

IN DEPTH REVIEW

# L'idrogeno solforato nell'insufficienza renale cronica



**Alessandra Fortunata Perna**<sup>1</sup>, Diana Lanza<sup>1</sup>, Immacolata Sepe<sup>1</sup>, Annarita Di Nunzio<sup>1</sup>, Giovanni Conzo<sup>2</sup>, Ersilia Satta<sup>1</sup>, Giovanbattista Capasso<sup>1</sup>, Diego Ingrosso<sup>3</sup>

(1) Prima Cattedra di Nefrologia, Dipartimento di Scienze Cardio-toraciche e Respiratorie, Seconda Università di Medicina, Napoli

(2) VII Divisione di Chirurgia Generale ed Endocrina, Seconda Università di Napoli, Facoltà di Medicina, Napoli

(3) Dipartimento di Biochimica Biofisica e Patologia Generale, Seconda Università di Medicina, Napoli

## Abstract

L'idrogeno solforato, o acido solfidrico (H<sub>2</sub>S), è un gas prodotto a livello endogeno che svolge una funzione protettiva in diversi importanti processi biologici, quali ad esempio l'infiammazione, la regolazione della pressione arteriosa, e il metabolismo energetico. Gli enzimi coinvolti nella sua produzione sono la cistationina β-sintetasi, la cistationina γ-liasi e la 3-mercaptopyruvato sulfurtransferasi. Nell'insufficienza renale cronica (IRC), livelli plasmatici bassi di H<sub>2</sub>S sono stati trovati, sia nel modello murino che nell'uomo. I meccanismi che portano al deficit di H<sub>2</sub>S nell'IRC sono da ricollegarsi alla ridotta espressione genica della cistationina γ-liasi. È ancora oggetto di studio se tale alterazione influenzi per esempio la progressione dell'IRC o la sindrome uremica, e soprattutto se interventi terapeutici indirizzati ad aumentare i livelli di H<sub>2</sub>S possano essere di beneficio dal punto di vista clinico.

Parole chiave: cisteina, idrogeno solforato, insufficienza renale cronica, ipertensione, omocisteina, uremia

## Vasodilatation Caused by Endogenous Hydrogen Sulfide in Chronic Renal Failure

Hydrogen sulfide, (H<sub>2</sub>S), is an endogenous gas which exerts a protective function in several biological processes, including those involved in inflammation, blood pressure regulation, and energy metabolism. The enzymes involved in H<sub>2</sub>S production are cystathionine β-synthetase, cystathionine γ-lyase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. Low plasma H<sub>2</sub>S levels have been found in chronic renal failure (CRF) in both humans and animal models. The mechanisms leading to H<sub>2</sub>S deficiency in CRF are linked to reduced gene expression of cystathionine γ-lyase. Intense research is currently under way to discover the link between low H<sub>2</sub>S levels, CRF progression and the uremic syndrome and to determine whether therapeutic interventions aimed at increasing H<sub>2</sub>S levels might benefit these patients.

Key words: chronic renal failure, cysteine, homocysteine, Hydrogen sulfide, hypertension

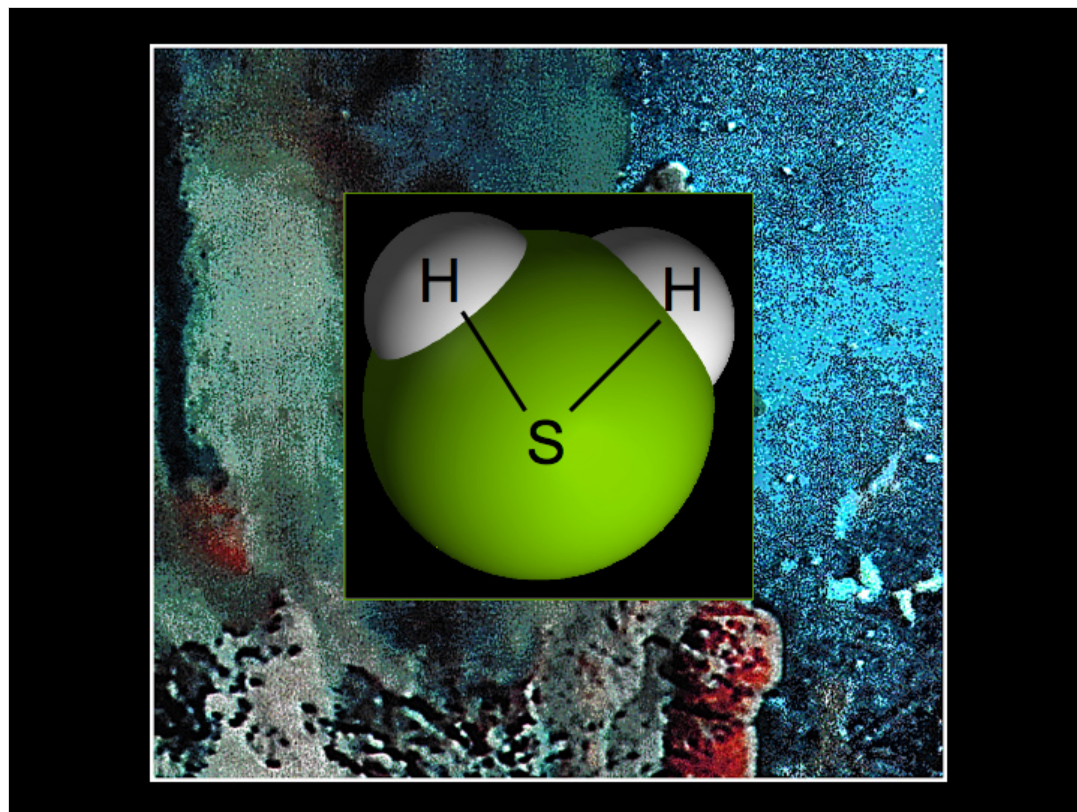
## L'idrogeno solforato: introduzione

L'idrogeno solforato (o acido solfidrico, H<sub>2</sub>S, figura 1) è un gas tossico noto per il suo tipico odore di uova marce. Ad alte concentrazioni (oltre 100-150 ppm) paralizza il nervo olfattivo rendendo impossibile la percezione del suo sgradevole odore, causando poi incoscienza nell'arco di pochi minuti. Le esalazioni di H<sub>2</sub>S possono quindi determinare la morte (oltre

300 ppm), ad esempio laddove è presente materiale organico in decomposizione (sono stati riportati decessi per inalazione di  $H_2S$  provenienti da alghe su di una spiaggia) o in impianti petroliferi e industriali. Tuttavia, bisogna considerare che una teoria oggi molto accreditata afferma che la vita stessa è iniziata con la capacità di tollerare e poi di produrre  $H_2S$  per generare energia (per es, nei camini idrotermali sul fondo oceanico si sono sviluppate forme di vita con tali caratteristiche). Durante l'estinzione nel Permiano, quando i livelli di ossigeno erano molto bassi, i solfobatteri verdi riuscirono a sopravvivere consumando e producendo  $H_2S$ . Le specie che si sono sviluppate in seguito sono state comunque quelle in grado di generare  $H_2S$  in piccole quantità. In particolare, una classe di vertebrati che si è evoluta molto più tardi, i mammiferi, ha mantenuto questa capacità [1], [2].

L' $H_2S$  rappresenta dunque il terzo gasotrasmettitore, dopo l'ossido di azoto e monossido di carbonio; le osservazioni di Yang *et al* [3] (full text) hanno recentemente generato un grande interesse per lo studio delle sue proprietà in fisiologia e in alcuni stati patologici. Questi ricercatori hanno dimostrato che, in topi recanti la delezione della cistationina  $\gamma$ -lasi, (cistationinasi, CSE; EC 4.4.1.1), uno degli enzimi in grado di generare  $H_2S$ , quest'ultimo diminuisce consistentemente nel plasma e nei tessuti, e tali topi sono caratterizzati da ipertensione dipendente dall'età e da un'alterata vasodilatazione endotelio-dipendente.

