefronu (House et al., 1997). V dalším zkoumání provedeným Ishii et al. se ukazuje, že vyjádření CSE je vysoké v proximálním rovném tubulu při myším vývoji a poté poklesne na 50% svého vrcholného vyjádření, což naznačuje možnou roli CSE při napomáhání vývoje nefronu (Ishii et al., 2004).

Sulfan hraje důležitou roli v ledvinové homeostáze. Ukázalo se, že substrát L-cystein vpravený do ledvinových arterií krys zvyšuje míru glomerulární filtrace a močové vyměšování sodíku (Na^+) a draslíku (K^+). Simultánní přilití inhibitorů CBS a CSE způsobilo zastavení těchto účinků, což naznačuje, že jsou způsobeny endogenní produkcí sulfanu. Arteriální infuze NaHS vede ke zvýšení renálního průtoku krve a močového vyměšování iontu sodíku a draslíku. (Koning et al., 2015).

Močový měchýř vytváří detekovatelné množství sulfanu a sulfan syntetizuje CBS; CSE a 3-MST jsou odlišně identifikovány ve tkáni močových cest (Fusco et al., 2012; Gai et al., 2013). V prasečím intravezikálním močovodu je důsledně detekována pouze imunoreaktivita CSE v nervových vláknech v hladkosvalové vrstvě (Fernandes et al., 2014). CBS, CSE a 3-MST jsou prezentovány v lidské a krysí hladké svalovině močového měchýře (Gai et al., 2013).

V hrdle močového měchýře způsobuje sulfan nebo sulfanový donor GYY4137 relaxaci hladké svaloviny (Fernandes et al., 2013a; Fernandes et al., 2013b). V prasečím hrdle sulfanem je vyvolaná relaxace vytvářena prostřednictvím aktivace hladkosvalových K_{ATP} kanálů (Fernandes et al., 2013a; Martínez-Sáenz et al., 2011). Tato a další zjištění ukazují, že společně s NO může být sulfan zapojen do mechanismu regulace hladkosvalového napětí výstupu měchýře snížením krčku močového měchýře a proximální uretrální rezistencí aktivací membrán K_{ATP} kanálů (Fernandes et al., 2016).

Sulfan byl rovněž postaven do role senzoru O_2 v ledvinách, zejména za hypoxických podmínek. Oxidace sulfanu v mitochondriích je závislá na O_2 . Vzhledem k tomu, že dostupnost O_2 v ledvinách je nižší v dřeni než v oblasti kůry, očekává se vyšší aktivita sulfanu v dřeni. Při ledvinové hypoxii se může sulfan akumulovat a pomáhat při obnovení rovnováhy

O₂ zvýšením průtoku krve v dřeni, snížením energie potřebné pro tubulární transport a blokováním mitochondriálního dýchání (Koning et al., 2015). Také za hypoxických podmínek mohou CBS a CSE přecházet do mitochondrií, kde stimulují mitochondriální produkci sulfanu (Teng et al., 2013; Fu et al., 2012). Sulfan může sloužit jako donor elektronů v mitochondriálním elektronovém transportním řetězci a tím zvýšit tvorbu ATP (Fu et al., 2012). Interakce mezi sulfanem a O₂ byly směrodatné pro eukaryotickou evoluci. O₂ řídí inaktivaci sulfanu a aktivace sulfanu převážně nastává za hypoxických podmínek (Olson, 2015).

2.5.1 Ledviny jako model ischemie

NaSH při renálním ischemicko-reperfuzním onemocnění zlepšuje mikrovaskulární tok, tlumí nekrózu, apoptózu a zánět (Xu et al., 2009; Zhu et al., 2012). V další studii způsobila bilaterální renální ischemie smrt, selhání ledvin a zánět, kterým bylo zabráněno hypometabolickým stavem (bez hypotermie) vyvolaným plynným sulfanem, ale pouze tehdy, byl-li sulfan podán před ischemií (předběžná léčba). Strukturální poškození a apoptóza způsobená ischemicko-reperfúzním onemocněním byly téměř zcela potlačeny předléčbou a kombinovanou před- a následnou léčbou, kdy samotná následná léčba měla menší, i když významný účinek. Transmisní elektronová mikroskopie ukázala, že před- i následná léčba sulfanem zabránila ischemií vyvolaném otoku a degeneraci mitochondrií (Bos et al., 2009). Po bilaterální renální ischemii se zvyšují hodnoty CSE, sulfanu v plazmě a renální produkce sulfanu. Injekce NaSH snižuje ztrátu renální funkce vyvolané ischemií. NaSH také redukuje akutní tubulární nekrózu a apoptózu (Tripartara et al., 2008). Je zajímavé, že D-cystein může také ochránit ledviny před ischemií, zřejmě zvýšeným potenciálem ve srovnání s L-cysteinem produkcí sulfanu prostřednictvím DAO a MPST (Shibuya et al., 2013).

2.6 Dýchací soustava

Sulfan byl uznán jako toxická sloučenina také na úrovni dýchacích cest a zejména komplexu IV mitochondriálního elektronového transportního řetězce, cytochrom C oxidáza se zdá být primární cíl (Dorman et al., 2002; Nicholls et Kim, 1982). Významné snížení spotřeby kyslíku a ventilační frekvence bylo pozorováno u zvířat vystavených po 30 minut vysoké koncentraci Na₂S (Forgan et Forster 2009). Zdá se, že sulfan hraje významné pozitivní role v dýchacích cestách. Na základě relaxačního působení sulfanu na vaskulární hladké svalstvo, byly zkoumány relaxační vlastnosti sulfanu také na hladkosvalových bronchiálních prstencích dvou druhů hlodavců. Tato studie ukázala, že sulfan způsobuje silné uvolnění izolovaných

bronchiálních prstenců myší, ale vytváří pouze mírnou relaxaci v morčecích prstencích. (Martelli et al., 2012)

2.6.1 Plicní hypertenze

Existují důkazy poškození signalizace sulfanu u zvířecích modelů při plicní hypertenzi. Experimentální hypoxická plicní hypertenze vytvořená u krys umístěných v hypoxické komoře byla spojena se sníženým vyjádřením a aktivitou CSE. Podání sulfanu zvýšilo jeho hladinu v plazmě, zvýšilo aktivitu CSE a upravilo genovou expresi CSE; tomu odporovalo zvýšení plicního arteriálního tlaku a oslabení plicní vaskulární remodelace (Chunyu et al., 2003). Část ochrany poskytnutá endogenním sulfanem proti plicní hypertenzi by se mohla týkat jeho vazorelaxačních účinků jako v systémové hypertenzi, ale rovněž zde může být zapojena jeho antioxidační činnost (Dunn et al., 2016).

2.7 Gastrointestinální soustava

Oba enzymy, CBS i CSE, jsou lokalizovány v celé gastrointestinální soustavě savců. CSE je exprimován v neuronech obou plexů – submukózního i myenterického, stejně jako v určitých podtřídách Cajalových intersticiálních buněk (Linden et al., 2008; Schicho et al., 2006).

Distribuce CSE, CBS a 3-MPST v gastrointestinálním traktu (Jimenez et al., 2017)

Druh	ORgán	Enzym	Typ buněk
Myš	Žaludek	CBS/CSE	Hladkosvalové buňky
	Tenké střevo	CBS/CSE	Hladkosvalové buňky
	Tlusté střevo	CBS	Lamina propria
		CSE	Myenterický plexus
Morče	Ileum, tlusté střevo	CBS	Hladkosvalové buňky, Myenterický plexus
		CSE	Submukózní

			plexus, Myenterický plexus, Cajalovy intersticiální buňky
Člověk	Tlusté střevo	CBS/CSE	Submukózní plexus
		CBS/CSE	Epitel
Krysa	Žaludek	CBS/CSE	Epitel (mukóza)
	Lačník	CBS/CSE	Myenterický plexus
	Tlusté střevo	CBS/CSE	Hladkosvalové buňky, epitel
		CBS	Submukózní plexus, lamina propria
		CSE	obecná difúze
		CBS	Hladkosvalové buňky, epitel
		CSE	Submukózní plexus, Myenterický plexus, Hladkosvalové buňky
		CBS	Myenterický plexus, epitel
CSE	Hladkosvalové buňky, Myenterický plexus		
Králík	žaludek	CSE/3-MPST	Hladkosvalové buňky

Sulfan byl označen jako možný významný mediátor gastrointestinální pohyblivosti. Krom toho podávání exogenního sulfanu způsobuje na dávce závislou relaxaci hladkého svalstva kyčelníku a tlustého střeva. (Martelli et al., 2012). Serózní aplikace NaHS nebo L-cysteinu stimulovala lumenální sekreci chloridu morčecích a lidských střevních tkání (Schicho et al., 2006).

CSE i CBS jsou vyjádřeny v žaludeční sliznici a zdá se, že endogenní sulfan je ochranným faktorem proti žaludečním poraněním. Acetylsalicylová kyselina a nesteroidní protizánětlivé léky (NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs) redukuje expresi genu CSE a produkci sulfanu v žaludeční sliznici. NaHS předchází snížení slizničního průtoku krve vyvolaném v krysách acetylsalicylovou kyselinou a NSAIDs. Navíc NaHS snižuje NSAIDs vyvolanou přilnavost leukocytů k vaskulárnímu endotelu (Fiorucci et al., 2005a). Kromě toho NaHS zmírňuje histologické poranění žaludeční sliznice (Łowicka et Bełtowski, 2007). Několik studií prokázalo, že sulfan snižuje spontánní nebo acetylcholinem vyvolanou kontraktilitu kyčelníku u různých zvířecích druhů (Hosoki et al., 1997; Teague et al., 2002). Navíc NaHS intraperitoneálně uvolňuje krysí tlusté střevo in vivo (Distrutti et al., 2006).

