

The anti-inflammatory potential of Adenosine - an experimental study with emphasis on ischemia-reperfusion injury

Citation for published version (APA):

Bouma, M. G. (1997). *The anti-inflammatory potential of Adenosine - an experimental study with emphasis on ischemia-reperfusion injury*. Universitaire Pers Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/1997

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

In the first section of *Chapter 1*, the clinical relevance and the pathophysiology of the inflammatory response to ischemia-reperfusion are outlined, emphasizing the role of the polymorphonuclear leukocyte (neutrophil) as the primary effector cell of reperfusion injury. A central pathogenetic mechanism in the development of reperfusion injury is the generation of oxygen free radicals, predominantly by the capillary endothelium, which induce the production and release of several inflammatory mediators, such as arachidonic acid metabolites, cytokines and activated complement proteins. As a result, neutrophils are attracted to the inflammatory site, become activated and adhere to the vascular endothelium, and finally transmigrate through the endothelial barrier into the target tissue. The neutrophil-endothelial adhesive interactions consist of sequential stages, each involving different types of complementary adhesion molecules, expressed on neutrophils and endothelial cells, respectively. Eventually, activated neutrophils cause tissue injury by producing oxidants and proteolytic enzymes that degrade the extracellular matrix and induce cellular injury. Thus, three pathophysiological levels of ischemia-reperfusion injury can be distinguished: the effector level (neutrophils and oxidants), the mediator level (arachidonic acid metabolites, cytokines, activated complement-proteins), and the tissue level (the vascular endothelium expressing adhesion molecules). Accordingly, we describe the therapeutic approaches to ischemia-reperfusion injury, that are aimed at interfering at either the effector, the mediator or the tissue level of inflammation.

In the second section of the introduction, the role of adenosine as a retaliatory metabolite during ischemia and reperfusion is depicted. Adenosine, a metabolite of ATP degradation during ischemia, counteracts the deleterious effects of ischemia and reperfusion on the cardiovascular system and metabolism as a result of ligation of specific cell-surface adenosine receptors. By reducing metabolic demand and adjusting cellular energy supply, adenosine "retaliates" against the external ischemic stimulus that causes its formation, and has therefore been termed a "retaliatory metabolite" by Newby. Adenosine binding to A₂ receptors also effectively inhibits superoxide generation by activated neutrophils and reduces neutrophil adhesiveness to the endothelium, thus exerting anti-inflammatory effects. Based on the concept, originally introduced by Cronstein, that adenosine functions as an endogenous immunoregulatory negative feedback mechanism during inflammation, the main hypothesis underlying the experimental work described in this thesis, is that adenosine downregulates the inflammatory function of various different

immunocompetent cell types that are involved in inflammatory responses, particularly during ischemia and reperfusion. Furthermore, we hypothesized that pharmacological interference in adenosine metabolism, resulting in enhanced local endogenous adenosine levels, could represent an attractive, alternative target of therapeutic intervention in inflammatory conditions, including reperfusion injury.

In *Chapter 2* it is demonstrated that adenosine effectively inhibits the release of the granule proteins elastase, bactericidal/permeability-increasing protein, and defensins by TNF α - and LPS-stimulated neutrophils in human whole blood. Using specific adenosine receptor agonists and antagonists the involvement of A2 as well as A3 receptors in adenosine-mediated inhibition of neutrophil degranulation is evidenced, while the presence of A3 receptors in human neutrophils is demonstrated for the first time. In addition, the adenosine-regulating agent GP515 is shown to attenuate degranulation via an adenosine-mediated mechanism, pointing to its potential relevance to the treatment of neutrophil-mediated tissue injury.

In *Chapter 3*, we provide evidence that adenosine inhibits the production of TNF α , IL-6 and IL-8 by LPS-activated human monocytes *in vitro* with a differential potency. The results obtained with the adenosine analogue 2-chloroadenosine indicate that inhibition of cytokine release by adenosine is primarily an A2-mediated event, and suggest an additional 'retaliatory' action of adenosine during pathological conditions, in which cytokine production by activated mononuclear phagocytes is involved, such as sepsis and ischemia-reperfusion injury.