L' $H_2S$  è un acido debole, è cinque volte più solubile in solventi lipofilici che in acqua ed è in grado di attraversare le membrane per semplice diffusione, senza che vi sia la necessità della presenza di recettori di membrana come facilitatori [4] (full text). È stata però riportata la presenza di un canale ionico permeabile all'idrosolfito,  $HS^-$ , nei batteri [5]. In soluzione acquosa, esiste nell'equilibrio:  $H_2S \leftrightarrow HS^- + H^+ \leftrightarrow S^{2-} + 2H^+$ . Nel plasma e nei fluidi extracel-



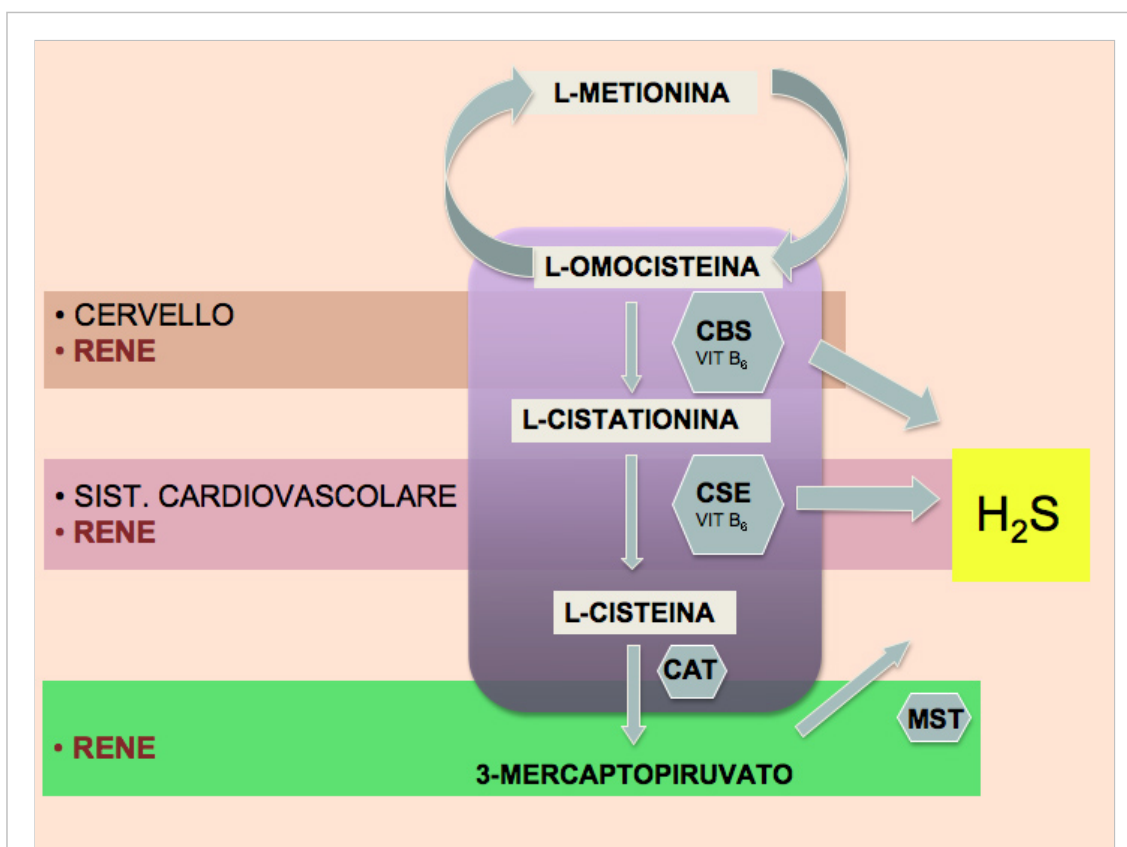
**Figura 1.** Sorgenti idrotermali e  $H_2S$ . I camini idrotermali sottomarini (foto sullo sfondo) rappresentano una fonte naturale d'origine dell' $H_2S$  di cui è riportata la formula di struttura, con la relativa raffigurazione tridimensionale.

lulari, è presente come  $H_2S$  per il <20% del totale e ~80% come  $HS^-$ . La forma non dissociata,  $H_2S$ , è volatile.

Tre enzimi catalizzano la formazione di  $H_2S$  (figura 2): la cistationina  $\beta$ -sintasi (CBS, EC 4.2.1.22), la cistationina  $\gamma$ -liasi (CSE) e la 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasi (MPST, EC 2.8.1.2).

Questi enzimi sono presenti nei vari organi e tessuti a diversi livelli. In fegato, rene, enterociti, fibrocellule muscolari lisce vascolari e cellule endoteliali, l' $H_2S$  è sintetizzato dalla CSE, mentre nel cervello la sua produzione è attribuibile principalmente alla CBS (figura 2). Inoltre, la MPST è presente a livello cardiaco, renale e cerebrale e nell'endotelio vascolare. Tuttavia, il suo contributo alla produzione totale di  $H_2S$  è limitato, anche perché è necessaria la presenza di un agente riducente [6], [7], [8] (full text). In generale, nel sistema cardiovascolare e nel rene l' $H_2S$  viene prodotto principalmente dalla CSE [9], [10].

La CBS catalizza la formazione di cistationina ed acqua mediante la condensazione di serina e omocisteina (Hcy), una reazione chiave irreversibile nella via della transulfurazione. Questa via è collegata al ciclo metionina-omocisteina attraverso l'Hcy. Inoltre, è stato dimostrato che la CBS può catalizzare la formazione di cistationina e  $H_2S$  mediante la condensazione di cisteina (Cys) e Hcy come substrati alternativi [11] (full text).



**Figura 2.** Biosintesi dell' $H_2S$ : enzimi coinvolti e relativa localizzazione tissutale. La via biosintetica utilizza alternativamente i due enzimi della transulfurazione (sfondo viola), la CBS o la CSE. Un terzo sistema enzimatico è rappresentato dall'azione combinata di CAT ed MST i quali danno luogo alla formazione dell' $H_2S$ , attraverso la formazione dell'intermedio 3-mercaptopiruvato. La prevalente distribuzione tissutale dei 3 sistemi enzimatici rispetto alla biosintesi dell' $H_2S$  è indicata in vari colori. Il rene possiede una significativa attività di tutti e tre i sistemi enzimatici biosintetici. CBS: cistationina- $\beta$ -sintasi; CSE: cistationina- $\gamma$ -liasi; CAT: cisteina  $\alpha$ -chetoglutarato aminotransferasi (cisteina transaminasi); MST: mercaptopiruvato sulfurtransferasi.

La CSE catalizza la conversione della cistationina a Cys nella via della transulfurazione. Inoltre, catalizza la formazione di H<sub>2</sub>S in una reazione che utilizza la Cys, producendo piruvato, ammoniaca e tiocisteina, la quale a sua volta si decompone in Cys e H<sub>2</sub>S [9]. Sono state riportate anche altre reazioni alternative [12] (full text). L'attività della CSE è regolata dal complesso calcio-calmodulina [3] (full text).

La vitamina B<sub>6</sub> è necessaria sia per l'attività della CBS che della CSE sottoforma del suo cofattore piridossalfosfato. La MPST catalizza la formazione di H<sub>2</sub>S dal 3-mercaptopiruvato, un metabolita della Cys, oppure può trasferire l'atomo di zolfo al solfito (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), che forma tiosolfato (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>). La Cys formata dalla CSE può quindi agire come accettore dello zolfo trasferito dal 3-mercaptopiruvato mediante la MPST [13], [14].