Pokud jde o roli sulfanu ve změnách aktivity hladké svaloviny, byla zaznamenána kontraktilita, ale mnohem častěji inhibiční odpověď. Například v žaludcích morčat a myši způsobuje NaHS dvojí účinek, vytváří kontrakci při nízkých koncentracích a relaxaci při vysokých koncentracích (Zhao et al., 2009; Han et al., 2011). NaHS také vytváří relaxační efekt v preparátech morčecích, králíků a krysích lačníků a kyčelníků (Hosoki et al., 1997; Teague et al., 2002; Nagao et al., 2011, 2012; Kasperek et al., 2012). Nicméně koncentrace NaHS použité k vyvolání relaxace v gastrointestinální soustavě jsou vysoké a fyziologický význam této akce je stále neznámý (Jimenez et al., 2017).

Je třeba poznamenat, že střevní sliznice je trvale vystavena vysokému množství sulfanu vytvářeného z alimentárního sulfátu komenzálními sulfát redukujícími bakteriemi. Bylo naznačeno, že sulfan bakteriálního původu může přispívat k různým střevním onemocněním včetně ulcerózní kolitidy a kolorektálního karcinomu (Huycke et Gaskins, 2004). Bylo prokázáno, že sulfan stimuluje proliferaci kultivovaných krysích střevních epitelálních buněk (Deplancke et Gaskins, 2003). Sulfan zvýšil expresi silných angiogenních faktorů, vaskulárního endoteliálního faktoru (VEGF, vascular endothelial growth factor), který je zapojený do vaskularizace nádorů.

Sliznice tlustého střeva metabolizuje sulfan velmi účinně díky vysoké expresi rhodanézy (mitochondriální enzym detoxikující CN^-) na lumenálním povrchu enterocytů (Ramasamy et al., 2006) a je schopná se metabolicky adaptovat na přebytek sulfanu

(Leschelle et al., 2005). Buňky tlustého střeva jsou méně citlivé na genotoxický účinek sulfanu než jiné druhy buněk (Attene-Ramos et al., 2006). Střevní vyjádření rhodanézy je stimulováno sulfanem a zvyšuje se při epiteliálním diferenciaci buněk a je zajímavé, že je nižší u pacientů s ulcerativní kolitidou nebo kolorektálním nádorem než u zdravých (Ramasamy et al., 2006).

2.7.1 Játra

Ukázalo se, že CSE je vyjádřen v hepatocytech a jaterních hvězdicových buňkách, ale ne v jaterních endoteliálních buňkách, a že sulfan uvolňuje izolované hvězdicové buňky, čímž přispívá k uvolnění jaterních vlásečnic. Experimentální cirhóza vyvolaná podvázáním žlučovodu nebo podáváním tetrachlormetanu je spojena se sníženou expresí CSE, sníženou produkcí sulfanu jaterními homogenity a snížením plazmatické koncentrace sulfanu (Fiorucci et al., 2005b). Relaxační účinky L-cysteinu na hepatické hvězdicové buňky stejně jako na jaterní vlásečnice jsou sníženy v cirhotických zvířatech, zatímco relaxační účinky NaHS jsou stejné, což naznačuje snížení tvorby sulfanu z cysteinu a normální citlivost na tento plyn. Tato zjištění jsou doplňující k faktu, že dochází ke zvýšení jaterní vaskulární rezistence v cirhotických zvířatech a lidech, a naznačují, že deficit sulfanu může přispět k rozvoji portální hypertenze. Ačkoli hladina sulfanu při lidské cirhóze nebyla zkoumána, je dobře známo, že cirhóza je spojena se sníženým tokem homocysteinu transsulfurací (Garcia-Tevijano et al., 2001). Endogenní sulfan může být rovněž zapojen do regulace sekrece žluči (Łowicka et Bełtowski, 2007).

2.7.2 Játra jako model ischemie

Předběžná léčba plynným sulfanem při parciální hepatické ischemii redukuje nekrózu, apoptózu, příliv granulocytů. Léčba nízkými dávkami Na₂S (0,3 a 1 mg/kg) ochránila játra od poškození, zatímco 2 mg/kg poškození zvýšily. Histologické poškození bylo redukováno NaSH. Zánět a peroxidace lipidů byl rovněž redukován (Kang et al., 2009). NaSH potlačuje jaterní autofagii in vitro i in vivo (Wang et al., 2012).

3 Sulfanové prekurzory léčiv

Jak z předchozího textu vyplývá, jako signální plyn hraje sulfan důležitou roli ve fyziologii a vykazuje velký potenciál pro farmaceutické využití. Proto je zde potřeba vývoje sulfanových prekurzorů pro různé účely.

Přesná role sulfanu záleží na specifických okolnostech a interakci s ostatními signálními molekulami, zejména oxidem dusnatým a oxidem uhelnatým. Je to tedy hlavní oblastí výzkumu ve vývoji léčebných terapeutik na bázi sulfanu. Dalším hlavním tématem je nalezení vhodné cesty k dodání sulfanu do daného místa, ve správné koncentraci a odpovídajícími farmakokinetiky. Mnoho z těchto úkolů vychází z faktu, že je nemožné používat plynný sulfan jako takový nebo jeho soli, např. sulfid sodný, v léčebném použití pro lidi. Proto je zde velký zájem vyhledat vhodná sulfan-uvolňující činidla, která jsou obecně považovaná za sulfanové donory či prekurzory.

V minulých letech bylo vyvinuto několik sérií sulfanových prekurzorů. Ty mohou být rozděleny do tří rámcových skupin – přírodní produkty odvozené od rostlin, prekurzory na hydrolytické bázi a prekurzory s řízeným uvolňováním. (Zheng et al., 2015).

3.1 Sulfan ve farmakoterapii

Jak je zřejmé, produkce endogenního sulfanu je různá při mnoha chorobách, tedy alespoň v experimentálních studiích. Navíc u exogenního i endogenního sulfanu bylo prokázáno, že mají ochranné i škodlivé účinky při mnoha patofyziologiích. Vzniká tak otázka, zda by farmakologická modulace sulfanu mohla mít potencionální terapeutickou hodnotu. Teoreticky mohou být hladiny sulfanu pozměňovány kteroukoli z těchto čtyř metod:

1. Podávání sulfanu samotného
2. Podávání specifických inhibitorů CBS nebo CSE
3. Výrobou nových sulfan uvolňujících sloučenin
4. Zaměření produkce sulfanu na aktuálně používané léky

S ohledem na první možnost se zdá být terapeutický potenciál plynného sulfanu limitován těžkostmi s podáním přesně kontrolované koncentrace a možným toxickým vlivem přemíry sulfanu, ačkoli při pohledu na pokusy použití inhalovaného NO a CO (Wu et Wang, 2005) to nemůže být zcela vyloučeno. NaHS, ačkoli je široce využíván jako nástroj výzkumu, uvolňuje sulfan rychle a je tudíž krátkodobým donorem. Navíc rychlé uvolnění sulfanu může způsobit akutní změny v krevním tlaku. Ideální sulfanový donor z pohledu terapie by měl uvolňovat sulfan pomalu a v průměrných dávkách. Takové sloučeniny nejsou bohužel stále dostupné.

Také momentálně používané CSE a CBS inhibitory nejsou vhodné pro farmakoterapii a nejsou ideální ani pro výzkum. Za prvé nejsou kompletně specifikované a inhibují také ostatní na vitaminu B6 závislé enzymy. Za druhé možný inhibitor PAG je sloučenina obsahující olovo, a proto lze očekávat její toxicita při dlouhodobém podávání. A konečně inhibitory jiné

než PAG mají velmi omezenou schopnost prostupovat plazmatickými membránami. Vhodnější sulfanové donory stejně jako inhibitory sulfan produkujících enzymů jsou momentálně ve výrobě. Navíc i kompletní specifické CBS nebo CSE inhibitory nezasáhnou pouze do hladiny sulfanu, ale také do metabolismu homocysteinu, což může být v daných podmínkách nepříznivé.

Sulfan může být rovněž ovlivněn momentálně používanými léky nebo jejich deriváty. Například doplnění L-argininu primárně s předpokladem zvýšení tvorby NO (Cylwik et al., 2005) také upravuje zhoršenou produkci sulfanu ve vysokým tlakem vyvolané pulmonální hypertenzi (Yanfei et al., 2006). Tato a další data nasvědčují, že na sulfan může být cíleno léky, které zasahují NO.

Acetylsalicylová kyselina a nesteroidní protizánětlivé léky mají inhibiční účinek na cestu „CSE – sulfan“ v gastrointestinální mukóze (Fiorucci et al., 2005a). Tento účinek může přispívat ke gastrickému mukozálnímu zranění vyvolaném těmito léky, ale na druhou stranu mohou být zapojeny svými antineoplastickými účinky v gastrointestinálním traktu, poněvadž sulfan usnadňuje neoplastický růst intestinálních epitelálních buněk (Deplancke et Gaskins, 2003).