In *Chapter 4* the effects of adenosine on two major determinants of endothelial cell activation, *i.e.* the release of pro-inflammatory cytokines and the expression of adhesion molecules, are studied. Adenosine dose-dependently inhibits the release of IL-6 and IL-8 by stimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Expression of E-selectin and VCAM-1, but not ICAM-1, by activated HUVEC is also reduced by adenosine. Inhibition of endogenous adenosine deaminase activity by EHNA or deoxycoformycin strongly enhances the inhibitory effects of exogenous adenosine on cytokine release and expression of E-selectin and VCAM-1. However, a clear role for specific adenosine-receptors in the described inhibitory events could not be established. Taken together, these data imply that the vascular endothelium constitutes an important target for the anti-inflammatory actions of adenosine.

In *Chapter 5* we use a well-controlled *in vitro* hypoxia-reoxygenation model, mimicking *in vivo* ischemia-reperfusion, to investigate in parallel the effects of hypoxia and reoxygenation on endothelial activation and adenosine release. We find that neither hypoxia nor reoxygenation for varying periods of time, induce pro-inflammatory activation of HUVEC, as determined by cell-surface expression of the adhesion molecules E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1, as well as by extracellular release of IL-6 and IL-8, although HUVEC remain morphologically and functionally intact under these conditions. At the same time however, hypoxia significantly enhances the release of adenosine by HUVEC, an event that can be strongly potentiated by the adenosine kinase inhibitor GP515, suggesting that the anti-inflammatory potential of the endothelium can be enforced during hypoxia by pharmacological interference in endogenous adenosine metabolism.

In *Chapter 6* the efficacy of the adenosine-regulating agent GP515 in *in vivo* ischemia-reperfusion is evaluated, by investigating its effects on the hepatic inflammatory and microcirculatory response to hemorrhagic shock and resuscitation in the rat. While in untreated rats subjected to hemorrhagic shock and resuscitation, firm leukocyte-sinusoidal adhesion was strongly enhanced in the periportal and midzonal sublobular regions, and sinusoidal diameters were markedly reduced, pretreatment with GP515 significantly attenuated shock and resuscitation-induced leukocyte adhesion in both regions, enlarged sinusoidal diameters, and tended to improve sinusoidal blood flow. These results were associated with reduced liver injury two days after shock and resuscitation. GP515 did not display systemic macrohemodynamical or hematological side effects. We hypothesize that the adenosine-regulating agent GP515 has a therapeutic potential to protect from reperfusion injury *in vivo* by capitalizing on the beneficial anti-inflammatory and microcirculatory actions of endogenous adenosine.

In *Chapter 7* we propose that the newly discovered anti-inflammatory features of adenosine have added a new dimension to the "retaliatory metabolite" concept, as originally introduced by Newby. We have found that adenosine affects the inflammatory function of neutrophils, monocytes and endothelial cells. Based on the results from the experiments described in this thesis, as well as on data that have recently emerged from experimental studies by others, we conclude that the anti-inflammatory potential of adenosine extends to the effector, the mediator, as well as the tissue level of inflammation. Therefore, pharmacological enhancement of endogenous adenosine levels at its

local site of formation, could represent an attractive, alternative therapeutic strategy in various inflammatory conditions, including ischemia-reperfusion injury. Finally, several of these pharmacological approaches are discussed in relation to ischemia and reperfusion, as well as other inflammatory disorders.

SAMENVATTING

In het eerste gedeelte van *Hoofdstuk 1* worden de klinische relevantie en de pathofysiologie van de ontstekingsreactie op ischemie-reperfusie beschreven, waarbij de rol van de polymorf nucleaire leukocyt (de neutrofiel) als primaire effector cel in het ontstaan van reperfusieschade wordt benadrukt. Een centraal pathogenetisch mechanisme van reperfusieschade is de vorming van vrije zuurstof radicalen, overwegend door het capillair endotheel, die de productie en afgifte van verschillende ontstekingsmediatoren, zoals arachidonzuur metabolieten, cytokinen, en geactiveerde complement eiwitten induceren. Als gevolg daarvan worden neutrofielen aangetrokken naar de plaats van ontsteking en vervolgens geactiveerd, waarna ze hechten aan het endotheel van de vaatwand en tenslotte transmigreren door de endotheel barrière naar het weefsel. Adhesie van neutrofielen aan het endotheel voltrekt zich in verschillende opeenvolgende stadia, waarin steeds verschillende typen adhesiemoleculen betrokken zijn, die complementair tot expressie worden gebracht door respectievelijk neutrofielen en endotheel. Uiteindelijk veroorzaken geactiveerde neutrofielen weefselschade door de productie van oxidantia en proteolytische enzymen, die de extracellulaire matrix afbreken en celschade induceren. Er kunnen aldus drie niveaus in de pathofysiologie van ischemie-reperfusieschade worden onderscheiden: het effector niveau (vrije zuurstof radicalen en neutrofielen), het mediators niveau (arachidonzuur metabolieten, cytokinen, geactiveerde complement-eiwitten), en het weefsel niveau (het vasculaire endotheel dat adhesiemoleculen tot expressie brengt). We beschrijven dienovereenkomstig de therapeutische benaderingen die interfereren op het effector, het mediators, dan wel het weefsel niveau van de ontstekingsreactie na ischemie-reperfusie.