L'H<sub>2</sub>S si forma anche per via non enzimatica dallo zolfo elementare e da polisolfuri inorganici e organici. Sembra che le proprietà antiipertensive dell'aglio siano dovute proprio al rilascio di tali composti [15] (full text).

L'emivita dell'H<sub>2</sub>S nel plasma è inferiore ai 30 minuti [16]. Per quanto riguarda il suo catabolismo, l'H<sub>2</sub>S, oltre ad essere presente in forma libera o legata alla sulfemoglobina nella circolazione sanguigna, è anche ossidata intracellularmente a tiosolfato, poi a solfito e a solfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). È anche metilato a metantiolo e dimetilsolfuro, mentre nell'intestino una rodanasi catalizza la formazione di tiocianato. Essendo un agente riducente, l'H<sub>2</sub>S reagisce con perossinitrito, superossido e altre specie ossidanti [16].

Il dosaggio dell'H<sub>2</sub>S nel sangue è attualmente effettuato sia attraverso la misurazione spettrofotometrica della formazione di blu di metilene sia con metodi elettrochimici. È stato recentemente affermato che in realtà questi dosaggi misurano non solo la forma libera dell'H<sub>2</sub>S, ma anche le sue frazioni legate alle proteine ed quelle acido-labili. A causa di tali problemi metodologici, la concentrazione plasmatica normale di H<sub>2</sub>S è dibattuta [17]. Inoltre, dato che l'H<sub>2</sub>S aderisce sia al vetro che alla gomma, particolare importanza viene attribuita all'utilizzo di tubi in plastica. In un recente articolo, Shen *et al* [18] ha proposto un metodo più sensibile e in grado di misurare tutte le forme di H<sub>2</sub>S.

## Meccanismo d'azione

È stato ipotizzato che gli effetti principali dell'H<sub>2</sub>S (inteso come quantità totale di H<sub>2</sub>S, sia dissociato che indissociato) siano dovuti alla S-sulfidrazione delle proteine, mediata dall'HS<sup>-</sup>, che si verifica a livello dei residui di Cys, che porta alla formazione di persolfuri (gruppi -SSH, [19] (full text)). Per esempio, la sulfidrazione della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, è in grado di migliorarne notevolmente l'attività. Inoltre, l'H<sub>2</sub>S migliora la polimerizzazione dell'actina [19].

Nel tessuto aortico di topo si trovano livelli molto elevati di H<sub>2</sub>S libero rispetto ai livelli presenti in altri tessuti; è stato dunque proposto che l'H<sub>2</sub>S in forma libera media le sue funzioni vasoattive, mentre in altri tessuti un meccanismo di tipo recettoriale modula la sua attività [20], e si può ipotizzare che questo meccanismo coinvolga la S-sulfidrazione delle proteine. È stato inoltre dimostrato che l'H<sub>2</sub>S agisce sia nel sistema cardiovascolare che in altri sistemi, riconoscendo sia la guanosina monofosfato ciclico che l'adenosina monofosfato ciclico come secondo messaggero [21] (full text).

## H<sub>2</sub>S: modulatore dei processi di ossidazione, apoptosi ed infiammazione

In generale, l'H<sub>2</sub>S è un agente protettivo nei processi di ossidazione, infiammazione e apoptosi, tutti eventi che costituiscono il substrato di malattie acute e croniche, quali l'ischemia-riperfusion (I/R), l'ipertensione polmonare, l'aterosclerosi, la progressione dell'IRC e le sue complicanze [1], [2], [14].

Ad esempio, l'H<sub>2</sub>S esercita effetti anti-aterosclerotici attraverso l'inibizione della proliferazione delle fibrocellule muscolari lisce vascolari e la promozione della proliferazione delle cellule endoteliali [22]. In topi *knockout* per l'apolipoproteina E [23] (full text), il trattamento con NaHS, un donatore di H<sub>2</sub>S, è in grado di ridurre le dimensioni della placca. L'H<sub>2</sub>S inoltre previene l'attivazione endoteliale indotta dal Fattore di Necrosi Tumorale-alfa (TNF- $\alpha$ ). Il meccanismo di tale effetto protettivo è mediato in parte dalla riduzione dell'attivazione di ADAM17, un importante metalloproteinasi che catalizza il rilascio di diverse molecole infiammatorie e citochine (figura 3) [24].

L'H<sub>2</sub>S è un antiossidante, infatti aumenta la concentrazione di glutatione ridotto nei neuroni [25] (full text), e funge da *scavenger* per gli anioni superossido, perossido di idrogeno [26] e perossinitrito [27] inibendo lo stress ossidativo. Recentemente, Yang *et al* [28] (full text) ha studiato gli effetti citoprotettivi dell'H<sub>2</sub>S in cellule HaCaT trattate con cloruro di cobalto (CoCl<sub>2</sub>), un noto agente che mima l'ipossia/ischemia, e che induce stress ossidativo e infiammazione. Le cellule HaCaT derivano dalla trasformazione spontanea dei cheratinociti

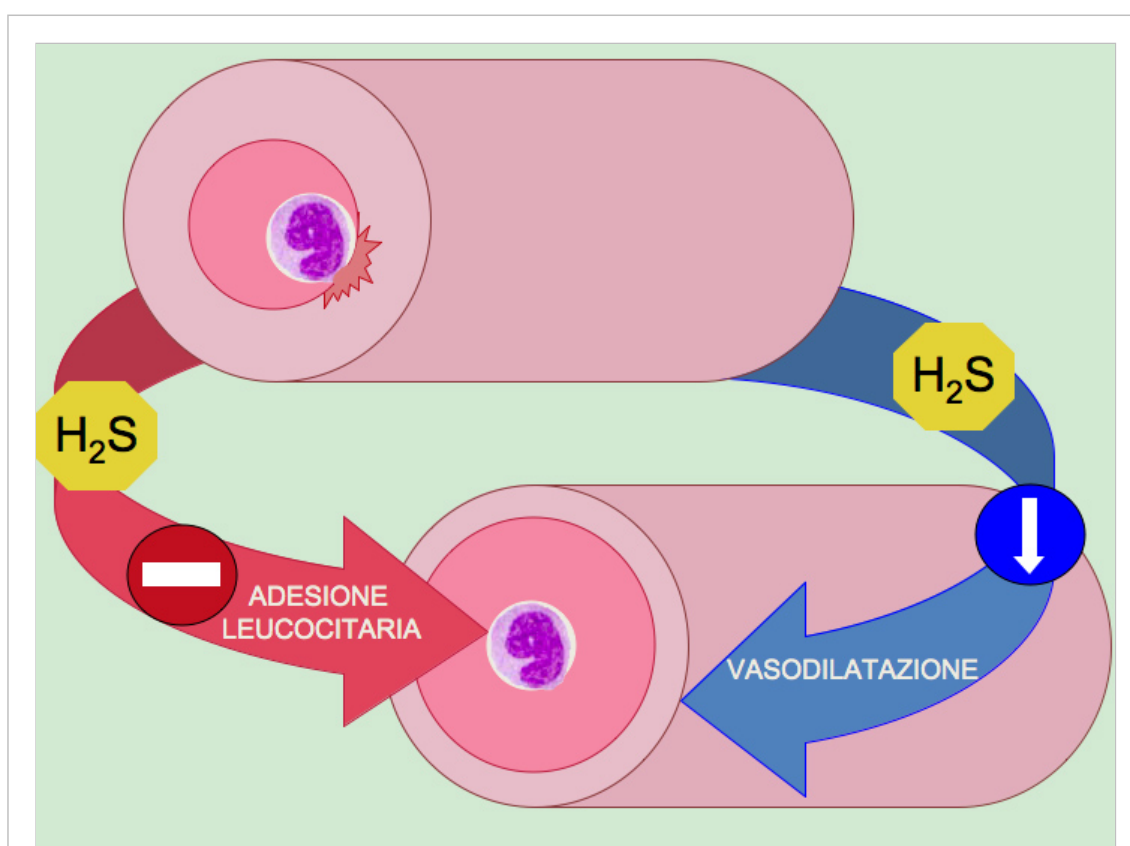


Figura 3.