Nadprodukce sulfanu při získaných onemocněních nemusí nezbytně indikovat, že je škodlivým činitelem. Pokud je jeho škodlivá role prokázána ochranným účinkem inhibitorů CBS/CSE, lze usoudit, že sulfan je skutečně vazbou v patogenickém řetězci. V takových případech (např. sepse) je blokování produkce sulfanu možnou terapeutickou strategií. Nicméně nadprodukce sulfanu může být rovněž spojována s jeho ochrannou rolí (např. febrilní záchvaty). V takových případech může být produkce sulfanu považována za adaptivní odpověď, ačkoli pravděpodobně nedostatečná k zablokování vývoje onemocnění, a další doplnění sulfanu může být terapeuticky užitečné. Nedostatek sulfanu je sledován při onemocněních, kdy hraje ochrannou roli, např. arteriální hypertenze, gastrické mukozální poranění atd. a sulfanové donory mohou být terapeuticky prospěšné (Łowicka et Bełtowski, 2007).

3.2 Přírodní produkty odvozené od rostlin

Rostliny rodu *Allium*, zastoupené česnekem a cibulí, byly dlouho považovány za zdravou potravu s protihorečnatými účinky a jejich aktivní složky snižují riziko vzniku diabetu a kardiovaskulárních onemocnění (Milner, 2001; Rahman, 2001; Powolny et Singh, 2008). Roku 2007 studie ukázaly, že vazoaktivita česneku souvisí s produkcí sulfanu

(Benavides et al., 2007), což naznačovalo, že hlavní pozitivní efekty těchto rostlin jsou zprostředkovány biologickou produkcí sulfanu z organických polysulfidů. Dodnes bylo z česneku či přípravků vyrobených z česneku identifikováno několik složek obsahujících sulfan, ale pouze tři z nich mají farmakologický efekt, který koreluje se signálními dráhami sulfanu – S-allyl-cystein (SAC), diallyl disulfid (DADS) a diallyl trisulfid (DATS). DADS a DATS jsou hlavní komponenty česnekového oleje, chovají se jako donory sulfanu při reakci s biologickými thioley nebo lidskými červenými krevními buňkami za podpory glukózy. (Zheng et al., 2015).

3.3 Prekurzory sulfanu na hydrolytické bázi

Tyto prekurzory se primárně sestávají ze čtyř skupin – anorganické siřičitanové soli včetně NaHS, Na₂S (oba široce používané donory v základním výzkumu) a CaS, Lawessonova činidla a analogy, dithiotreitol (DTT) a arylthioamidové deriváty (Zheng et al., 2015).

3.3.1 Anorganické siřičitanové soli

NaHS a Na₂S jsou dva široce používané donory H₂S. Při hydrolýze obě tyto sloučeniny mohou rychle vytvářet sulfan při pH 7,4 v PBS bufferu. Obě dvě jsou rozsáhle používány při studiu biologického efektu sulfanu. Výsledky naznačují, že sulfan má protizánětlivý účinek při astmatické patogenezi patrně cestou CSE společně s H₂S. Při použití NaHS jako donora, Du et al. (Li et al., 2008) zjistili možnou roli sulfanu při patogenetickém akutním poranění plic (acute lung injury, ALI) vyvolaném kyselinou olejovou a jeho regulačnímu efektu při zánětlivé odpovědi. Navíc NaHS a Na₂S prokazují pro-zánětlivé (Zhi et al., 2007; Zhang et al., 2007a; Zhang et al., 2007b), iontové kanály regulující (Zhaio et al., 2001; Liu et al., 2012), kardiovaskulární (Yang et al., 2008) a neurogenní regulační účinky (Ghasemi et al., 2012). Ačkoli oba prokazují slibné biologické výsledky in vitro i in vivo, pravděpodobnost jejich použití v klinické aplikaci je malá vzhledem k příčinám jejich uvolňovací kinetiky, pachu, nedostatku schopnosti zacílení a obtížnosti kontroly koncentrace kvůli těkavosti sulfanu.

Další potenciální anorganický donor je sulfid vápenatý (CaS). Ve srovnání s NaHS a Na₂S je CaS chemicky stabilnější. Ovšem je zde pouze omezené množství informací o efektivnosti využití CaS jako donora pro sulfan. (Li et al., 2009).

3.3.2 Lawessonova činidla a analogy

Lawessonova činidla, která jsou široce užívána při sulfurizaci při organické syntéze, (Ozturk et al., 2007) také uvolňují sulfan při hydrolyze a v některých studiích jsou používány jako donory. Ve srovnání s anorganickým sulfidem je míra uvolňování s Lawessonovými činidly mnohem pomalejší.

GY4137 je ve vodě rozpustný derivát Lawessonova činidla, který může uvolňovat sulfan při hydrolyze (Li et al., 2008). Při srovnání s Lawessonovými činidly a siřičitanovými solemi vytváří sulfan pomaleji. O NaHS bylo dříve zjištěno, že vyvolává apoptickou smrt buněk kultivovaných fibroblastů a hladkosvalových buněk. Tyto rozdíly v bezpečnosti mezi GY4137 a NaHS mohou být způsobeny rozdílem v rychlosti uvolňování H_2S a jeho vytvořené koncentraci. Navíc GY4137 v koncentraci 400 nebo 800 $\mu\text{mol/l}$ také ukazuje určité protirakovinné účinky s úmrtím 30 – 70% sedmi různých lidských rakovinných buněčných linií a žádným účinkem na normální lidské plicní fibroblasty. Oproti tomu NaHS neprokazuje žádné protirakovinné účinky a pouze ukazuje slabší zabránění růstu buněk. Autor studie přisoudil takové rozdíly různé rychlosti uvolňování H_2S . Inkubace GY4137 v koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$ v kultivačním médiu uvolní nízké koncentrace sulfanu (<20 $\mu\text{mol/l}$) s koncentrací trvající přes 7 dní. V porovnání s inkubací NaHS (v koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$), která stejným způsobem vede k mnohem vyšším koncentracím sulfanu (až 400 $\mu\text{mol/l}$) s mnohem kratší dobou setrvání (1 hodina). Je velmi dobře známo, že efekt sulfanu je závislý na koncentraci s tím, že jeho vysoké koncentrace (přes 250 $\mu\text{mol/l}$) jsou toxické (Wallace, 2007).

I přes všechny úspěchy některé další nezávislé studie prokázaly opačný efekt, pokud je NaHS používán jako donor. Například sulfan ve formě NaHS prokazuje ochranný účinek rakovinných buněk tlustého střeva (Rose et al., 2005), zvyšuje růst jejich počtu a snižuje apoptózu v několika buněčných liniích (Cai et al., 2010). Tato nesourodá pozorování mohou být způsobena použitím rozdílných donorů sulfanu, které ho uvolňují různým tempem, poskytují různé vedlejší produkty a mají rozdílné vrcholné koncentrace. Je také nejasné, jaké vedlejší produkty by GY4137 vytvářel v buňkách, protože se předpokládá, že jeho metabolismus je komplikovaný. Dále by mělo být pamatováno na to, že procento hydrolyzy GY4137 je nízké, což znamená, že většina GY4137 zůstává v buňkách. Protože byly použity relativně vysoké koncentrace GY4137 (400 a 800 $\mu\text{mol/l}$), je zcela možné, že pozorované protirakovinné účinky mohou být způsobeny GY4137 samotným nebo jeho metabolickými produkty, a ne nezbytně uvolňovaným sulfanem. (Zheng et al., 2015).

3.3.3 Arylthioamidové deriváty

Vincenzo Calderone et al. (Martelli et al., 2013) syntetizovali sérii arylthioamidů a byly posouzeny jejich sulfan uvolňující vlastnosti. Zdá se, že mechanismus uvolňování sulfanu v případě arylthioamidů je thiol-aktivovaný. Je dobře popsáno, že hydrolyza thioacetamidů by vedla ke vzniku sulfanu. Může být proto usuzováno, že hydrolyza arylthioamidů by mohla rovněž poskytovat sulfan (Zheng et al., 2015).

3.3.4 1, 2 – dithiol – 3 – thiony a sulfanohybridní nesteroidní protizánětlivé léky

1, 2 – dithiol – 3 – thiony (DTT) jsou taktéž používány jako sulfanové donory. Ačkoli jejich uvolňovací mechanismus stále není plně objasněn, je široce uznáváno, že hydrolyza je součástí mechanismu pro výrobu sulfanu z DTT (Ozturk et al., 2007).

Použití nesteroidních protizánětlivých léků (Nonsteroidal Anti – Inflammatory Drugs, NSAIDs) je provázeno neakceptovatelným gastrointestinálním hnisáním a krvácením (Schnitzer et al., 2004; Singh et al., 2006; Kurahara et al., 2001; Sparatore et al., 2011). Ve snaze redukovat takové vedlejší příznaky bylo DTT propojeno s NSAIDs pro vytvoření HS-hybridních NSAIDs (HS-NAIDs), které prokazují podstatnou redukci gastrointestinálního poškození v porovnání s rodičovskými NSAIDs (Sparatore et al., 2011; Chan et Wallace, 2013). Navíc HS-NSAIDs také zvyšují protizánětlivé účinky svých NSAIDs součástí. Ačkoli DTT a jeho NSAID hybridy ukazují slibné bioaktivity ve vztahu k sulfanu in vitro i in vivo, je stále nejasné, jak činitelé sulfan in vivo uvolňují. Hydrolyza má určitě částečně podíl na uvolnění sulfanu z DTT. Kvůli přítomnosti disulfidových vazeb v DTT mohou thioly pomocí redukce také aktivovat DTT k uvolnění sulfanu. Proto jsou potřeba další experimenty k objasnění uvolňovacího mechanismu (Zheng et al., 2015).

