

University of Groningen

The role of endogenous H₂S production during hibernation and forced hypothermia

Dugbartey, George Johnson

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:

2015

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

Citation for published version (APA):

Dugbartey, G. J. (2015). *The role of endogenous H₂S production during hibernation and forced hypothermia: towards safe cooling and rewarming in clinical practice*. University of Groningen.

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).

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.

7

Nederlanse Samenvatting

In **hoofdstuk 1** worden onderkoeling en heropwarming geïntroduceerd met hun therapeutische toepassingen. Verder worden de negatieve effecten van onderkoeling en heropwarming op cellen en organen bediscussieerd. Hierbij wordt de nier gebruikt als een voorbeeld van een orgaan met een hoge kwetsbaarheid voor schade.

Dit wordt gevolgd door een uitgebreide review over natuurlijke winterslaap als een natuurlijk model in bescherming tegen schade veroorzaakt door onderkoeling en heropwarming. Dit model wordt gekenmerkt door een zich herhalende cyclus van periodes met inactiviteit (*torpor*) en activiteit (*arousal*) en beschermingsmechanismen tegen schade veroorzaakt door hypothermie en opwarming. Deze beschermingsmechanismen bestaan uit het in stand houden van de Na⁺/K⁺-ATPase activiteit gedurende *torpor* en *arousal* en het activeren van specifieke anti-apoptotische en anti-oxidatieve routes. Deze sectie wordt gevolgd door de farmacologische overweging van winterslaap en zijn potentiële toepassingen in de geneeskunde, waarbij specifieke aandacht wordt besteed aan waterstofsulfide (H₂S) en 5'-adenosine monofosfaat (5'-AMP).

In **hoofdstuk 2** hebben we onderzocht of voorbijgaande vermindering in neutropenie tijdens *torpor* (en onderkoeling) in dieren in winterslaap en geforceerde onderkoeling in dieren die geen winterslaap houden, veroorzaakt wordt door de omkeerbare marginatie of dat andere mechanisme een rol spelen en hoe dit het orgaan behoud kan beïnvloeden. Ten eerste hebben we aangetoond dat neutrofielen verdwijnen in de circulatie gedurende de onderkoelen, maar herstellen naar normale waarden gedurende de heropwarming in zowel dieren met als zonder winterslaap. Aangezien de milt een grote opslagplaats is voor neutrofielen, hebben we de milt operatief verwijderd (splenectomie) om te bepalen of de neutropenie gedurende de *torpor*-stadium het gevolg is van opslag in de milt en vrijlaten in de circulatie gedurende *arousal*. Echter, splenectomie, zowel voorafgaand aan de winterslaap als gedurende *torpor* had geen effect op de neutropenie aangezien de neutrofielenaantallen in zowel dieren wel of geen splenectomie hebben ondergaan, gelijk waren. Hiermee is de rol van de milt uitgesloten. We kunnen ook aantonen dat het mechanisme dat ten grondslag ligt aan deze omkeerbare neutropenie waarschijnlijk niet komt door apoptose-en-ervanging aangezien het aantal circulerende immature neutrofielen laag bleef gedurende *arousal*, wat de betrokkenheid van beenmerg als enig onderliggend mechanisme dat neutropenie tijdens onderkoeling en *torpor* leidt, uitsluit. Het lijkt alsof neutropenie gedurende lage lichaamstemperaturen komt door de aanhechting van neutrofielen aan de vaatwand (marginatie). Door voorbehandeling met dexamethason, een anti-inflammatoir middel, hebben we aangetoond wat de rol van marginatie is. Daarmee suggereert indirecte data dat marginatie het onderliggende mechanisme is van de omkeerbare verdwijning van circulerende neutrofielen gedurende *torpor* en geforceerde onderkoeling. Mogelijk komt dit door een verhoogde expressie van adhesie moleculen en integrinen aangezien marginatie gecontroleerd wordt door adhesie moleculen op de neutrofielen die interageren met complementaire receptoren op het endotheel. (Johnson *et al.*, 1995; Le Deist *et al.*, 1995; Hidax *et al.*, 1996; Kira *et al.*, 2005). Echter, direct bewijs ontbreekt. Daarom zouden er studies gedaan moeten worden om de betrokkenheid van deze adhesie moleculen in marginatie aan te tonen. Aangezien orgaanbeschadiging verergerd door activatie en verzamelen van