Effetti vascolari dell'H<sub>2</sub>S. Tali effetti comprendono: vasodilatazione e inibizione dell'adesione e della migrazione leucocitaria, con conseguente prevenzione della formazione della placca aterosclerotica. I simboli circolari dello stesso colore delle frecce indicano inibizione (rosso) o stimolazione (blu), rispettivamente.



umani adulti. Yang ha dimostrato che l'H<sub>2</sub>S protegge le cellule HaCaT dall'insulto indotto dal CoCl<sub>2</sub> e dalla risposta infiammatoria, inibendo il *pathway* NF-κB/COX-2 attivato dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Per quanto riguarda l'infiammazione, in letteratura ci sono dati contrastanti che dimostrano effetti sia pro- che anti-infiammatori dell'H<sub>2</sub>S, il che si spiega probabilmente in base a differenze nella concentrazione di H<sub>2</sub>S nei modelli utilizzati. Recentemente, Pan *et al* [29] (full text) ha dimostrato che nelle cellule endoteliali provenienti da vena ombelicale umana (HUVEC), l'H<sub>2</sub>S è in grado di sopprimere l'espressione di Molecola di Adesione Intracellulare-1 (ICAM-1) e della Molecola di Adesione Cellulare Vascolare (VCAM-1), indotta dal TNF-α, e di inibire l'adesione endoteliale della linea monocitoide U937, attraverso un meccanismo che coinvolge l'up-regolazione dell'enzima citoprotettivo eme ossigenasi-1.

Uno studio recente ha inoltre dimostrato che il trattamento con NaHS (10-1000 μM) per 20 minuti potrebbe proteggere le HUVEC ed i fibroblasti (3T3s) dall'apoptosi indotta dall'I/R [30].

Un lavoro di Calvert *et al* [31] (full text) ha valutato i potenziali meccanismi di cardioprotezione mediata dall'H<sub>2</sub>S, utilizzando un modello *in vivo* di preconditionamento farmacologico. Durante il periodo iniziale di preconditionamento, l'H<sub>2</sub>S aumenta la localizzazione nucleare di Nrf2, un fattore di trascrizione che regola l'espressione del gene di una serie di antiossidanti, e aumenta la fosforilazione della proteina chinasi Cε e di STAT-3. Durante il periodo tardivo di preconditionamento, l'H<sub>2</sub>S aumenta l'espressione di antiossidanti (eme ossigenasi-1 e tioredossina 1), aumenta l'espressione della proteina heat shock 90, 70, Bcl-2, Bcl-xL, e della cicloossigenasi-2 e inoltre inattiva il proapoptogeno Bad. Questi risultati rivelano che gli effetti cardioprotettivi dell'H<sub>2</sub>S sono mediati in gran parte da una combinazione di antiossidanti e *signaling* antiapoptotici, in cui è coinvolto Nrf2.

## Effetti cardiovascolari dell'H<sub>2</sub>S e controllo della pressione arteriosa

L'H<sub>2</sub>S esercita un'azione cardioprotettiva in diversi modelli di danno cardiaco, come l'I/R e lo scompenso cardiaco [32] (full text) [33], [34]. L'H<sub>2</sub>S è anche in grado di ridurre la pressione arteriosa nel ratto e di indurre vasodilatazione in vasi sanguigni isolati (figura 3, figura 4) [34], [35] (full text). I suoi effetti sono mediati dall'apertura dei canali del potassio ATP-dipendenti nelle fibrocellule muscolari lisce vascolari, indipendentemente dai recettori di membrana, e in parte attraverso la conduttanza al K<sup>+</sup> nelle cellule endoteliali [35] (full text). Anche altri canali sono coinvolti, rendendo l'H<sub>2</sub>S un agente multicanale [36] (full text). Infatti, l'H<sub>2</sub>S attiva anche i canali del potassio attivati dal Ca<sup>2+</sup> ad elevata conduttanza [37] (full text).

Nel sistema vascolare di ratti spontaneamente ipertesi è stata rilevata una bassa produzione di H<sub>2</sub>S, e la sua somministrazione abbassa la pressione sanguigna, mentre la somministrazione cronica di un inibitore della CSE induce ipertensione arteriosa [34], [35] (full text). Come già menzionato, in topi *knockout* per CSE, l'H<sub>2</sub>S è marcatamente ridotto nel siero ed in molti tessuti; inoltre, sono presenti una marcata ipertensione che aumenta con l'età ed una ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente [3] (full text). I topi mutanti mostrano iperomocistinememia e bassi livelli di Cys, come conseguenza del blocco metabolico a livello della CSE. Inoltre, in questo modello, l'ipertensione non è conseguenza di alterazioni della funzione cerebrale o renale, che sono state trovate inalterate. Uno studio osservazionale in pazienti con malattia coronarica, ipertesi e fumatori, ha dimostrato che l'H<sub>2</sub>S nel plasma

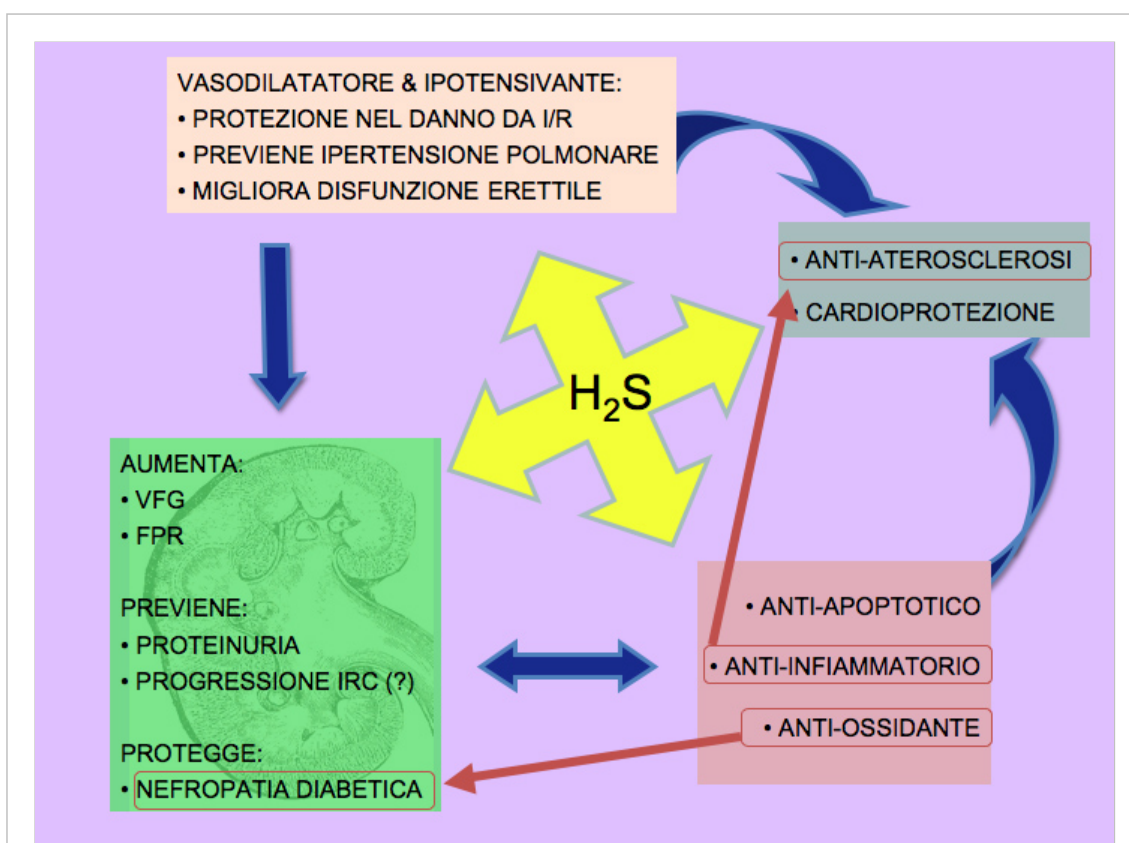
è inferiore rispetto ai soggetti normali [38] (full text). Bassi livelli di H<sub>2</sub>S sono stati trovati anche in uno studio condotto su bambini ipertesi [39] (full text).