3.4 Prekurzory s řízeným uvolňováním

Cílem prekurzorů s řízeným uvolňováním bylo vyvinout sulfanové prekurzory, které jsou stabilní ve vodním roztoku a při přípravě vzorků (Zhao et al., 2011). Prekurzory mohou uvolňovat sulfan za přítomnosti spouštěčů, kterými mohou být enzymy, hodnota pH, biomolekuly, UV světlo a další. V současné době jsou zde tři příklady - aktivace thiolem, aktivace světlem a aktivace bikarbonátem (Zheng et al., 2015).

3.4.1 Aktivace thiolem

V roce 2011 Xianova skupina (Zhao et al., 2011) vyvinula první thiolem aktivovaný sulfanový prekurzor. Za přítomnosti thiolové skupiny v biologických systémech může být spuštěno uvolňování sulfanu redukcí (Zheng et al., 2015).

3.4.2 Světlem aktivované sulfanové prekurzory

Druhým typem prekurzorů s řízeným uvolňováním jsou ty aktivované světlem. Byly publikovány dva příklady. První jsou na *gem*-dithiolu založené sulfanové prekurzory. V roce 2013 Xian se spolupracovníky (Devarie-Baez et al., 2013) identifikovali geminal-dithiol (*gem*-dithiol) jako strukturu, která by mohla uvolňovat sulfan ve vodném roztoku. Následně byla představena světlem štěpitelná struktura (2-nitrobenzyllová skupina) k ochraně *gem*-thiolové skupiny. Když byly molekuly vystaveny UV záření, *gem*-dithioly byly obnoveny. Následná hydrolýza vede k uvolnění sulfanu. Na základě této strategie bylo připraveno několik prekurzorů založených na *gem*-dithiolech.

Nicméně jsou tu dva očividné zápory těchto prekurzorů. Za prvé, rychlost uvolňování sulfanu závisí na hydrolýze *gem*-dithiolu, která je téměř strnulá. Za druhé, reaktivní vedlejší produkty 2-nitrosobenzaldehydy mohou se sulfanem reagovat, z čehož vyplývá snižující se produkce sulfanu.

Později Nakagawova skupina (Fukushima et al., 2014) objevila další typ světlem indukovaného prekurzoru: prekurzory sulfanu uzavřené v ketoprofenátu (Zheng et al., 2015).

3.4.3 Thioaminová kyselina

Thiolaminové kyseliny jako třetí kategorie prekurzorů s řízeným uvolňováním byly poprvé zveřejněny Giannisem a spolupracovníky v roce 2012 (Zhou et al., 2012). Bylo prokázáno, že thioglycon a thioalin uvolňují sulfan za přítomnosti bikarbonátu za fyziologických podmínek.

Protože zde existuje vysoká koncentrace bikarbonátu v krvi (27 mmol/l) při fyziologickém pH, thiolaminové kyseliny mohou být kandidátem na sulfanový prekurzor. Giannis a spolupracovníci porovnali uvolňovací kapacity sulfanu thiolaminových kyselin s GYY4137. Za stejných podmínek GYY4137 uvolnil méně sulfanu. Taktéž testovali farmakologické benefity těchto prekurzorů. Výsledky ukázaly, že thioglycin a thioalin mohou zvyšovat koncentraci intracelulárního cyklického guanosinového monofosfátu (cGMP) a podněcovat vazorelaxaci. Jeden z možných limitů bikarbonátem aktivovaných prekurzorů

vychází z reaktivity thiolaminových kyselin, které mohou rychlé podstupovat amidaci za aerobních podmínek (Pan et al., 2011).

4 Závěr

Sulfan je důležitou signální molekulou, jejíž přítomnost v organismu a účinky byly v minulých letech objeveny. Účastní se spolu s oxidem uhelnatým a oxidem dusnatým mnoha dějů v savcích orgánových soustavách, a to jak fyziologických, tak i patologických. Jeho účinky byly pozorovány v kardiovaskulární, nervové, pohybové, endokrinní, vylučovací i gastrointestinální soustavě. Mezi hlavní efekty sulfanu patří regulace oxidačního stresu, stimulace K_{ATP} kanálů v různých typech buněk, dále reguluje cévní tonus a ochraňuje orgány před ischemicko-reperfúzním onemocněním. Významné jsou účinky sulfanu při inhibici rakovinných buněk a výzkum léků na tomto poli by mohl vést k novým léčebným terapiím.

V rámci nových výzkumů jsou objevovány a objasňovány stále nové možnosti působení sulfanu. Je však nutno podotknout, že účinky sulfanu při různých testech byly pozitivní i negativní a není zcela jasné, jak přesně sulfan funguje. Sulfan je převážně enzymaticky produkován několika způsoby, některé účinky tedy mohou být ovlivněny enzymy, které produkci sulfanu katalyzují. Zároveň i vyprodukovaný sulfan může v závislosti na přítomných sloučeninách či vzniklých produktech vykazovat různé účinky, nebo může být výsledný efekt způsoben vedlejším produktem reakce.

Předpokladem pro konečný účinek je rychlost uvolňování a koncentrace. S přihlédnutím k mnohým pozitivním účinkům sulfanu jsou vyvíjeny prekurzory léčiv, které by umožňovaly jeho použití při léčbě, ovšem stále se hledá nejlepší forma, která bude mít optimální účinky.

5 Použitá literatura

Abe, K., Kimura, H. 1996. The possible role of hydrogen sulphide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience* 16 (3). 1066 – 1071.

Ali, M. Y., Ping, C. Y., Mok, Y-Y. P., Ling, L., Whiteman, M., Bhatia, M., Moore, P. K. 2006. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo: a new role for endogenous hydrogen sulphide? *British Journal of Pharmacology* 149 (6). 625 – 634.

Aminlari, M., Gilanpour, H., Taghavianpour, H., Veseghi, T. 1989. Comparative studies

on the distribution of rhodanese and beta-mercaptopyruvate sulfurtransferase in different organs of sheep (*Ovis aries*) and cattle (*Bos taurus*), *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 92. 259–262.

Attene-Ramos, M. S., Wagner, E. D., Plewa, M. J., Gaskins, H. R. 2006. Evidence that hydrogen sulfide is a genotoxic agent. *Molecular Cancer Research* 4 (1). 9 – 14.

Banerjee, R., Zou, C. G. 2005. Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433. 144–156.

Beltowski, J. 2010. Hypoxia in the renal medulla: implications for hydrogen sulfide signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 334 (2). 358 – 363.

Beltowski, J. 2015. Hydrogen sulfide in pharmacology and medicine – An update. *Pharmacological reports* 67 (3). 647 – 658.

Benavides, G. A., Squadrito, G. L., Mills, R. W., Patel, H. D., Isbell, T. S., Patel, R. B., Darley-Usmar, V. M., Doeller, J. E., Kraus, D. W. 2007. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104. 17977 – 17982.

Bhambhani, Y., Burnham, R., Snyder, G., MacLean, I. 1997. Effects of 10-ppm hydrogen sulfide inhalation in exercising men and women. Cardiovascular, metabolic, and biochemical responses. *The Journal of Occupational and Environmental Medicine* 39. 122–129.

Bhambhani, Y., Burnham, R., Snyder, G., MacLean, I., Martin, T. 1996. Effects of 5 ppm hydrogen sulfide inhalation on biochemical properties of skeletal muscle in exercising men and women, *American Industrial Hygiene Association Journal* 57. 464–468.

Blachier, F., Davila, A. M., Mimoun, S., Benetti, P. H., Atanasiu, C., Andriamihaja, M., Benamouzig, R., Bouillaud, F., Tomé, D. 2010. Luminal sulfide and large intestine mucosa: friend or foe? *Amino Acids* 39 (2). 335 – 347.

Bos, E. M., Leuvenink, H. G. D., Snijder, P. M., Kloosterhuis, N. J., Hillebrands, J-L., Leemans, J. C., Florquin, S., van Goor, H. 2009. Hydrogen sulfide-induced hypometabolism prevents renal ischemia/reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology* 20. 1901–1905.

Bos, E. M., Van Goor, H., Joles, J. A., Whiteman, M., Leuvenink, H. G. 2014. Hydrogen sulfide – physiological properties and therapeutic potential in ischemia. *British Journal of Pharmacology* 172. 1479 – 1493.

Bucci, M., Papapetropoulos, A., Vellecco, V., Zhou, Z., Pyriochou, A., Roussos, C., Roviezzo, F., Brancaleione, V., Cirino, G. 2010. Hydrogen sulphide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (10). 1998 – 2004.

Cai, W. J., Wang, M. J., Ju, L. H., Wang, C., Zhu, Y. C. 2010. Hydrogen sulfide induces human colon cancer cell proliferation: role of Akt, ERK and p21. *Cell Biology International* 34. 565–572.

