

## University of Groningen

### Hydrogen sulfide

Snijder, Pauline

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2014

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Snijder, P. (2014). *Hydrogen sulfide: Protective properties in models of disease*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. [S.n.].

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

# CHAPTER

SUMMARY

NEDERLANDSE SAMENVATTING

9



## SUMMARY

---



Hydrogen Sulfide ( $H_2S$ ) is a gas with the classic smell of rotten eggs. In high concentrations toxic effects can be observed. Recently, this pungent gas was discovered to be synthesized enzymatically in mammalian and human tissues in low concentrations, which positively transformed the apparent image of  $H_2S$  into a promising therapeutic compound. In recent years it has drawn more and more attention from scientists because of the discovery of several physiological characteristics.  $H_2S$  is important in blood pressure regulation, posttranslational modification of several proteins, decreasing inflammation and decreasing oxidative stress. This thesis addresses the protective effects of  $H_2S$  in several models of disease where similar damaging processes are important. Furthermore, we investigated different dosages and modes of administration to pave the way for clinical use of  $H_2S$ -based therapy.

Gasotransmitters like nitric oxide (NO), carbon monoxide (CO) and  $H_2S$  have similar characteristics. Recent literature shows that they influence one another by enhancing or reducing each others effect. This complex interaction seems important in cellular protection. **Chapter 2** describes gas-mediated cytoprotection in renal transplantation and the importance of complex crosstalk between NO, CO and  $H_2S$ .

$H_2S$  can induce a hypometabolic, hibernation-like state that is characterized by reduced oxygen consumption and carbon dioxide production. In **chapter 3** we investigated whether this hypometabolic state induced by  $H_2S$  is protective in cardiac ischemia where oxygen demand exceeds oxygen availability. We show that treatment with gaseous  $H_2S$  protects hearts from transient myocardial infarction. In this experiment we used hypometabolic as well as non-hypometabolic concentrations to separate the effects caused by reduced metabolism from the other effects of  $H_2S$ . The results show that non-hypometabolic concentrations of  $H_2S$  have protective effects in the setting of fibrosis and inflammation. Necrosis could only be prevented by hypometabolic concentrations of  $H_2S$ . In vitro, NaHS treatment effectively reduced the formation of reactive oxygen species.

Since we found that exogenous administration of  $H_2S$  is protective in cardiac ischemia-reperfusion injury, we hypothesized that endogenously produced  $H_2S$  also plays a role in cellular protection. In **chapter 4** we demonstrate that cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE), one of the major enzymes responsible for endogenous  $H_2S$  production, acts as an endogenous modulator of oxidative stress in the kidney. First, we assessed the localization of CSE in normal human kidneys, showing expression in a large proportion of endothelial cells – glomerular as well as vascular – in addition to tubular and mesangial cells. In CSE $^{-/-}$  mice with reduced renal  $H_2S$  production ischemic damage is increased compared to control littermates, showing increased mortality and necrosis, and reduced renal function. CSE $^{-/-}$  mice could be rescued by pretreatment with NaHS injection prior to ischemia. In vitro, overexpression of CSE reduces the amount of antimycin-induced oxidative stress in cytoplasm and mitochondria. The expression of CSE mRNA in human kidneys prior to transplantation is associated with renal function 14 days after transplantation, indicating a possible protective effect of pre-transplant

CSE levels in transplantation related ischemia. These results render CSE as an enzyme that is involved in the response to oxidative stress, likely through the production of H<sub>2</sub>S.

With the aim to clinically use H<sub>2</sub>S-based therapy, we investigated the protective properties of sodium thiosulfate. Thiosulfate is a major metabolite of H<sub>2</sub>S. Increasing evidence grounds the idea that a dynamic conversion exists between the two substances. STS is a more stable substance than H<sub>2</sub>S and therefore its use in experimental- as well as clinical settings is much simpler. In **chapter 5 and 6** we investigated the protective effects of thiosulfate in hypertensive renal and cardiac disease. STS was almost equally effective as NaSH in reducing cardiac and renal damage caused by angiotensin II-induced hypertension. Since thiosulfate has been safely used to treat calciphylaxis in humans for decades, our results provide an interesting bridge between experimental research and clinical application.

We have shown the protective effects of H<sub>2</sub>S against the detrimental effects of oxidative stress in different in vitro and animal models. The known role of oxidative stress in aging related neurodegenerative diseases instigated a project leading to the results described in **chapter 7**. Overexpression of CSE was protective against neurodegeneration in a *Drosophila* model for spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). These effects are associated with a reduction in inflammation and oxidative stress. Furthermore, treatment of SCA3 flies with thiosulfate also decreased SCA3 related damage. Since we observed reduced levels of CSE in brain tissue of SCA3 patients, CSE might be an interesting target in reducing the damaging effects of the SCA3 mutation, and thereby slowing the progression of the disease.

In **chapter 8** the results of our studies are discussed and recommendations for future research are given. Our overall conclusion is that H<sub>2</sub>S is protective against detrimental effects of oxidative stress and inflammation in several models of disease. By showing similar protective effects of thiosulfate we are a step closer to clinical use of H<sub>2</sub>S-based therapy.