## H<sub>2</sub>S e rene

L'H<sub>2</sub>S viene prodotto nel rene dall'azione combinata di CBS e CSE, presenti soprattutto nel tubulo prossimale, ed anche dalla MPST (figura 2).

L'H<sub>2</sub>S influenza sia il tubulo renale che il sistema vascolare (figura 4). La somministrazione simultanea in bolo di due inibitori rispettivamente della CBS e della CSE, l'acido aminoosiacetico e la propargilglicina, diminuisce la velocità di filtrazione glomerulare (VFG) e l'escrezione del sodio e del potassio, mentre tali parametri vengono aumentati dall'infusione di H<sub>2</sub>S o Cys [40] (full text). Infatti, l'H<sub>2</sub>S iniettato nell'arteria renale aumenta il flusso sanguigno renale e la VFG. L'H<sub>2</sub>S ha pertanto un effetto diuretico, natriuretico e kaliuretico. Questi dati sul flusso plasmatico renale e la VFG indicano che l'H<sub>2</sub>S produce una vasodilatazione più evidente a livello delle arteriole pre-glomerulari più che delle post-glomerulari.

In un altro studio [41], tuttavia, i ratti trattati cronicamente sia con acido aminoosiacetico che con propargilglicina per 4 settimane hanno dimostrato un aumento della pressione sanguigna, ma la VFG non veniva alterata, mentre il flusso sanguigno renale risultava ridotto. Il volume urinario e l'escrezione di sodio aumentavano, mentre il flusso sanguigno corticale



**Figura 4.**  
H<sub>2</sub>S e patologia renale. Schema riassuntivo delle principali proprietà dell' H<sub>2</sub>S e dei suoi effetti su organi e tessuti e le relative implicazioni fisiopatologiche particolarmente in campo nefrologico. Le frecce in colore blu mettono in relazione le vari azioni suddivise per gruppi omogenei, rispetto all'organo o sistema bersaglio. Le frecce sottili in rosso sottolineano alcune relazioni di causa-effetto di particolare importanza in patologia renale e cardiovascolare. I/R: ischemia/riperfusion; VFG: velocità di filtrazione glomerulare; FPR: Flusso plasmatico renale.

e midollare erano ridotti. Questi esperimenti indicano che vi sono riduzioni proporzionali delle resistenze vascolari, sia a livello delle arteriole afferenti che nelle efferenti. Pertanto, il deficit cronico di H<sub>2</sub>S sembra causare un aumento delle resistenze vascolari con conseguente vasocostrizione renale ed ipertensione sistemica.

Poiché l'H<sub>2</sub>S viene ossidato a livello mitocondriale in modo pO<sub>2</sub>-dipendente e la pO<sub>2</sub> è fisiologicamente bassa nella midollare renale, è stato proposto che l'H<sub>2</sub>S sia un sensore per l'ossigeno che riequilibra l'O<sub>2</sub> stesso aumentando il flusso sanguigno midollare, riducendo contestualmente il fabbisogno energetico per il trasporto tubulare e inibendo la respirazione mitocondriale [42] (full text). Come suggerito da Aminzadeh e Vaziri [43], poiché la progressione della malattia renale potrebbe essere mediata in parte dall'ipossia midollare, bassi livelli di H<sub>2</sub>S potrebbero contribuire in questo modo a tale manifestazione patologica.

Bisogna però aggiungere che i topi ipertesi CSE<sup>-/-</sup> dello studio di Yang *et al* [3] (full text) non sviluppano danno renale, perlomeno da quanto emerge dagli studi istologici effettuati a 10-12 settimane, e ciò contrasta con l'ipotesi che questo gas sia coinvolto nella progressione della malattia renale.

In un modello di ipertensione renale vascolare nel ratto "two-kidney one-clip", l'H<sub>2</sub>S esogeno riduce la pressione sanguigna, l'attività reninica plasmatica e la concentrazione dell'angiotensina II (ma non influisce sull'attività nel plasma dell'enzima convertitore dell'angiotensina) e inibisce l'up-regolazione dell'RNA messaggero della renina [44] (full text).

Zavaczki *et al* [45] ha dimostrato che l'H<sub>2</sub>S inibisce la calcificazione e la differenziazione in osteoblasti delle fibrocellule muscolari lisce vascolari, un processo coinvolto nella progressione e nella mortalità cardiovascolare dei pazienti in IRC.

Sen *et al* ha utilizzato un modello di iperomocisteinemia (topi eterozigoti CBS<sup>+/-</sup>) sottoposti ad uninefrectomia, un modello che simula l'IRC, e ha dimostrato che gli animali erano proteinurici e l'H<sub>2</sub>S plasmatico era diminuito. Nel tessuto corticale renale erano inoltre presenti sia un'aumentata attività delle metalloproteinasi di matrice 2 e 9 sia l'apoptosi, un aumento della desmina e una down-regolazione della nefrina, nonché un'aumentata produzione di ione superossido ed un diminuito rapporto del glutatione ridotto/ossidato. Si è poi osservato che la supplementazione di H<sub>2</sub>S era in grado di prevenire la proteinuria, di attenuare l'attività della metalloproteinasi di matrice 2, di ridurre l'apoptosi, il rapporto glutatione ridotto/ossidato e la produzione di ROS (figura 4) [46] (full text). Questi risultati dimostrano che il danno renale associato all'iperomocisteinemia è correlato alla ridotta produzione endogena di H<sub>2</sub>S. Pertanto, questo lavoro fornisce la prova che la supplementazione di H<sub>2</sub>S (ottenuta mediante somministrazione di NaHS nel ratto) previene il danno renale associato all'iperomocisteinemia, in parte attraverso le sue proprietà antiossidanti. In questo stesso modello, Sen *et al* [47] ha dimostrato che l'H<sub>2</sub>S up-regola le molecole di adesione e i mediatori dell'infiammazione e riduce l'infiltrazione macrofagica, la fibrosi interstiziale e la glomerulosclerosi.

Sen *et al* ha inoltre dimostrato che il doppio trasferimento genico di CBS e CSE migliora l'infiammazione delle cellule mesangiali mediata dall'Hcy. L'iperomocisteinemia causa l'up-regolazione della proteina chemiotattica per i monociti 1 (MCP-1) e la proteina infiammatoria macrofagica 2 (MIP-2) nelle cellule mesangiali, riducendo la produzione di H<sub>2</sub>S. L'over-espressione dei due enzimi attenua la risposta di queste due molecole infiammatorie, aumentando la produzione di H<sub>2</sub>S attraverso la chinasi extracellulare regolata dal segnale (ERK1/2) e i pathway dipendenti dalla chinasi NH<sub>2</sub>terminale c-Jun (JNK1/2) [48] (full text).