In het tweede gedeelte van de inleiding wordt de rol van adenosine als "vergeldings-metaboliet" in ischemie en reperfusie beschreven. Adenosine ontstaat als afbraakproduct van ATP tijdens ischemie, en gaat de schadelijke gevolgen van ischemie en reperfusie op het cardiovasculaire systeem en het metabolisme tegen, doordat het aan specifieke adenosine receptoren op de celmembraan bindt. Doordat het de metabole vraag reduceert en de energievoorziening van de cel corrigeert, "vergelt" adenosine de externe ischemische stimulus die zijn vorming veroorzaakt, en is daarom door Newby een "vergeldings-metaboliet" genoemd. Door binding aan A₂ receptoren remt adenosine bovendien de vorming van superoxide door geactiveerde neutrofielen en vermindert het de adhesie van neutrofielen aan endotheel, en oefent daarmee ontstekingsremmende effecten uit. Gebaseerd op het idee, oorspronkelijk

geïntroduceerd door Cronstein, dat adenosine functioneert als een endogeen immuunregulerend negatief terugkoppelingsmechanisme tijdens ontsteking, is de belangrijkste hypothese die ten grondslag ligt aan het experimentele werk, zoals dat in dit proefschrift is beschreven, dat adenosine de inflammatoire activiteit van verschillende immunocompetente celtypen die betrokken zijn bij ontstekingsreacties, in het bijzonder tijdens ischemie en reperfusie, remt. Een tweede hypothese is dat farmacologische interventie in het metabolisme van adenosine, resulterend in verhoogde lokale spiegels van endogeen adenosine, een aantrekkelijk alternatief doelwit van therapeutische interventie zou kunnen vormen in ontstekingsprocessen, zoals reperfusieschade.

In *Hoofdstuk 2* wordt aangetoond dat adenosine op effectieve wijze de afgifte van de granule eiwitten elastase, bactericidal/permeability-increasing protein en defensins door TNF α - en LPS-gestimuleerde neutrofielen in humaan volbloed remt. Door gebruik te maken van specifieke adenosine receptor agonisten en antagonisten, wordt het bewijs geleverd voor de betrokkenheid van zowel A2 als A3 receptoren in de inhibitie van neutrofiel degranulatie door adenosine. Bovendien wordt voor het eerst de aanwezigheid van A3 receptoren op humane neutrofielen aangetoond. Verder wordt beschreven dat de adenosine-regulerende stof GP515 degranulatie remt via een adenosine-gemedieerd mechanisme, hetgeen wijst op de mogelijke therapeutische relevantie van deze stof ten aanzien van weefselschade die wordt veroorzaakt door neutrofielen.

In *Hoofdstuk 3* tonen we aan dat adenosine de productie van TNF α , IL-6 en IL-8 door LPS-geactiveerde humane monoccyten remt met een verschillende potentie. Resultaten verkregen met het adenosine-analoon 2-chloroadenosine wijzen erop dat de remming van cytokine afgifte door adenosine vooral door A2 receptoren wordt gemedieerd, en suggereren het bestaan van een additioneel "vergeldings-effect" van adenosine tijdens situaties die worden gekenmerkt door verhoogde cytokine productie door geactiveerde mononucleaire fagocyten, zoals sepsis en ischemie-reperfusieschade.