## NEDERLANDSE SAMENVATTING





Waterstofsulfide ( $H_2S$ ) is een sterk ruikend gas dat het meest bekend is van de geur van bedorven eieren. Het ontstaat tijdens de rotting van zwavelhoudende organische stoffen, zoals cysteïne en methionine houdende eiwitten. Hoewel de geur van  $H_2S$  al in zeer lage concentraties kan worden waargenomen, gaat de geurgevoeligheid snel achteruit bij langdurige blootstelling of hoge concentraties. Bij mensen kan blootstelling aan hoge concentraties van het gas zorgen voor irritatie aan de ogen, reukproblemen, ademhalingsmoeilijkheden en uiteindelijk bewustzijnsverlies en de dood. Deze effecten hebben voor een belangrijk deel te maken met de remming van de energieproductie in de mitochondriën. Het mechanisme van deze blokkering van de mitochondriën is echter tot een bepaald punt omkeerbaar.  $H_2S$  wordt in kleine hoeveelheden in het lichaam gemaakt en kan geclassificeerd worden als gasotransmitter. Omdat er de afgelopen jaren een aantal natuurlijke functies van  $H_2S$  in het lichaam ontdekt zijn, is het gas in de afgelopen jaren steeds meer onder de aandacht van wetenschappers gekomen. Bij toediening in subtoxische concentraties heeft  $H_2S$  zelfs beschermende effecten. Dit proefschrift richt zich op deze beschermende effecten in verschillende ziektemodellen waarin identieke pathofysiologische schadeprocessen centraal staan. Tevens hebben we verschillende doseringen en toedieningswegen onderzocht om zo een brug naar klinische toepassing te slaan.

$H_2S$  wordt in veel celtypen in het lichaam gemaakt door drie enzymen: cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS), cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE) en 3-mercaptopyruvaat sulfurtransferase (3-MST). In het lichaam is  $H_2S$  betrokken bij een aantal belangrijke fysiologische processen zoals het reguleren van de bloeddruk, het afremmen van ontstekingsprocessen, het verminderen van schadelijke zuurstofradicalen en het modifieren van de activiteit van verschillende eiwitten. Twee andere belangrijke gasotransmitters, stikstofoxide (NO) en koolstofmonoxide (CO), delen een aantal eigenschappen met  $H_2S$ . Recente onderzoeken tonen aan dat gasotransmitters elkaar kunnen beïnvloeden en zo elkaars effect kunnen versterken of juist remmen. Er zijn steeds meer aanwijzingen dat deze interactie in de cellulaire fysiologie van het lichaam belangrijk kan zijn. In **hoofdstuk 2** introduceren we de verschillende werkingsmechanismen van de drie belangrijkste gasotransmitters, NO, CO en  $H_2S$ . Tevens beschrijven we de beschermende effecten en de complexe interacties van deze drie gassen bij nierschade als gevolg van een afgesloten bloedtoevoer (ischemie-reperfusie schade) en niertransplantatie. Tijdens het afsluiten van de bloedtoevoer, maar ook tijdens het weer herstellen ervan treedt schade op in organen. In deze fase is het aanbod van zuurstof laag, terwijl de vraag nog steeds hoog is. Hierdoor treedt weefselschade op.  $H_2S$  is in staat op de zuurstofvraag in het lichaam te verlagen. Het kan namelijk een winterslaap-achtige staat te induceren, waarbij het oxidatieve metabolisme met meer dan 90% wordt verminderd. Een aantal jaren geleden is ontdekt dat muizen die aan  $H_2S$  in gasvorm worden blootgesteld binnen enkele minuten 60% minder zuurstof verbruiken en evenzoveel minder koolstofdioxide produceren. Tijdens dit proces daalt de lichaamstemperatuur langzaam naar slechts twee graden boven de omgevingstemperatuur. Dit effect van

H<sub>2</sub>S is omkeerbaar, als de toediening wordt gestopt herstelt het metabolisme en de temperatuur van deze muizen snel zonder schadelijke effecten op de lange termijn. Deze toepassing hebben wij in **hoofdstuk 3** gebruikt om het hart te beschermen tegen ischemie-reperfusie schade. Uit dit experiment bleek dat wanneer er H<sub>2</sub>S wordt gegeven tijdens de periode van zuurstofgebrek, er zeer sterke beschermende effecten zijn op het hart. We hebben in dit experiment ook onderzocht of H<sub>2</sub>S het hart beschermt tijdens een periode van zuurstofgebrek in een concentratie die geen winterslaap-achtige staat induceert, om zo te bepalen of ook andere effecten van H<sub>2</sub>S een rol spelen in de bescherming. We vonden dat een lagere concentratie H<sub>2</sub>S, een concentratie die geen winterslaap-achtige staat induceert, ook beschermende effecten had, maar minder uitgesproken. Deze bevindingen passen bij het idee dat het remmen van de zuurstofvraag door H<sub>2</sub>S bescherming kan bieden in situaties van zuurstofgebrek, zoals bijvoorbeeld transplantatie.