Il ruolo antiossidante dell'H<sub>2</sub>S è stato ulteriormente messo in evidenza da un recente studio di Untereiner *et al.* L'H<sub>2</sub>S ha proprietà citoprotettive nei confronti del metilgliosale, un metabolita reattivo del glucosio associato al diabete e all'ipertensione [49] (full text). In questo lavoro condotto su topi CSE<sup>-/-</sup>, si è visto che un'aumentata produzione di metilgliosale a livello renale (prodotto di glicosilazione avanzata e pro-ossidante coinvolto nella patogenesi della nefropatia diabetica) è dovuta ad una *down*-regolazione mediata dall'H<sub>2</sub>S del pathway di PGC-1-alpha. Questo ha sottolineato l'importanza dell'H<sub>2</sub>S nella regolazione del metabolismo del glucosio e della produzione del metilgliosale.

Il coinvolgimento dell'H<sub>2</sub>S nella nefropatia diabetica (figura 4) è stato inoltre messo in evidenza nel lavoro di Yuan *et al.*, dove gli autori hanno osservato, in un modello di ratto con diabete indotto da streptozotocina, una ridotta produzione di H<sub>2</sub>S e hanno mostrato che la somministrazione di NaHS, un donatore di H<sub>2</sub>S, riduceva l'incremento del fattore di crescita trasformante-beta (TGF-β1) e del collagene di tipo IV nel tessuto renale [50]. In presenza di alte concentrazioni di glucosio, l'espressione genica e proteica della CSE nelle cellule mesangiali renali è diminuita, mentre la proliferazione e la secrezione della matrice extracellulare sono aumentate. Il trattamento con l'NaHS blocca la proliferazione cellulare indotta dall'iperglicemia e inverte l'elevata sintesi del collagene IV. Inoltre, l'iperglicemia induce la generazione di ROS che a loro volta *up*-regolano TGF-β1, portando alla proliferazione delle cellule mesangiali e ad una eccessiva produzione di matrice extracellulare. Questo studio ha confermato che l'iperglicemia aumenta la produzione di ROS nelle cellule mesangiali e che l'NaHS è in grado di ridurre la produzione di ROS.

Nello studio di Lee *et al.* [51] (full text) gli autori hanno osservato che l'NaHS era in grado di ridurre, in colture di cellule epiteliali glomerulari, l'accumulo di matrice extracellulare, l'ipertrofia e la produzione di proteine indotta dalle elevate concentrazioni di glucosio grazie all'inibizione di mTORC1 (bersaglio della rapamicina nei mammiferi complesso 1) mediata dall'attivazione di AMPK.

## IRC e H<sub>2</sub>S: progressione e complicanze

L'IRC è caratterizzata da un'alta mortalità cardiovascolare. Mentre nella popolazione generale, il rischio cardiovascolare è diminuito negli ultimi decenni, nei pazienti con IRC ciò non si è osservato. Nuovi biomarcatori, capaci di predire il rischio e utili nella prevenzione della progressione della malattia, vengono attivamente ricercati. Tra questi, si possono annoverare vari metaboliti contenenti zolfo, quali gli aminoacidi tiolici Hcy e Cys e il tioetere S-adenosilomocisteina. Questi ultimi sono costantemente aumentati nella maggior parte dei pazienti con IRC, e soprattutto in quelli in emodialisi [52] (full text), [53]. Nel nostro contesto, l'Hcy e la Cys, o i loro diretti derivati, sono utilizzati come substrati per la biosintesi di H<sub>2</sub>S da parte degli enzimi chiave CBS, CSE e MPST.

L'H<sub>2</sub>S è diminuito nel plasma di pazienti sottoposti ad emodialisi, come noi abbiamo recentemente dimostrato [52] (full text). A riprova di ciò, bassi livelli di sulfoemoglobina nei globuli rossi (un *marker* putativo di esposizione cronica all'H<sub>2</sub>S), sono presenti in questa popolazione di pazienti, accompagnati da alti livelli plasmatici di Hcy e di Cys. L'espressione genica di CSE in cellule mononucleate del sangue è significativamente più bassa, realizzando una condizione in cui si verifica una *down*-regolazione trascrizionale del gene che codifica per questo enzima chiave nella produzione di H<sub>2</sub>S [52] (full text), [54].

L'espressione della MPST è stata trovata invece significativamente aumentata. A livello funzionale, la MPST è implicata nella detossificazione del cianuro, che si trasforma in tiocianato. È interessante notare che elevati livelli di cianuro e di tiocianuro si trovano nel

sangue di pazienti sottoposti ad emodialisi [55] (full text). Possiamo quindi ipotizzare che i livelli di espressione genica di questo enzima siano aumentati come meccanismo adattativo alla necessità di disporre dell'eccesso di cianuro plasmatico, tipico dell'IRC.

La riduzione della produzione di H<sub>2</sub>S, dovuta ad una ridotta espressione del gene per la CSE, può essere considerata una delle molteplici manifestazioni della sindrome da tossicità uremica e può essere a sua volta responsabile di alcune delle sue caratteristiche.

È possibile che una tossina uremica sia in grado di *down*-regolare gli enzimi che producono l'H<sub>2</sub>S, e probabilmente è l'Hcy stessa che funge da inibitore [56]. Chang *et al* [56] ha dimostrato che ciò è vero per la CSE. Chiku *et al* e Singh *et al*, nel loro accurato studio di cinetica enzimatica, hanno indicato che un aumento dell'Hcy sposta la produzione di H<sub>2</sub>S dalla CBS alla CSE [6], [12] (full text), [57] (full text). Questi dati, ottenuti mediante l'uso di enzimi ricombinanti purificati o con estratti di tessuto, hanno dimostrato che quando l'Hcy è utilizzata come unico substrato, la produzione di H<sub>2</sub>S generalmente diminuisce. Un altro possibile fattore ancora da indagare è il calcitriolo, attivo sulla CBS [58].

Aminzadeh e Vaziri [43] hanno utilizzato un classico modello di nefrectomia 5/6 nel ratto con IRC per studiare l'espressione proteica della CBS, della CSE e della MPST nel cervello, nel fegato e nel rene e la capacità di questi tessuti di produrre l'H<sub>2</sub>S a 6 e 12 settimane di età. Il gruppo IRC è fortemente proteinurico e iperteso a 12 settimane e presenta un importante stress ossidativo, misurato attraverso diversi marcatori. In particolare, gli autori hanno valutato i livelli dei prodotti finali della lipossidazione avanzata, compresi malondialdeide e altre sostanze tiobarbituriche acido-reattive. Essi hanno rilevato, inoltre, un aumento dei marcatori di ossidazione lipidica sia nel plasma che nel rene, accompagnato da un aumento del glutatione ossidato plasmatico, mentre è stata osservata una diminuzione nel glutatione ridotto. È presente inoltre una significativa *up*-regolazione dell'enzima che genera il superossido, NOX4, e una *down*-regolazione della glutammato-cisteina ligasi, l'enzima che catalizza il primo passo nella biosintesi del glutatione.