Caliendo, G., Cirino, G., Santagada, V., Wallace, J. L. 2010. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H₂S): development of H₂S - releasing drugs as pharmaceuticals. *Journal of Medicinal Chemistry* 53. 6275 - 6286.

Chan, M. V., Wallace, J. L. 2013. Hydrogensulfide-based therapeutics and gastrointestinal diseases: translating physiology to treatments. *The American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 305. G467 – 473.

Chattopadhyay, M., Kodela, R., Nath, N., Dastagirzada, Y. M., Velázquez-Martínez, C. A., Boring, D., Kashfi, K. 2011. Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs inhibit the growth of human cancer cells: a general property and evidence of a tissue type-independent effect. *Biochemical Pharmacology* 83(6). 715 - 722.

Cheang, W. S., Wong, W. T., Shen, B., Lau, C. W., Tian, X. Y., Tsang, S. Y., Xiao, X. Q., Chen, Z. Y., Huang, Y. 2010. 4-Aminopyridine-sensitive K⁺ channels contributes to NaHS-

induced membrane hyperpolarization and relaxation in the rat coronary artery. *Vascular Pharmacology* 53 (3 – 4). 94 – 98.

Chen, W. L., Niu, Y. Y., Jiang, W. Z., Tang, H. L., Zhang, C., Xia, Q. M., Tang, X. Q. 2015. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide and the underlying signaling pathways. *Reviews in the Neurosciences* 26 (2). 129 – 142.

Cheng, Y., Ndisang, J. F., Tang, G., Cao, K., Wang, R. 2004. Hydrogen sulphide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *American Journal of Physiology* 287 (5). H2316 – H2323.

Coletta, C., Papateropoulos, A., Erdelyi, K., Olah, G., Modis, K., Panopoulos, P., Asimakopoulou, A., Gerö, D., Sharina, I., Martin, E., Szabo, C. 2012. Hydrogen sulphide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 109 (23). 9161 – 9166.

Collin, M., Thiernemann, C. 2005. Hydrogen sulfide and sulfite: novel mediators in the pathophysiology of shock and inflammation. *Shock* 24, 595–596.

Cooper, C. E., Brown, G. C. 2008. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40 (5). 533 – 539.

Cylwik, D., Mogielnicki, A., Buczko, W. 2005. L-arginine and cardiovascular system. *Pharmacological Reports* 57. 14–22.

Dello Russo, C., Tringali, G., Ragazzoni, E., Maggiano, N., Menini, E., Vairano, M., Preziosi, P., Navarra, P. 2000. Evidence that hydrogen sulphide can modulate hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: in vitro and in vivo studies in the rat. *Journal of Neuroendocrinology* 12 (10). 225 – 233.

Deng, J., Lei, C., Chen, Y., Fang, Z., Yang, Q., Zhang, H., Cai, M., Shi, L., Dong, H., Xiong, L. 2014. Neuroprotective gases - Fantasy or reality for clinical use? *Progress in Neurobiology* 115. 210 – 245.

Deplancke, B., Gaskins, H. R. 2003. Hydrogen sulfide induces serum-independent cell cycle entry in nontransformed rat intestinal epithelial cells. *FASEB Journal* 17 (8). 1310 – 1312.

Devarie-Baez, N. O., Bagdon, P. E., Peng, B., Zhao, Y., Park, C. M., Xian, M. 2013. Light-induced hydrogen sulfide release from “caged” gem-dithiols. *Organic Letters* 15. 2786 –2789.

Distrutti, E., Sediari, L., Mencarelli, A., Renga, B., Orlandi, S., Antonelli, E., Roviezzo, F., Morelli, A., Cirino, G., Wallace, J. L., Fioruci, S. 2006. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating K_{ATP} channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316 (1). 326 – 335.

Donovan, J., Wong, P. S., Roberts, R. E., Garle, M. J., Alexander, S. P. H., Dunn, W. R., Ralevic, V. 2017. A critical role for cystathionine- β -synthase in hydrogen sulfide-mediated hypoxic relaxation of the coronary artery. *Vascular Pharmacology* 93 – 95. 20 – 32.

Dorman, D. C., Moulin, F. J., McManus, B. E., Mahle, K. C., James, R. A., Struve, M. F. 2002. Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: Correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium. *Toxicological Sciences* 65 (1). 18 – 25.

Du, J. T., Li, W., Yang, J. Y., Tang, C. S., Li, Q., Jin, H. F. 2013. Hydrogen sulfide is endogenously generated in rat skeletal muscle and exerts a protective effect against oxidative Stress. *Chinese Medical Journal - Peking* 126. 930 – 936.

Dunn, W. R., Alexander, S. P. H., Ralevic, V., Roberts, R. E. 2016. Effects of hydrogen sulphide in smooth muscle. *Pharmacology & Therapeutics* 158. 101 – 113.

Eberhardt, M., Dux, M., Namer, B., Miljkovic, J., Cordasic, N., Will, C., Kichko, T., de la Roche, J., Fischer, M., Suárez, S. A., Bikiel, D., Dorsch, K., Leffler, A., Babes, A., Lampert, A., Lennerz, J. K., Jacobi, J., Martí, M. A., Doctorovich, F., Högestätt, E. D., Zygmunt, P. M.,

Ivanovic-Burmazovic, I., Messlinger, K., Reeh, P., Filipovic, M. R. 2014. H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nature Communications* 5. 4381.

Elrod, J. W., Calvert, J. W., Morrison, J., Doeller, J. E., Kraus, D. W., Tao, L., Jiao, X., Scalia, R., Kiss, L., Szabo, C., Kimura, H., Chow, C. W., Lefer, D. J. 2007. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function.

Fernandes, V. S., Ribeiro, A. S., Barahona, M. V., Orensanz, L. M., Martínez-Sáenz, A., Recio, P., Martínez, A. C., Bustamante, S., Carballido, J., García-Sacristán, A., Prieto, D., Hernández, M. 2013a. Hydrogen sulfide mediated inhibitory neurotransmission to the pig bladder neck: role of K_{ATP} channels, sensory nerves and calcium signaling. *The Journal of Urology* 190. 746 – 756.

Fernandes, V. S., Ribeiro, A. S., Martínez, M. P., Orensanz, L. M., Barahona, M. V., Martínez-Sáenz, A., Recio, P., Bedito, S., Bustamante, S., Carballido, J., García-Sacristán, A., Prieto, D., Hernández, M. 2013b. Endogenous hydrogen sulfide has a powerful role in inhibitory neurotransmission to the pig bladder neck. *The Journal of Urology* 189. 1567 – 1573.

Fernandes, V. S., Ribeiro, A. S., Martínez, P., López-Oliva, M. E., Barahona, M. V., Orensanz, L. M., Martínez-Sáenz, A., Recio, P., Bedito, S., Bustamante, S., García-Sacristán, A., Prieto, D., Hernández, M. 2014. Hydrogen sulfide plays a key role in the inhibitory neurotransmission to the pig intravesical ureter. *PLoS ONE* 9. 113580.

Fernandes, V. S., Hernández, M. 2016. The role of nitric oxide and hydrogen sulfide in urinary tract function. *Clinical Pharmacology & Toxicology* 119. 34 – 41.

Fiorucci, S., Antonelli, E., Distrutti, E., Rizzo, G., Mencarelli, A., Orlandi, S., Zanardo, R., Renga, B., Di Sante, M., Morelli, A., Cirino, G., Wallace, J. L. 2005a. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterology* 129 (4). 1210 – 1224.

Fiorucci, S., Antonelli, E., Mencarelli, A., Orlandi, S., Renga, B., Rizzo, G., Distrutti, E., Shah, V., Morelli, A. 2005b. The third gas: H₂S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis. *Hepatology* 42 (3). 539 – 548.

Florian, B., Vintilescu, R., Balseanu, A. T., Buga, A-M., Grisk, O., Walker, L. C., Kessler, C., Popa-Wagner, A. 2008. Long-term hypothermia reduces infarct volume in aged rats after focal ischemia. *Neuroscience Letters* 438. 180 – 185.

Forgan, L. G., Foster, M. E. 2009. Oxygen consumption, ventilation frequency and cytochrome c oxidase activity in blue cod (*Paraperca colias*) exposed to hydrogen sulphide or isoeugenol. *Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology & Pharmacology: CBP* 151 (1). 57 – 65.

Fu, M., Zhang, W., Wu, L., Yang, G., Li, H., Wang, R. 2012. Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 109 (8). 2943–2948.

Fukami, K., Kawabata, A. 2015. Hydrogen sulfide and neuronal differentiation: Focus on Ca²⁺ channels. *Nitric Oxide* 46. 50 – 54.

Fukushima, N., Ieda, N., Sasakura, K., Nagano, T., Hanaoka, K., Suzuki, T., Miyata, N., Nakagawa, H. 2014. Synthesis of a photocontrollable hydrogen sulfide donor using ketoprofenate photocages. *Chemical Communications* 50. 587 – 589.

Fusco, F., di Villa Bianca, R., Mitidieri, E., Cirino, G., Sorrentino, R., Mirone, V. 2012. Sildenafil effect on the human bladder involves the Lcysteine/ hydrogen sulfide pathway: a novel mechanism of action of phosphodiesterase type 5 inhibitors. *European Urology* 62. 1174 – 1180.