inflammatoire mediators (Tapuria *et al.*, 2008), in welke marginatie van neutrofielen een belangrijk vroege consequentie is, kan het blokkeren van de marginatie van neutrofielen (en andere pro-inflammatoire medicatoren) de mate van orgaanbeschadiging verminderen gedurende klinische interventies die afkoeling en heropwarming vereisen. Inderdaad, experimentele blokkade van de marginatie verminderde de omvang van longbeschadiging volgend op normotermie cardiopulmonale bypass in een schaapmodel (Friedman *et al.*, 1996). Interessant is dat de inductie van onderkoeling naar 27.1°C in patiënten die een cardiopulmonale bypass operatie ondergaan, leidt tot de inductie van omkeerbare leukopenie (Le Deist *et al.*, 1995), vergelijkbaar met winterslaap houdende dieren in een *torpor* van 6.2°C (Bouma *et al.*, 2013) en onderkoelde ratten van 9.1°C (Shenag *et al.*, 1986; Bouma *et al.*, 2013). Het is mogelijk dat de verhoogde weerstand voor ischemie-/reperfusieschade en schade door onderkoeling in winterslaap houdende dieren (Lindell *et al.*, 2005; Kurtz *et al.*, 2006; Bogren *et al.*, 2014) het ontstaan van cellulair schade en een daaropvolgend ontstaan van ontsteking voorkomt, zoals wellicht voorkomt in specifieke klinische situaties die onderkoeling en heropwarming vereisen. Dus marginatie van neutrofielen veroorzaakt door onderkoeling kan betrokken zijn in de etiologie van orgaanbeschadiging volgend op onderkoeling in mensen. Daarom kan het voorkomen van marginatie orgaanbeschadiging beperken in specifieke klinische situaties zoals cardiopulmonale bypass.

Om de onderliggende mechanismen van de inductie van *torpor* en de resulterende orgaan bescherming tijdens de winterslaap verder te onderzoeken, hebben we het H_2S systeem verder onderzocht. Exogeen toegediend H_2S remt de adhesie van leukocyten aan het vasculaire endotheel (Fiorucci *et al.*, 2005), onderdrukt de expressie van adhesie moleculen aan leukocyten ((Fiorucci *et al.*, 2005; Zanardo *et al.*, 2006) en vermindert de LPS-geïnduceerde accumulatie van neutrofielen in de lever en longen van de rat. Tezamen leidt dit tot orgaan bescherming. Bovendien is H_2S toegepast in het induceren van een winterslaap-achtige staat bij knaagdieren welke geen winterslaap houden (Blackstone *et al.*, 2005; Blackstone and Roth, 2007; Bos *et al.*, 2009), zonder dat dit na volledig herstel gedragsveranderingen of orgaanschade tot gevolg heeft gehad.

Daarom hebben we in **hoofdstuk 3** de rol van endogeen H_2S en zijn producerende enzymen (CBS, CSE en 3-MST) in het reguleren van de *torpor*-arousal cyclus en orgaanbescherming tijdens winterslaap onderzocht. We laten zien dat de H_2S productie van cruciaal belang lijkt te zijn in de inductie van *torpor*, aangezien bloedspiegels van H_2S substantieel gereguleerd zijn tijdens winterslaap, waarbij de hoogste waarden tijdens *torpor* gevonden worden. Bovendien zijn de waarden van alle drie de H_2S -producerende enzymen in de nier substantieel verhoogd tijdens de *torpor* fase. De betrokkenheid van H_2S in de inductie van *torpor* is opgehelderd door de toediening van een non-specifieke inhibitor van H_2S tijdens *torpor*, wat een terugkeer in *torpor* inluiddt. Vervolgens onthullen we dat H_2S een essentiële rol speelt in de bescherming van de nieren gedurende de *torpor*-arousal cyclus, aangezien farmacologische remming van het H_2S -systeem gedurende *torpor* niet alleen herintreding in de *torpor*-fase verhinderde, maar ook resulteerde in substantiële nierschade, welke werd gekarakteriseerd door infiltratie van neutrofielen en macrofagen en hoge waarden van serum creatinine, KIM-1 proteïne en ROS formatie. Bovendien hebben hamsters die geen

winterslaap houden zeer lage bloedspiegels van H_2S en verminderde expressie van alle renale H_2S producerende enzymen. In tegenstelling tot winterslaap houdende hamsters, lieten hamsters die geen winterslaap houden een substantiële stijging in serum creatinine, renale ROS productie en – zeer belangrijk- nierschade zien, wat verder verhevigd werd door H_2S inhibitie. Merkwaardig genoeg werden deze fenomenen niet gezien tijdens (late) *arousal* in winterslaap houdende dieren, welke dan dezelfde lichaamstemperatuur (en vermoedelijk hetzelfde metabolisme) hebben als niet winterslaap houdende hamsters. Mogelijkerwijs is dit verschil gerelateerd aan de duur van de blootstelling aan een omgevingstemperatuur onder de 5°C, welke slechts ongeveer vier dagen is voor *arousals*, maar meerdere weken kan aanhouden in niet winterslaap houdende dieren. Dit put het verdedigingsmechanisme in de niet winterslaap houdende dieren uit, wat schade tot gevolg heeft.