Questo modello si associa ad una riduzione della concentrazione plasmatica di H<sub>2</sub>S a 6 settimane e ad una riduzione significativa a 12 settimane. La capacità di produrre H<sub>2</sub>S a livello cerebrale non differisce dal controllo; tuttavia, tale capacità nel fegato e rene era ridotta a 6 settimane e ancora di più a 12 settimane. L'espressione proteica degli enzimi CBS, CSE e MPST, nel rene, è diminuita a 6 settimane, anche se solo per la CBS questo effetto è statisticamente rilevante; mentre a 12 settimane, tutti gli enzimi sono significativamente ridotti. È chiaro che l'enzima quantitativamente più importante nel rene, sia in condizioni normali che nell'IRC, è la CSE (di ~10 volte rispetto alla CBS). Ciò è stato confermato da altri studi recenti sui topi [6], dove la CSE è circa 20 volte più alta della CBS. Tuttavia, va considerato che quando si valuta il contributo di questi enzimi sotto una concentrazione del substrato saturante, la CBS è la principale fonte di H<sub>2</sub>S nel rene [6].

Nel fegato, sono presenti tutti e tre gli enzimi, ma nei ratti con IRC, la MPST non differisce dal controllo, mentre la CBS e la CSE sono significativamente ridotte sia a 6 che a 12 settimane. Questi risultati danno supporto al concetto che il deficit plasmatico di H<sub>2</sub>S è di natura sistemica, e sono conformi all'ipotesi della presenza di uno o più tossine uremiche che inibiscano l'espressione sia della CBS che della CSE. Tuttavia, non si può escludere che possano essere presenti anche delle modificazioni post-traduzionali [45].

Non tutti i dati sono a favore degli effetti benefici dell'H<sub>2</sub>S a livello renale. Infatti, è stato dimostrato che il trattamento con propargilglicina (inibitore della CSE), è in grado di ridurre il danno renale indotto dal cisplatino [59] (full text), e gli stessi risultati sono stati osservati con l'adriamicina [60]. Questi risultati contraddittori potrebbero, tuttavia, riflettere gli ef-

fetti pleiotropici della propargilglicina stessa, come ad esempio l'inibizione esercitata dalla propargilglicina su altri enzimi; inoltre, possono anche entrare in gioco effetti pleiotropici di alterazioni della concentrazione di H<sub>2</sub>S. Della Coletta Francescato *et al* [59] e Francescato *et al* [60], Wu *et al* [61] (full text) hanno dimostrato che, durante la I/R renale, l'espressione genica della CBS è ridotta. È stata inoltre osservata una significativa diminuzione dell'attività enzimatica della CBS, con conseguente aumento di Hcy e diminuzione dei livelli di H<sub>2</sub>S nel rene. Gli autori suggeriscono che questa è una misura protettiva per limitare il danno. Tuttavia, occorre notare, al riguardo, che la CBS è un enzima altamente regolato in quanto comprende un sensore per l'eme, viene attivato dalla S-adenosilmetionina, ed è anche fortemente dipendente dal piridossal-fosfato, tutte variabili che possono essere importanti. D'altra parte, per Tripatara *et al*, la produzione di H<sub>2</sub>S da parte della CSE è in grado di limitare il danno e la disfunzione renale da I/R [62] (full text) e l'espressione della CSE è aumentata dopo lo stesso danno da I/R [63]. Bos *et al* [64] (full text) ha inoltre dimostrato, nel topo, che l'ipometabolismo indotto dall'H<sub>2</sub>S previene il danno renale da I/R.

Infine, abbiamo recentemente dimostrato che, in un gruppo di 131 pazienti, i livelli di H<sub>2</sub>S aumentano in modo significativo dopo la dialisi, dando supporto all'idea che la dialisi elimini una tossina uremica che probabilmente inibisce gli enzimi che generano l'H<sub>2</sub>S [65].

Nell'IRC vi sono probabilmente meccanismi diversi che portano alla riduzione dell'H<sub>2</sub>S, ma ancora molto lavoro resta da fare anche riguardo al ruolo dell'H<sub>2</sub>S nella progressione della malattia renale.

*Gli Autori dichiarano di non avere conflitti di interesse.*

*Gli Autori dichiarano di non aver ricevuto sponsorizzazioni economiche per la preparazione dell'articolo.*

---

## Bibliografia

- [1] Gadalla MM, Snyder SH Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *Journal of neurochemistry* 2010 Apr;113(1):14-26
- [2] Olson KR The therapeutic potential of hydrogen sulfide: separating hype from hope. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 2011 Aug;301(2):R297-312
- [3] Yang G, Wu L, Jiang B *et al*. H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science (New York, N.Y.)* 2008 Oct 24;322(5901):587-90
- [4] Mathai JC, Missner A, Kügler P *et al*. No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009 Sep 29;106(39):16633-8
- [5] Czyzewski BK, Wang DN Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature* 2012 Mar 11;483(7390):494-7
- [6] Kabil O, Vitvitsky V, Xie P *et al*. The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H<sub>2</sub>S production in murine tissues. *Antioxidants & redox signaling* 2011 Jul 15;15(2):363-72
- [7] Tanizawa K Production of H<sub>2</sub>S by 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase. *Journal of biochemistry* 2011 Apr;149(4):357-9
- [8] Kabil O, Banerjee R Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *The Journal of biological chemistry* 2010 Jul 16;285(29):21903-7
- [9] Whiteman M, Moore PK Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability? *Journal of cellular and molecular medicine* 2009 Mar;13(3):488-507
- [10] Chen P, Poddar R, Tipa EV *et al*. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Advances in enzyme regulation* 1999;39:93-109
- [11] Chen X, Jhee KH, Kruger WD *et al*. Production of the neuromodulator H<sub>2</sub>S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *The Journal of biological chemistry* 2004 Dec 10;279(50):52082-6
- [12] Chiku T, Padovani D, Zhu W *et al*. H<sub>2</sub>S biogenesis by human cystathionine gamma-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *The Journal of biological chemistry* 2009 Apr
- [13] Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y *et al*. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *Journal of biochemistry* 2009 Nov;146(5):623-6