Gai, J. W., Wahafu, W., Guo, H., Liu, M., Wang, X. C., Xiao, Y. X., Zhang, L., Xin, Z. C., Jin, J. 2013. Further evidence of endogenous hydrogen sulphide as a mediator of relaxation in human and rat bladder. *Asian Journal of Andrology* 15. 692 – 696.

Garcia-Tevijano, E. R., Berasain, C., Rodriguez, J. A., Corrales, F., J., Arias, R., Martin-Duce, A., Caballeria, J., Mato, J. M., Avila, M. A. 2001. Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis: mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis. *Hypertension* 38 (5). 1217 – 1221.

Geng, B., Chang, L., Pan, C., Qi, Y., Zhao, J., Pang, Y., Du, J. 2004. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318. 756 – 763.

Ghasemi, M., Dehpour, A. R., Moore, K. P., Mani, A. R. 2012. Role of endogenous hydrogen sulfide in neurogenic relaxation of rat corpus cavernosum. *Biochemical Pharmacology* 83. 1261 – 1268.

Ginter, E., Simko, V. 2010. Garlic (*Allium sativum* L.) and cardiovascular diseases. *Bratislavské Lekárské Listy* 111. 452 - 456.

Grobelny, B. T., Ducruet, A. F., DeRosa, P. A., Kotchetkov, I. S., Zacharia, B. E., Hickman, Z. L., Fernandez, L., Narula, R., Claassen, J., Lee, K., Badjatia, N., Mayer, S. A., Connolly, E. S. Jr. 2011. Gain-of-function polymorphisms of cystathionine beta-synthase and delayed cerebral ischemia following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery* 115. 101 – 107.

Han, J., Chen, Z. W., He, G. W. 2013. Acetylcholine- and sodium hydrosulfide-induced endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in cerebral vessels of global cerebral ischemia-reperfusion rat. *Journal of Pharmacological Sciences* 121 (4). 318 – 326.

Hosoki, R., Matsuki, N., Kimura, H. 1997. The possible role of hydrogenous sulphide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237 (3). 527 – 531.

House, J. D., Brosnan, M. E., Brosnan, J., T. 1997. Characterization of homocysteine metabolism in the rat kidney. *Biochemical Journal* 328 (Pt 1). 287 – 292.

- Huang, C., Kan, J., Liu, X., Ma, F., Tran, B. H., Zou, Y., Wang, S., Zhu, Y. Z. 2013. Cardioprotective effects of a novel hydrogen sulfide agent-controlled release formulation of S-propargyl-cystein on heart failure rats and molecular mechanisms. *PLoS ONE* 8 (7). e69205.
- Huycke, M., M., Gaskins, H. R. 2004. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanism and models. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 229 (7). 586 – 597.
- Ishii, I., Akahoshi, N., Yu, X. N., Kobayashi, Y., Namekata, K., Komaki, G., Kimura, H. 2004. Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochemical Journal* 381 (Pt 1). 113 – 123.
- Jacobs, R. L., House, J. D., Brosnan, M. E., Brosnan, J. T. 1998. Effects of streptozotocin-induced diabetes and of insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat. *Diabetes* 47. 1967 – 1970.
- Jimenez, M., Gil, V., Martinez-Cutillas, M., Mañé, N., Gallego, D. 2017. Hydrogen sulphide as a signalling molecule regulating physiopathological processes in gastrointestinal motility. *British Journal of Pharmacology* 174. 2805 – 2817.
- Johansen, D., Ytrehus, K., Baxter, G. F. 2006. Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury – evidence for a role of K_{ATP} channels. *Basic Research in Cardiology* 101. 53 – 60.
- Kado, D. M., Bucur, A., Selhub, J., Rowe, J. W., Seeman, T. 2002. Homocysteine levels and decline in physical function: MacArthur Studies of Successful Aging, *The American Journal of Medicine* 113. 537 – 542.
- Kamoun, P. 2004. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids* 26. 243 – 254.

- Kaneko, Y., Kimura, Y., Kimura, H., Niki, I. 2006. L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes* 55 (5). 1391 – 1397.
- Kaneko, Y., Kimura, T., Taniguchi, S., Souma, M., Kojima, Y., Kimura, Y., Kimura, H., Niki, I. 2009. Glucose-induced production of hydrogen sulfide may protect the pancreatic beta-cells from apoptotic cell death by high glucose. *FEBS Letters* 583 (2). 377 – 382.
- Kang, K., Zhao, M., Jiang, H., Tan, G., Pan, S., Sun, X. 2009. Role of hydrogen sulfide in hepatic ischemia-reperfusion-induced injury in rats. *Liver Transplantation* 15. 1306 – 1314.
- Kashfi, K., Olson, K. R. 2013. Biology and therapeutic potential of hydrogen sulfide and hydrogen sulfide-releasing chimeras, *Biochemical Pharmacology* 85. 689 - 703.
- Kasperek, M. S., Linden, D. R., Farrugia, G., Sarr, M. G. 2012. Hydrogen sulfide modulates contractile function in rat jejunum. *Journal of Surgical Research* 175. 234 – 242.
- Kimura, M. 2002. Hydrogen sulfide as a neuromodulator. *Molecular Neurobiology* 26. 13 – 19.
- Kimura, H. 2013. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. *Neurochemistry International* 63 (5). 492 - 497
- Kimura, H. 2014. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide* 41. 4 – 10.
- Kimura, Y., Dargusch, R., Schubert, D., Kimura, H. 2006. Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 8 (3 – 4). 661 – 670.
- Kimura, Y., Kimura, H. 2004. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB Journal* 18. 1165 – 1167.

Kiss, L., Deitch, E. A., Szabo, C. 2008. Hydrogen sulphide decreases adenosine triphosphate levels in aortic rings and leads to vasorelaxation via metabolic inhibition. *Life Sciences* 83 (17 – 18). 589 – 594.

Knapp, J., Heinzmann, A., Schneider, A., Padosch, S. A., Böttiger, B. W., Teschendorf, P., Popp, E. 2011. Hypothermia and neuroprotection by sulfide after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation* 82. 1076 – 1080.

Koenitzer, J. R., Isbell, T. S., Patel, H. D., Benavides, G. A., Dickinson, D. A., Patel, R. P., Darley-Usmar, V. M., Lancaster J. R. Jr, Doeller, J. E., Kraus, D. W. 2007. Hydrogen Sulphide mediates vasoactivity in an O₂ – dependent manner. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 292 (4). H1953 – H1960.

Koj, A., Frendo, J., Wojtczak, I. 1975. Subcellular distribution and intramitochondrial localization of three sulfurtransferases in rat liver . *FEBS Letters* 57. 42 – 66.

Kolluru, G. K., Shen, X., Bir, S. C, Kevil, C. G. 2013. Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide* 35. 5 – 20.

Kondo, K., Bhushan, S., King, A. L., Prabhu, S. D., Hamid, T., Koenig, S., Murohara, T., Predmore, B. L., Gojon, G. Sr, Gojon, G. Jr, Wang, R., Karusula, N., Nicholson, C. K., Calvert, J. W., Lefer, D. J. 2013. H₂S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 127. 1116 – 1127.

Koning, A. M., Frenay, A.R., Leuvenink, H.G., van Goor, H. 2015. Hydrogen sulfide in renal physiology, disease and transplantation – the smell of renal protection. *Nitric Oxide* 46. 37 – 49.

Krishnan, N., Fu, C., Pappin, D. J., Tonks, N. K. 2011. H₂S-induced sulphydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. *Science Signaling* 4 (203). ra 86.

- Kurahara, K., Matsumoto, T., Iida, M., Honda, K., Yao, T., Fujishima, M. 2001. Clinical and endoscopic features of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced colonic ulcerations. *The American Journal of Gastroenterology* 96. 473 – 480.
- Lee, M., Schwab, C., Yu, S., McGeer, E., McGeer, P. L. 2009. Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide. *Neurobiology of Aging* 30. 1523 – 1534.
- Lee, S. K., Chung, J. H., Choi, S. C., Auh, Q. S., Lee, Y. M., Lee, S. I., Kim, E. C. 2013. Sodium hydrogen sulfide inhibits nicotine and lipopolysaccharide-induced osteoclastic differentiation and reversed osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 114 (5) 1183 – 1193.
- Lee, Z. W., Zhou, J., Chen, C. S., Zhao, Y., Tan, C. H., Li, L., Moore, P. K., Deng, L. W. 2011. The slow-releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits novel anti-cancer effects in vitro and in vivo, *PLoS ONE* 6. e21077.
- Leschelle, X., Gubern, M., Andriamihaja, M., Blottiere, H., M., Couplan, E., Gonzalez-Barroso, M., D., Petit, C., Pagniez, A., Chaumontet, C., Mignotte, B., Bouillaud, F., Blachier, F. 2005. Adaptive metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1725 (2). 201 – 212.
- Li, N., Chen, L., Muh, R. W., Li, P. L. 2006. Hyperhomocysteinemia associated with decreased renal transsulfuration activity in Dahl's rats. *Hypertension* 47 (6). 1094 – 1100.
- Li, L., Whiteman, M., Guan, Y. Y., Neo, K. L., Cheng, Y., Lee, S. W., Zhao, Y., Baskar, R., Tan, C. H., Moore, P. K. 2008. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide, *Circulation* 117. 2351 - 2360.
- Li, T., Zhao, B., Wang, C., Wang, H., Liu, Z., Li, W., Jin, H., Tang, C., Du, J. 2008. Regulatory effects of hydrogen sulfide on IL-6, IL-8 and IL-10 levels in the plasma and pulmonary tissue of rats with acute lung injury. *Experimental Biology and Medicine* 233. 1081 – 1087.