Echter, andere organen waarin de expressie van specifieke H_2S -producerende enzymen overvloedig is, zoals de brein, lever en het cardiovasculaire systeem, dienen te worden onderzocht om deze bevindingen te bevestigen. Onze bevindingen tot nu toe suggereren dat H_2S bescherming van de nieren biedt bij een hoog metabolisme, mogelijk door het behoud van adenosine trifosfaat (ATP) productie (Modis *et al.*, 2013; reviewed in Szabo *et al.*, 2014) gedurende *torpor*/onderkoeling. Het ontrafelen van de mechanismen die tot de inductie van natuurlijke *torpor* en de regulatie van de *torpor-arousal* cyclus leiden, kan van grote klinische relevantie zijn voor de preventie van acute orgaan schade bij therapeutische onderkoeling en ischemie/reperfusie. Hoewel de mechanismen hoe H_2S een winterslaap-achtige staat in kleine zoogdieren induceert niet volledig begrepen worden, is een poging om een soortgelijke winterslaap-achtige staat bij grotere zoogdieren te reproduceren mislukt (Haouzi *et al.*, 2008). En daarom zou H_2S een therapeutische onderkoeling kunnen verhinderen en zou het therapeutische gebruik van H_2S met voorzichtigheid gepaard moeten gaan. Er zijn ook berichten dat H_2S concurreert met zuurstof en reversibele mitochondriële complex IV – het terminale enzym in de mitochondriële elektronen transport keten – remt (Beauchamp *et al.*, 1984; Khan *et al.*, 1990). Dit leidt tot hypometabolisme en als gevolg daarvan onderkoeling in kleine zoogdieren. Aangezien de inductie van een soortgelijke hypometabole en hypotherme staat in grote zoogdieren is mislukt, ontstaat de vraag of een H_2S -geïnduceerde winterslaap-achtige staat zoals in kleine zoogdieren wel bestaat in grotere zoogdieren. Mogelijk faalt H_2S er bij deze dieren in om het mitochondriële complex IV te remmen doordat er minder mogelijkheden zijn om de oxidatieve fosforylering in grotere zoogdieren (en mensen) te compromitteren (Szabo, 2007). Het is ook mogelijk dat een hogere concentratie H_2S en een langere blootstelling noodzakelijk zijn om een dergelijke winterslaap-achtige staat in grotere zoogdieren te induceren. Echter, een mogelijke nadeel zou H_2S toxiciteit in grotere zoogdieren kunnen zijn bij een hogere concentratie of een langere blootstelling.

Omdat H_2S een hoofdrol lijkt te spelen in de inductie van *torpor* en het behoud van de nierfunctie tijdens de *torpor-arousal* cyclus in hamsters was onze hypothese dat farmacologische inductie van *torpor* met behulp van 5'-AMP op kan treden door de H_2S route. 5'-AMP is eerder gebruikt in andere onderzoeken om een winterslaapachtige staat te induceren in knaagdieren die geen winterslaap houden (Zhang *et al.*, 2006; Swoap *et al.*, 2007; Strijkstra *et al.*, 2012; Bouma *et al.*, 2013; de Vrij *et al.*, 2014). Daarom hebben we onderkoeling in

hoofdstuk 4 farmacologisch geïnduceerd, wat lijkt op natuurlijke verdooving met behulp van 5'-AMP en hebben we onderzocht of 5'-AMP het renale H₂S systeem beïnvloed in dieren in winterslaap en of het organen beschermt tegen hypothermisch letsel zoals geobserveerd in hoofdstuk 3. Onze resultaten laten zien dat 5'-AMP-geïnduceerde onderkoeling onafhankelijk is van de activatie van H₂S omdat remming van H₂S voorafgaand aan en tijdens de 5'-AMP-geïnduceerde onderkoeling de onderkoeling niet verhindert. 5'-AMP lijkt echter het renale H₂S systeem te activeren en het renale hypothermische letsel te verzwakken. 5'-AMP-geïnduceerde onderkoeling beschermt organen in diersoorten die geen winterslaap houden (Zhenyin *et al.*, 2011; Miao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Farmacologische remming van het H₂S systeem voorafgaand aan en tijdens 5'-AMP-geïnduceerde onderkoeling resulteerde in substantiële nierschade, wat suggereert dat H₂S een rol speelt in orgaan bescherming tijdens 5'-AMP-geïnduceerde onderkoeling.

Daarom is 5'-AMP mogelijk een alternatieve benadering om onderkoeling te induceren in patiënten die therapeutische onderkoeling nodig hebben. Deze benadering is echter nieuw en moet verder onderzocht worden.