H<sub>2</sub>S wordt ook door het lichaam zelf geproduceerd met behulp van een aantal enzymen. Daarom rees de vraag of deze endogene productie mogelijk ook een rol zou kunnen spelen bij bescherming van cellen en organen tijdens zuurstofgebrek. In **hoofdstuk 4** hebben we daarom onderzocht of CSE, één van de H<sub>2</sub>S producerende enzymen, effect heeft op zuurstofgebrek. Wij hebben dit onderzocht in een model van zuurstofgebrek in de nier. In dit model hebben we muizen gebruikt die het CSE-gen missen en deze vergeleken met normale, gezonde muizen. Muizen die het CSE-gen missen produceren slechts een fractie van de hoeveelheid H<sub>2</sub>S die gezonde muizen produceren. Na het afklemmen van de bloedtoevoer naar de nier bleek dat muizen zonder CSE meer nierschade hadden dan de normale muizen met CSE. Wanneer de dieren zonder CSE-gen behandeld werden met een H<sub>2</sub>S injectie waren er geen verschillen meer. In gekweekte cellen hebben wij vervolgens aangetoond dat overproductie van CSE sterk beschermende effecten heeft tegen zuurstofradicalen. Als laatste is gekeken bij mensen naar de relatie tussen CSE productie en nierfunctie in getransplanteerde nieren. Het bleek dat er een verband was tussen de hoeveelheid CSE en de werking van de nier na transplantatie; meer CSE betekent een betere nierfunctie 14 dagen na de transplantatie. Dit betekent dat H<sub>2</sub>S die in het lichaam wordt geproduceerd door CSE een rol speelt in de bescherming tegen zuurstofgebrek, bij dieren en waarschijnlijk ook bij mensen.

Om een brug te slaan naar klinische toepassing van H<sub>2</sub>S hebben we in **hoofdstuk 5 en 6** onderzoek gedaan naar de beschermende effecten van thiosulfaat. Thiosulfaat wordt in het lichaam geproduceerd en is een belangrijke schakel in het H<sub>2</sub>S-metabolisme. Het is een stabiel eindproduct van H<sub>2</sub>S, maar kan zelf ook weer worden omgezet naar H<sub>2</sub>S. Thiosulfaat wordt al in de kliniek gebruikt voor de behandeling overmatige calciumneerslag in de bloedvaten van dialyse patiënten. Ook wordt het gebruikt als antidotum voor cyanide vergiftiging. In een diermodel van hoge bloeddrukgeïnduceerde nier- en hartschade hebben we gevonden dat dagelijkse injecties met thiosulfaat dezelfde mate van bescherming bieden als dagelijkse injecties met H<sub>2</sub>S.

Zuurstofgebrek en de schade die vervolgens optreedt als gevolg van vrije zuurstofradicalen staat centraal bij veel schadeprocessen in ziekten. In onze experimenten hebben we laten zien dat  $H_2S$  beschermt tegen oxidatieve stress en schade als gevolg van vrije zuurstofradicalen. Oxidatieve stress speelt een belangrijke rol in ouderdomsziekten zoals neurodegeneratie. Dit heeft geleid tot **hoofdstuk 7** waarin we de beschermende effecten van het  $H_2S$ -producerende enzym CSE onderzoeken in spinocerebellaire ataxie type 3 (SCA3). SCA3 is een aandoening waarbij neurodegeneratie optreedt als gevolg van celschade door onder andere oxidatieve stress en ontsteking. Fruitvliegjes worden veel gebruikt voor dit type onderzoek en het model voor SCA3 vormt een goede representatie voor de ziekte in mensen. We vonden dat een grotere hoeveelheid CSE beschermt tegen de schadelijke effecten van SCA3 waarbij een vermindering van ontsteking en oxidatieve stress gevonden werd in deze vliegjes. Vervolgens zagen we dat toevoeging van thiosulfaat aan het voer van de vliegjes met minder CSE beschermend werkt. Bij mensen met de ziekte SCA3 vonden we een verminderde hoeveelheid van het CSE eiwit in de hersenen. Deze resultaten suggereren dat CSE een rol speelt bij het verminderen van de schadelijke effecten van SCA3 en zo mogelijk de progressie van deze ziekte kan vertragen. Onderzoek naar stoffen of medicamenten die de hoeveelheid of activiteit van CSE in het lichaam verhogen biedt perspectief en is veelbelovend.

In **hoofdstuk 8** bespreken we de resultaten van onze studies en geven we aanbevelingen voor toekomstig onderzoek.

De conclusie van dit proefschrift is dat  $H_2S$  beschermende effecten heeft in ziektemodellen waarin ontsteking, zuurstofgebrek en daarmee de productie van vrije zuurstof radicalen centraal staan. Tevens heeft thiosulfaat soortgelijke effecten als het toedienen van  $H_2S$  zelf, waardoor we een stap dichterbij de klinische toepassing van  $H_2S$  gerelateerde therapieën komen.