- Li, Y. F., Xiao, C. S., Hui, R. T. 2009. Calcium sulfide (CaS), a donor of hydrogen sulfide (H₂S): a new antihypertensive drug? *Medical Hypotheses* 73. 445 – 447.
- Li, Z., Wang, Y., Xie, Y., Yang, Z., Zhang, T. 2011. Protective effects of exogenous hydrogen sulfide on neurons of hippocampus in a rat model of brain ischemia. *Neurochemical Research* 36. 1840 – 1849.
- Linden, D. R., Sha, L., Mazzone, A., Stoltz, G. J., Bernard, C. E., Furne, J. K., Levitt, M. D., Farrugia, G., Szurszewski, J. H. 2008. Production of the gaseous signal molecule hydrogen sulfide in mouse tissues. *Journal of Neurochemistry* 106. 1577 – 1585.
- Liu, L., Liu, H., Sun, D., Qiao, W., Qi, Y., Sun, H., Yan, C. 2012. Effects of H₂S on myogenic responses in rat cerebral arterioles. *Circulation Journal* 76. 1012 – 1019.
- Liu, Y., Yang, R., Liu, X., Zhou, Y., Qu, C., Kikuri, T., Wang, S., Zandi, E., Du, J., Ambudkar, I. S., Shi, S. 2014. Hydrogen sulfide maintains mesenchymal stem cell function and bone homeostasis via regulation of Ca⁽²⁺⁾ channel sulfhydration, *Cell Stem Cell* 15. 66–78.
- Liu, Y-H., Yan, C-D., Bian, J-S. 2011. Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the vascular system. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 58. 560 – 569.
- Lloyd, D. 2006. Hydrogen sulfide: clandestine microbial messenger?, *Trends in Microbiology* 14. 456 – 462.
- Łowicka, E., Beltowski, J. 2007. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports* 59. 4 – 24.
- Ma, K., Liu, Y., Zhu, Q., Liu, C. H., Duan, J. L., Tan, B. K., Zhu, Y. Z. 2011. H₂S donor, S-propargyl-cysteine, increases CSE in SGC-7901 and cancer-induced mice: evidence for a novel anti-cancer effect of endogenous H₂S? *PLoS ONE* 6 (6). e20525.

Martelli, A., Testai, L., Breschi, M. C., Blandizzi, C., Viridis, A., Taddei, S., Calderone, V. 2012. Hydrogen Sulphide: Novel Opportunity for Drug Discovery. *Medicinal Research Reviews* 32 (6). 1093 – 1130.

Martelli, A., Testai, L., Citi, V., Marino, A., Pugliesi, I., Barresi, E., Nesi, G., Rapposelli, S., Taliani, S., Da Settimo, F., Breschi, M. C., Calderone, V. 2013. Arylthioamides as H₂S donors: L-cysteine-activated releasing properties and vascular effects in vitro and in vivo. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 4. 904 – 908.

Martínez-Sáenz, A., Recio, P., Orensanz, L. M., Fernandes, V. S., Martínez, M. P., Bustamante, S., Carballidod, J., García-Sacristána, A., Prieto, D., Hernández, M. 2011. Role of calcitonin gene-related peptide in inhibitory neurotransmission to the pig bladder neck. *The Journal of Urology* 186. 728 – 735.

Mikami, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Nagahara, N., Yamada, M., Kimura, H. 2011. Hydrogen sulfide protects the retina from light-induced degeneration by the modulation of Ca²⁺ influx. *The Journal of Biological Chemistry* 286. 39379 – 39386.

Milner, J. A. 2001. Mechanisms by which garlic and allyl sulfur compounds suppress carcinogen bioactivation. *Garlic and carcinogenesis. Advances in Experimental Medicine and Biology* 492. 69 – 81.

Minamishima, S., Bougaki, M., Sips, P. Y., Yu, J. D., Minamishima, Y. A., Elrod, J. W., Lefler, D. J., Bloch, K. D., Ichinose, F. 2009. Hydrogen sulfide improves survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation via a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism in mice. *Circulation* 120. 888 – 896.

Mitsuhashi, H., Ikeuchi, H., Nojima, Y. 2001. Is sulfite an antiatherogenic compound in wine? *Clinical Chemistry* 47. 1872 – 1873.

Mitsuhashi, H., Yamashita, S., Ikeuchi, H., Kuroiwa, T., Kaneko, Y., Hiromura, K., Ueki, K. 2005. Oxidative stress-dependent conversion of hydrogen sulfide to sulfite by activated neutrophils. *Shock* 24. 529 – 534.

Módis, K., Coletta, C., Erdélyi, K., Papapetropoulos, A., Szabo, C. 2013a. Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics. *FASEB Journal* 27 (2). 601 – 611.

Módis, K., Panopoulos, P., Coletta, C., Papapetropoulos, A., Szabo, C. 2013b. Hydrogen sulfide-mediated stimulation of mitochondrial electron transport involves inhibition of the mitochondrial phosphodiesterase 2A, elevation of cAMP and activation of protein kinase. *Biochemical Pharmacology* 86 (9). 1311 – 1319.

Munaron, L., Avanzato, D., Moccia, F., Mancardi, D. 2013. Hydrogen sulfide as a regulator of calcium channels. *Cell Calcium* 53 (2). 77 – 84.

Nagahara, N., Ito, T., Kitamura, H., Nishino, T. 1998. Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochemistry and Cell Biology* 110. 243 – 250

Nagao, M., Duenes, J. A., Sarr, M. G. 2012. Role of hydrogen sulfide as a gasotransmitter in modulating contractile activity of circular muscle of rat jejunum. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 16. 334 – 343.

Nagao, M., Linden, D. R., Duenes, J. A., Sarr, M. G. 2011. Mechanisms of action of the gasotransmitter hydrogen sulfide in modulating contractile activity of longitudinal muscle of rat ileum. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 15. 12 – 22.

Nicholls, P., Kim, J. K. 1982. Sulphide as an inhibitor and electron donor for the cytochrome c oxidase system. *Canadian Journal of Biochemistry* 60 (6). 613 – 623.

Ogasawara, Y., Isoda, S., Tanabe, S. 1994. Tissue and subcellular distribution of bound and acid-labile sulfur, and the enzymic capacity for sulfide production in the rat. *Biological and Pharmacological Bulletin* 17. 1535–1542.

Olas., B. 2015. Hydrogen sulfide in signaling pathways. *Clinica Chimica Acta* 439. 212 – 218.

Olson, K. R. 2015. Hydrogen sulfide as an oxygen sensor. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 51 (3). 623 – 632.

Osipov, R. M., Robich, M. P., Feng, J., Chan, V., Clements, R. T., Deyo, R. J., 2010. Effects of hydrogen sulfide on myocardial protection in the setting of cardioplegia and cardiopulmonary bypass. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* 10. 506 – 512.

Ozturk, T., Ertas, E., Mert, O. 2007. Use of Lawesson's reagent in organic syntheses. *Chemical Reviews* 107. 5210 – 5278.

Pan, J., Devarie-Baez, N. O., Xian, M. 2011. Facile amide formation via S-nitrosothioacids. *Organic Letters* 13. 1092 – 1094.

Powolny, A. A., Singh, S. V. 2008. Multitargeted prevention and therapy of cancer by diallyl trisulfide and related Allium vegetable-derived organosulfur compounds. *Cancer Letters* 269. 305 – 314.

Predmore, B. L., Lefer, D. J., Gojon, G. 2012. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxidants & Redox Signaling* 17. 119 – 140.

Qu, K., Chen, C. P. L. H., Halliwell, B., Moore, P. K., Wong, P. T. H. 2006. Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. *Stroke* 37. 889 – 893.

Rahman, K. 2001. Historical perspective on garlic and cardiovascular disease. *The Journal of Nutrition* 131. 977 – 979.

Ramasamy, S., Singh, S., Taniere, P., Langman, M. J., Eggo, M. C. 2006. Sulfide-detoxifying enzymes in the human colon and decreased in cancer and upregulated in differentiation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 291 (2). G288 – G296.