De mechanismen onderliggende aan 5'-AMP-geïnduceerde onderkoeling zijn niet duidelijk. Eerder is in sommige studies gerapporteerd dat 5'-AMP een *torpor*-achtige staat induceren door defosforylering naar adenosine wat adenosine receptoren activeert in de temperatuurgevoelige hypothalamus nucleus (Zhang *et al.*, 2006), en daarbij de thermoregulatorische reacties die de kerntemperatuur van het lichaam handhaven onderdrukken. Dit resulteert vervolgens in een verminderde cardiale output en daardoor in onderkoeling. Er zijn echter ook berichten dat ATP en adenosinedifosfaat (ADP) in gelijke mate een *torpor*-achtige staat induceren van zelfs een veel langere duur dan 5'-AMP (Swoap *et al.*, 2007) waardoor de rol van adenosine wordt gebagatelliseerd. Het mechanisme waardoor deze adenine nucleotiden zo'n *torpor*-achtige staat induceren blijft grotendeels onbekend. Aangezien er wordt gespeculeerd dat adenosine de adenosine A₁ receptor in de sino-atriale en de atriale-ventriculaire knopen van het hart induceert, wat resulteert in hyperpolarisatie van hartspiercellen en daaropvolgend bradycardie zoals waargenomen gedurende de *torpor*-achtige staat (Evans *et al.*, 1982; Pelleg *et al.*, 1987), hebben we in hoofdstuk 4 ook aangetoond dat 5'-AMP-geïnduceerde onderkoeling het renale H₂S systeem, een systeem dat the hypometabolisme (en onderkoeling) induceert, lijkt te activeren en hypothermische nierschade lijkt te verminderen. Het mechanisme waarbij 5'-AMP het renale H₂S systeem beïnvloedt wat leid tot een verminderde nierschade is echter niet bekend en moet onderzocht worden.

De identificatie van orgaanbescherming door H₂S gedurende natuurlijke winterslaap en 5'-AMP-geïnduceerde onderkoelen heeft de deuren op gezet voor *in vivo* experimenten in niet-winterslaap houdende zoogdieren. Daarom, hebben we in **hoofdstuk 5** de effecten van onderkoeling/heropwarming gedurende *torpor-arousal* geïmiteerd door het induceren van geforceerde onderkoeling bij ratten (niet-winterslaap houdende dieren) onder anesthesie met en zonder dopamine co-infusie gevolgd door opwarming naar normothermie. De rol van het renale H₂S systeem werd hierbij onderzocht. Vergelijkbaar met eerdere data in gekweekte gladde spiercellen van de aorta (Talaie *et al.*, 2011), verhoogde dopamine infusie in de

gehele rat de H₂S bloedspiegel en handhaafde expressie levels van alle 3 H₂S-producerende enzymen en verhinderd daardoor renale schade als gevolg van onderkoeling/heropwarming. Niettemin, de meeste effecten van dopamine waren ongevoelig voor de blokkade van H₂S productie met AOAA, a niet-specifieke remmer van H₂S enzymen (Asimakopoulou *et al.*, 2013), wat suggereert dat H₂S geen rol speelt in de geobserveerde dopamine effecten. Echter, het dient te worden opgemerkt dat van alle H₂S-producerende enzymen, dopamine infusie de renale CBS expressie handhaafde, maar dat de renale expressie van 3-MST en in het bijzonder van CSE in onderkoelde en heropgewarmde ratten behandeld met AOAA, niet handhaafde. Deze observatie suggereert dat behoud van de nieren voornamelijk afhankelijk is van de handhaving van de CBS expressie, in plaats van CSE of 3-MST. Een dergelijk idee is in overeenstemming met eerdere data die aantonen dat selectieve down-regulatie van CBS bij siRNA de gunstige werking van dopamine gedurende onderkoeling en heropwarming opheft (Talaie *et al.*, 2011).

In conclusie, wij hebben aangetoond dat de regulatie van de H₂S route een cruciaal, onderliggend mechanisme is in de inductie van *torpor* en de instandhouding van organen gedurende de fysiologische extremen van *torpor* en *arousal*. Daarnaast lijkt het H₂S systeem een grote rol te spelen in het verminderen van de hypotermisch, renaal letsel gedurende farmacologisch geïnduceerde *torpor* aangezien dit is geactiveerd door 5'-AMP. Ten slotte hebben we aangetoond dat het H₂S systeem ook essentieel is in het beschermen van organen (nieren) gedurende geforceerde onderkoeling en heropwarming in niet-winterslaaphoudende dieren onder anesthesie. Daarom kan H₂S behandeling een nieuw therapeutische aanpak kunnen bieden in klinische situaties die onderkoeling en heropwarming vereisen.