- [14] Kimura H Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino acids* 2011 Jun;41(1):113-21
- [15] Benavides GA, Squadrito GL, Mills RW et al. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007 Nov 13;104(46):17977-82
- [16] Li L, Hsu A, Moore PK et al. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation--a tale of three gases! *Pharmacology & therapeutics* 2009 Sep;123(3):386-400
- [17] Olson KR Is hydrogen sulfide a circulating "gasotransmitter" in vertebrate blood? *Biochimica et biophysica acta* 2009 Jul;1787(7):856-63
- [18] Shen X, Pattillo CB, Pardue S et al. Measurement of plasma hydrogen sulfide in vivo and in vitro. *Free radical biology & medicine* 2011 May 1;50(9):1021-31
- [19] Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N et al. H2S signals through protein S-sulphydration. *Science signaling* 2009 Nov 10;2(96):ra72
- [20] Levitt MD, Abdel-Rehim MS, Furne J et al. Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue. *Antioxidants & redox signaling* 2011 Jul 15;15(2):373-8
- [21] Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V et al. Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010 Oct;30(10):1998-2004
- [22] Qiao W, Chaoshu T, Hongfang J et al. Endogenous hydrogen sulfide is involved in the pathogenesis of atherosclerosis. *Biochemical and biophysical research communications* 2010 May 28;396(2):182-6
- [23] Wang Y, Zhao X, Jin H et al. Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2009 Feb;29(2):173-9
- [24] Perna AF, Sepe I, Lanza D et al. Hydrogen sulfide reduces cell adhesion and relevant inflammatory triggering by preventing ADAM17-dependent TNF- $\alpha$  activation. *Journal of cellular biochemistry* 2013 Jan 7;
- [25] Kimura Y, Kimura H Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004 Jul;18(10):1165-7
- [26] Geng B, Chang L, Pan C et al. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochemical and biophysical research communications* 2004 Jun 4;318(3):756-63
- [27] Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH et al. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? *Journal of neurochemistry* 2004 Aug;90(3):765-8
- [28] Yang C, Yang Z, Zhang M et al. Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced cytotoxicity and inflammation in HaCaT cells through inhibition of ROS/NF- $\kappa$ B/COX-2 pathway. *PLoS one* 2011;6(7):e21971
- [29] Pan LL, Liu XH, Gong QH et al. Hydrogen sulfide attenuated tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inflammatory signaling and dysfunction in vascular endothelial cells. *PLoS one* 2011 May 10;6(5):e19766
- [30] Henderson PW, Singh SP, Belkin D et al. Hydrogen sulfide protects against ischemia-reperfusion injury in an in vitro model of cutaneous tissue transplantation. *The Journal of surgical research* 2010 Mar;159(1):451-5
- [31] Calvert JW, Jha S, Gundewar S et al. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circulation research* 2009 Aug 14;105(4):365-74
- [32] Elrod JW, Calvert JW, Morrison J et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007 Sep 25;104(39):15560
- [33] Sen U, Vacek TP, Hughes WM et al. Cardioprotective role of sodium thiosulfate on chronic heart failure by modulating endogenous H2S generation. *Pharmacology* 2008;82(3):201-13
- [34] Yan H, Du J, Tang C et al. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochemical and biophysical research communications* 2004 Jan 2;313(1):22-7
- [35] Zhao W, Zhang J, Lu Y et al. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *The EMBO journal* 2001 Nov 1;20(21):6008-16
- [36] Zhong GZ Hydrogen Sulfide-a potent multichannel anti-arrhythmic drug. *Journal of cardiovascular disease research* 2010 Jan;1(1):37-9
- [37] Jackson-Weaver O, Paredes DA, Gonzalez Bosc LV et al. Intermittent hypoxia in rats increases myogenic tone through loss of hydrogen sulfide activation of large-conductance Ca(2+)-activated potassium channels. *Circulation research* 2011 Jun 10;108(12):1439-
- [38] Jiang HL, Wu HC, Li ZL et al. [Changes of the new gaseous transmitter H2S in patients with coronary heart disease]. *Di 1 jun yi da xue xue bao = Academic journal of the first medical college of PLA* 2005 Aug;25(8):951-4
- [39] Chen L, Ingrid S, Ding YG et al. Imbalance of endogenous homocysteine and hydrogen sulfide metabolic pathway in essential hypertensive children. *Chinese medical journal* 2007 Mar 5;120(5):389-93
- [40] Xia M, Chen L, Muh RW et al. Production and actions of hydrogen sulfide, a novel gaseous bioactive substance, in the kidneys. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2009 Jun;329(3):1056-62
- [41] Roy A, Khan AH, Islam MT et al. Interdependency of cystathione  $\beta$ -lyase and cystathione  $\beta$ -synthase in hydrogen sulfide-induced blood pressure regulation in rats. *American journal of hypertension* 2012 Jan;25(1):74-81
- [42] Be?owski J Hypoxia in the renal medulla: implications for hydrogen sulfide signaling. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2010 Aug;334(2):358-63
- [43] Aminzadeh MA, Vaziri ND Downregulation of the renal and hepatic hydrogen sulfide (H2S)-producing enzymes and capacity in chronic kidney disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Associati*
- [44] Lu M, Liu YH, Goh HS et al. Hydrogen sulfide inhibits plasma renin activity. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2010 Jun;21(6):993-1002

- [45] Zavaczki E, Jeney V, Agarwal A et al. Hydrogen sulfide inhibits the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Kidney international* 2011 Oct;80(7):731-9
- [46] Sen U, Basu P, Abe OA et al. Hydrogen sulfide ameliorates hyperhomocysteinemia-associated chronic renal failure. *American journal of physiology. Renal physiology* 2009 Aug;297(2):F410-9
- [47] Sen U, Munjal C, Qipshidze N et al. Hydrogen sulfide regulates homocysteine-mediated glomerulosclerosis. *American journal of nephrology* 2010;31(5):442-55
- [48] Sen U, Givvimani S, Abe OA et al. Cystathionine  $\gamma$ -synthase and cystathionine  $\gamma$ -lyase double gene transfer ameliorate homocysteine-mediated mesangial inflammation through hydrogen sulfide generation. *American journal of physiology. Cell physiology* 2011 Jan
- [49] Untereiner AA, Dhar A, Liu J et al. Increased renal methylglyoxal formation with down-regulation of PGC-1 $\beta$ -FBPase pathway in cystathionine  $\gamma$ -lyase knockout mice. *PloS one* 2011;6(12):e29592
- [50] Yuan P, Xue H, Zhou L et al. Rescue of mesangial cells from high glucose-induced over-proliferation and extracellular matrix secretion by hydrogen sulfide. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplan*
- [51] Lee HJ, Mariappan MM, Feliars D et al. Hydrogen sulfide inhibits high glucose-induced matrix protein synthesis by activating AMP-activated protein kinase in renal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 2012 Feb 10;287(7):4451-61
- [52] Perna AF, Luciano MG, Ingrosso D et al. Hydrogen sulphide-generating pathways in haemodialysis patients: a study on relevant metabolites and transcriptional regulation of genes encoding for key enzymes. *Nephrology, dialysis, transplantation : official pub*
- [53] Ingrosso D, Cimmino A, Perna AF et al. Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. *Lancet* 2003 May 17;361(9370):1693-9
- [54] Perna AF, Ingrosso D, Violetti E et al. Hyperhomocysteinemia in uremia--a red flag in a disrupted circuit. *Seminars in dialysis* 2009 Jul-Aug;22(4):351-6
- [55] Hasuike Y, Nakanishi T, Moriguchi R et al. Accumulation of cyanide and thiocyanate in haemodialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 200
- [56] Chang L, Geng B, Yu F et al. Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. *Amino acids* 2008 May;34(4):573-85
- [57] Singh S, Padovani D, Leslie RA et al. Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H<sub>2</sub>S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *The Journal of biological chemistry* 2009 Aug 14;284(33):22457-66
- [58] Kriebitzsch C, Verlinden L, Eelen G et al. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> influences cellular homocysteine levels in murine preosteoblastic MC3T3-E1 cells by direct regulation of cystathionine  $\gamma$ -synthase. *Journal of bone and mineral research : the official jour*
- [59] Della Coletta Francescato H, Cunha FQ, Costa RS et al. Inhibition of hydrogen sulphide formation reduces cisplatin-induced renal damage. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - Eur*
- [60] Francescato HD, Marin EC, Cunha Fde Q et al. Role of endogenous hydrogen sulfide on renal damage induced by adriamycin injection. *Archives of toxicology* 2011 Dec;85(12):1597-606
- [61] Wu N, Siow YL, O K et al. Ischemia/reperfusion reduces transcription factor Sp1-mediated cystathionine beta-synthase expression in the kidney. *The Journal of biological chemistry* 2010 Jun 11;285(24):18225-33
- [62] Tripatara P, Patel NS, Collino M et al. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gamma-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2008 Oct;88(10)
- [63] Tripatara P, Patel NS, Brancaleone V et al. Characterisation of cystathionine gamma-lyase/hydrogen sulphide pathway in ischaemia/reperfusion injury of the mouse kidney: an in vivo study. *European journal of pharmacology* 2009 Mar 15;606(1-3):205-9
- [64] Bos EM, Leuvenink HG, Snijder PM et al. Hydrogen sulfide-induced hypometabolism prevents renal ischemia/reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2009 Sep;20(9):1901-5
- [65] Perna AF, Sepe I, Lanza D et al. Hydrogen sulfide increases after a single hemodialysis session. *Kidney international* 2011 Nov;80(10):1108-9