- Ren, C., Du, A., Li, D., Sui, J., Mayhan, W. G., Zhao, H. 2010. Dynamic change of hydrogen sulfide during global cerebral ischemia-reperfusion and its effect in rats. *Brain Research* 1345. 197 – 205.
- Rose, P., Moore, P. K., Ming, S. H., Nam, O. C., Armstrong, J. S., Whiteman, M. 2005. Hydrogen sulfide protects colon cancer cells from chemopreventative agent β -phenylethyl isothiocyanate induced apoptosis. *World Journal of Gastroenterology* 11. 3990 – 3997.
- Schicho, R., Krueger, D., Zeller, F., Von Weyhern, C. W., Frieling, T., Kimura, H., Ischii, I., De Giorgio, R., Campi, B., Schemann, M. 2006. Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the Guinea-pig and human colon. *Gastroenterology* 131 (5). 1542 – 1552.
- Schnitzer, T. J., Burmester, G. R., Mysler, E., Hochberg, M. C., Doherty, M., Ehram, E., Gitton, X., Krammer, G., Mellein, B., Matchaba, P., Gimona, A., Hawkey, C. J. TARGET Study Group. 2004. Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the therapeutic arthritis research and gastrointestinal event trial (TARGET), reduction in ulcer complications: randomised controlled trial. *Lancet* 364. 665 – 674.
- Schumann, U., Subramani, S. 2008. Special delivery from mitochondria to peroxisomes. 2008. *Trends in Cell Biology* 18 (6). 253 – 256.
- Shibuya, N., Koike, S., Tanaka, M., Ishigami-Yusa, M., Kimura, Y., Ogasawara, Y., Fukui, K., Nagahara, N., Kimura, H. 2013. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nature Communications* 4. 1366.
- Singh, G., Fort, J. G., Goldstein, J. L., Levy, R. A., Hanrahan, P. S., Bello, A. E., Andrade-Ortega, L., Wallemark, C., Agrawal, N. M., Eisen, G. M., Stenson, W. F., Triadafilopoulos, G., SUCCESS-I Investigators. 2006. Celecoxib versus naproxen and diclofenac in osteoarthritis patients: SUCCESS-I study. *The American Journal of Medicine* 119. 255 – 266.
- Sivakumaran, V., Stanley, B. A., Tocchetti, C. G., Ballin, J. D., Caceres, V., Zhou, L., Keceli, G., Rainer, P. P., Lee, D. I., Huke, S., Ziolo, M. T., Kranias, E. G., Toscano, J. P., Wilson, G. M., O'Rourke, B., Kass, D. A., Mahaney, J. E., Paolocci, N. 2013. HNO enhances SERCA2a

activity and cardiomyocyte function by promoting redox-dependent phospholamban oligomerization. *Antioxidants & Redox Signaling* 19 (11). 1185 – 1197.

Snijder, P. M., de Boer, R. A., Bos, E. M., van den Born, J. C., Ruifrok, W-P., T., Vreeswijk-Baudoin, I., van Dijk, M., Hillebrands, J-L., Leuvenink, H., G., D., van Goor, H. 2013. Gaseous hydrogen sulfide protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice partially independent from hypometabolism. *PLoS ONE* 8. e63291.

Sparatore, A., Santus, G., Giustarini, D., Rossi, R., Del Soldato, P. 2011. Therapeutic potential of new hydrogen sulfide-releasing hybrids. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 4. 109 – 121.

Srilatha, B., Adaikan, P. G., Li, L., Moore, P. K.. 2007. Hydrogen sulphide: a novel endogenous gasotransmitter facilitates erectile function. *The Journal of Sexual Medicine* 4 (5). 1304 – 1311.

Stipanuk, M. H. 2004. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annual Review of Nutrition* 24. 539 – 577.

Szabo, C., Coletta, C., Chao, C., Módis, K., Szczesny, B., Papapetropoulos, A., Hellmich, M. R. 2013. Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine- β -synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 110(30). 12474 – 12479.

Szabó, G., Veres, G., Radovits, T., Gerő, D., Módis, K., Miesel-Gröschel, C., Horkay, F., Karck, M., Szabó, C. 2011. Cardioprotective effects of hydrogen sulfide. *Nitric Oxide* 25. 201 – 210.

Tang, G., Wu, I., Liang, W., & Wang, R. 2005. Direct stimulation of K_{ATP} channels by exogenous and endogenous hydrogen sulphide in vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology* 68 (6). 1757 – 1764

- Teague, B., Asiedu, S., Moore, P. K. 2002. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide *in vitro*: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *British Journal of Pharmacology* 137 (2). 139 – 145.
- Teng, H., Wu, B., Zhao, K., Yang, G., Wu, L., Wang, R. 2013. Oxygen-sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine-synthase mediated by Lon protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 110 (31). 12679 – 12684.
- Tripatara, P., Patel, N. S. A, Collino, M., Gallicchio, M., Kieswich, J., Castiglia, S., Benetti, E., Stewart, K. N., Brown, P. A., Yaqoob, M. M., Fantozzi, R., Thiemermann, C. 2008. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gamma-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. *Laboratory Investigation* 88. 1038 – 1048.
- Ubuka, T., Yuasa, S., Ishimoto, Y., Shimomura, M. 1977. Desulfuration of L-cysteine through transamination and transsulfuration in rat liver. *Physiological Chemistry and Physics* 9. 241 – 246.
- Veeranki, S., Tyagi, S. C. 2013. Defective homocysteine metabolism: potential implications for skeletal muscle malfunction, *International Journal of Molecular Sciences* 14. 15074 – 15091.
- Veeranki S., Tyagi, S. C. 2015. Role of hydrogen sulfide in skeletal muscle biology and metabolism. *Nitric Oxide* 46. 66 – 71.
- Wallace, J. L. 2007. Hydrogensulfide-releasing anti-inflammatory drugs. *Trends in Pharmacological Sciences* 28. 501 – 505.
- Wang, M., Guo, Z., Wang, S. 2014. Regulation of cystathionine γ -lyase in mammalian cells by hypoxia. *Biochemical Genetics* 52. 29–37
- Wang, R. 2012. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological Reviews* 92. 791 – 896.

- Whiteman, M., Armstrong, J. S., Chu, S. H., Jia-Ling, S., Wong, B. S., Cheung, N. S., Halliwell, B. 2004. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? *Journal of Neurochemistry* 90, 765 – 768.
- Whiteman, M., Cheung, N. S., Zhu, Y. Z., Chu, S. H., Siau, J. L., Wong, B. S., Armstrong, J. S. 2005. Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326. 794 – 798.
- Whiteman, M., Li, L., Kostetski, I., Chu, S. H., Siau, J. L., Bhatia, M., Moore, P. K. 2006. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343. 303 – 310.
- Wu, L., Wang, R. 2005. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacological Reviews* 57. 585 – 630.
- Xu, Z., Prathapasinghe, G., Wu, N., Hwang, S-Y., Siow, Y. L., O, K. 2009. Ischemia-reperfusion reduces cystathionine-beta-synthase-mediated hydrogen sulfide generation in the kidney. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 297. F27 – F35.
- Yanfei, W., Lin, S., Junbao, D., Chaoshu, T. 2006. Impact of Larginine on hydrogen sulfide/cystathionine- γ -lyase pathway in rats with high blood flow-induced pulmonary hypertension. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345. 851 – 857.
- Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A. K., Mu, W., Zhang, S., Snyder, S. H., Wang, R. 2008. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. *Science* 322. 587 – 590.
- Yang, W., Yang, G., Jia, X., Wu, L., Wang, R. 2005. Activation of K_{ATP} channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *The Journal of Physiology* 569 (Pt 2). 519 – 531.

- Yong, Q. C., Hu, L. F., Wang, S., Huang, D., Bian, J. S. 2010. Hydrogen sulfide interacts with nitric oxide in the heart: possible involvement of nitroxyl. *Cardiovascular Research* 88 (3). 482 – 491.
- Yusuf, M., Kwong Huat, B. T., Hsu, A., Whiteman, M., Bhatia, M., Moore, P. K. 2005. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333 (4). 1146 – 1152.
- Zhang, H., Hegde, A., Ng, S. W., Adhikari, S., Moochhala, S. M., Bhatia, M. 2007a. Hydrogen sulfide up-regulates substance P in polymicrobial sepsis-associated lung injury. *The Journal of Immunology* 179. 4153 – 4160.
- Zhang, H., Zhi, L., Moochhala, S. M., Moore, P. K., Bhatia, M. 2007b. Endogenous hydrogen sulfide regulates leukocyte trafficking in cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Journal of Leukocyte Biology* 82. 894 – 905.
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., Wang, R. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *The EMBO Journal* 20 (21). 6008 – 6016.
- Zhao, Y., Wang, H., Xian, M. 2011. Cysteine-activated hydrogen sulfide (H₂S) donors. *Journal of the American Chemical Society* 133. 15 – 17.
- Zheng, Y., Ji, X., Ji, K., Wang, B. 2015. Hydrogen sulfide prodrugs – a review. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5 (5). 367 – 377.
- Zhi, L., Ang, A. D., Zhang, H., Moore, P. K., Bhatia, M. 2007. Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF- κ B pathway. *Journal of Leukocyte Biology* 81. 1322 – 1332.
- Zhou, Z., von Wantoch Rekowski, M., Coletta, C., Szabo, C., Bucci, M., Cirino, G., Topouzis, S., Papapetropoulos, A., Giannis, A. 2012. Thioglycine and L-thiovaline: biologically active H₂S donors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20. 2675 – 2678.

Zhu, J. X. G., Kalbfleisch, M., Yang, Y. X., Bihari, R., Lobb, I., Davison, M., Mok, A., Cepinskas, G., Lawandy, A. R., Sener, A. 2012. Detrimental effects of prolonged warm renal ischaemia-reperfusion injury are abrogated by supplemental hydrogen sulphide: an analysis using real-time intravital microscopy and polymerase chain reaction. *BJU International* 110. E1218 – E1227.