In *Hoofdstuk 4* worden de effecten van adenosine op twee determinanten van endotheelcel activatie, namelijk de afgifte van pro-inflammatoire cytokinen en de expressie van adhesiemoleculen, bestudeerd. Adenosine remt op dosisafhankelijke wijze de afgifte van IL-6 en IL-8 door gestimuleerde humane navelstrengvene endotheelcellen (HUVEC). De expressie van E-selectin en VCAM-1, maar niet van ICAM-1, door geactiveerd HUVEC wordt eveneens

geremd door adenosine. Inhibitie van endogene adenosine deaminase activiteit door EHNA of deoxycoformycine versterkt de remmende effecten van exogeen adenosine op de afgifte van cytokinen en de expressie van E-selectin en VCAM-1 op krachtige wijze. Een duidelijke rol van specifieke adenosine receptoren in de beschreven remmende effecten van adenosine kon echter niet worden vastgesteld. Tesamen impliceren deze gegevens dat het vasculaire endotheel een belangrijk doelwit vormt van de anti-inflammatoire activiteit van adenosine.

In *Hoofdstuk 5* gebruiken we een goed gecontroleerd *in vitro* hypoxie-reoxygenatie model, waarin *in vivo* ischemie-reperfusie wordt nagebootst, om de effecten van hypoxie en reoxygenatie op endotheel activatie en afgifte van adenosine tegelijkertijd te kunnen onderzoeken. We stellen vast dat, hoewel HUVEC morfologisch en functioneel intact blijven onder deze omstandigheden, noch hypoxie noch reoxygenatie van verschillende tijdsduur, pro-inflammatoire activatie van HUVEC induceren, gemeten aan zowel de expressie van de adhesiemoleculen E-selectin, ICAM-1 en VCAM-1, als aan de extracellulaire afgifte van IL-6 en IL-8. Tegelijkertijd echter verhoogt hypoxie op significante wijze de afgifte van adenosine door HUVEC. De afgifte van adenosine door HUVEC tijdens hypoxie kan in hoge mate worden versterkt door de adenosine kinase remmer GP515, hetgeen suggereert dat de potentiële ontstekingsremmende activiteit van het endotheel tijdens hypoxie kan worden versterkt door farmacologisch ingrijpen in het endogene adenosine metabolisme.

In *Hoofdstuk 6* wordt de effectiviteit van de adenosine-regulerende stof GP515 gedurende *in vivo* ischemie-reperfusie bestudeerd aan de hand van de ontstekingsreactie en de microcirculatie in de lever na hemorrhagische shock en resuscitatie in de rat. In onbehandelde ratten die werden onderworpen aan hemorrhagische shock en resuscitatie, was de adhesie van leukocyten aan de sinusoiden sterk verhoogd in de periportale en midzonale gedeelten van de leverlobuli, en waren de sinusoidale diameters aanzienlijk gereduceerd. Behandeling met GP515 voorafgaand aan shock en resuscitatie verminderde daarentegen de leukocyten-adhesie in beide sublobulaire regio's op significante wijze, vergrootte de sinusoidale diameters, en verbeterde de bloeddorstrooming van de sinusoiden enigszins. Deze bevindingen werden vergezeld door een afname van de leverschade twee dagen na shock en resuscitatie. Behandeling met GP515 had geen systemische hemodynamische of hematologische bijwerkingen. We formuleren de hypothese dat de adenosine-regulerende stof

GP515 therapeutische potentie tot bescherming tegen *in vivo* reperfusieschade heeft, doordat het de gunstige ontstekingsremmende en microcirculatoire activiteiten van endogeen adenosine bevordert.

In *Hoofdstuk 7* stellen we dat de recente nieuwe ontdekkingen van ontstekingsremmende eigenschappen van adenosine een nieuwe dimensie hebben toegevoegd aan het begrip "vergeldings-metaboliet", zoals dat oorspronkelijk door Newby werd geïntroduceerd. We hebben vastgesteld dat adenosine de inflammatoire functie van neutrofielen, monocytten en endotheelcellen beïnvloedt. Op grond van zowel de resultaten van de experimenten zoals die beschreven zijn in dit proefschrift, als de gegevens die recentelijk naar voren zijn gekomen uit experimentele studies die door anderen werden verricht, concluderen we dat adenosine remmende activiteit kan hebben op zowel het effector niveau, als het mediators niveau, als het weefsel niveau van ontsteking. Derhalve zou farmacologische verhoging van lokale, endogene adenosine spiegels een aantrekkelijke alternatieve strategie kunnen zijn in de behandeling van ontstekingsreacties, zoals ischemie-reperfusieschade. Tenslotte worden enkele van dergelijke farmacologische interventies in ischemie en reperfusie, en andere inflammatoire aandoeningen, besproken.