

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20899> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Akhtar, Muhammad Tayyab

Title: Cannabinoids and zebrafish

Issue Date: 2013-05-22

SAMENVATTING

Cannabinoïden vormen een groep van terpenofenolische verbindingen die enkel te vinden zijn in de Cannabis plant. (*Cannabis sativa* L). Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) is de psychoactieve cannabinoïde. Het is farmacologisch erkend voor de stimulatie van eetlust en werkt als antiemeticum bij patiënten met chemotherapie en HIV therapie en wordt verder gebruikt voor indicaties zoals pijn, MS, glaucoom en Tourette syndroom. Er is een groeiende belangstelling voor het ontwikkelen van nieuwe derivaten van Δ^9 -THC met een hoge geneeskrachtige waarde. Echter, de hoge lipofiliteit van Δ^9 -THC is een belemmering voor de verdere ontwikkeling van deze verbinding in een farmaceutisch product. Het menselijke lichaam heeft een hoog vetgehalte, niet alleen in het vetweefsel in het lichaam, maar ook in de hersenen en celmembranen. Δ^9 -THC bindt sterk aan plasma eiwitten en aan vetweefsel, waardoor de uitscheiding uit het lichaam significant wordt verlengd. Het is dus noodzakelijk om de polariteit van de cannabinoïden te verhogen om een snelle afgifte uit het lichaam te verkrijgen. Dit proefschrift is gericht op het onderzoek van de mogelijke biotransformatie van cannabinoïden in meer polaire derivaten van Δ^9 -THC door alkaan afbrekende bacteriën en *Catharanthus roseus* plantencellen.

In **hoofdstuk 2** hebben we een bibliotheek van Δ^9 -THC metabolieten ontwikkeld door middel van bioconversies met celculturen van zoogdieren, schimmels, bacteriën en planten. Deze organismen hebben unieke enzymen die de omzetting van Δ^9 -THC mogelijk katalyseren en die op verschillende plaatsen in het molecuul kunnen aangrijpen, en derhalve een bron zijn voor een verscheidenheid van derivaten. Deze verbindingen kunnen worden gebruikt om meer informatie over de farmacodynamiek en farmacokinetiek van Δ^9 -THC te verkrijgen en aldus de weg vrijmaken voor de ontdekking van nieuwe verbindingen met verbeterde therapeutische eigenschappen.

In een poging om sterk polaire derivaten van Δ^9 -THC te genereren hebben we 206 alkaan afbrekende bacteriestammen gescreend. De C5-alkylzijketen bleek de specifieke target site die alkaan afbrekende bacteriën gebruiken om Δ^9 -THC om te zetten in meer polaire derivaten. Met name Gram-positieve stammen van de geslachten *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Gordonia* en *Dietzia* bleken efficiënt in transformatie van Δ^9 -THC. In totaal werden acht derivaten geproduceerd op milligram schaal. Al de eproduceerde transformatie producten hebben een gemodificeerde alkylketes met hydroxy, carboxy en ester functionaliteiten (**hoofdstuk 3**).

Naast micro-organismen, kunnen ook planten celcultures fungeren als biokatalysatoren om complexe biochemische reacties uit te voeren. Het enzymatische systeem van plantencellen kan vaak met succes exogeen toegepaste substraten omzetten naar nieuwe en waardevolle producten met verbeterde eigenschappen met betrekking tot de stabiliteit, bio-activiteit en oplosbaarheid. We onderzochten het potentieel van celsuspensiekweek van *Catharanthus roseus* voor de bioconversie van Δ^9 -THC. Anders dan bacteriestammen, glycosyleren *Catharanthus roseus* cellen Δ^9 -THC. Bovendien hydroxyleren ze cannabinoiden. In de celculture werd Δ^9 -THC ook afgebroken tot cannabinoal (CBN), dat vervolgens ook werd omgezet in zijn geglycosyleerde derivaten. Onze bevindingen suggereren dat micro-organismen en plantencelkweken verschillende cytochroom P450 enzymen bevatten en dat resulteert in verschillende catabole routes hebben voor Δ^9 -THC (**Hoofdstuk 4**).

Het zebrafish embryo bioassay model lijkt zeer geschikt voor high-throughput screening van nieuwe kandidaat-geneesmiddelen. Het maakt snelle, high-throughput en goedkope assays mogelijk, zoals voor het in vroege (pre-regulering) stadia testen van geneesmiddelen en voor gedrags testen. De gedragseffecten van Δ^9 -THC worden gemedieerd door de centrale CB1

receptor. De ontdekking van CB receptoren in zebravis embryo's kan nuttig zijn om meer inzicht te krijgen in de farmacologie van cannabinoïden. Het kan ook nuttig zijn om een aantal onduidelijke aspecten van het cannabinoïden werkingsmechanisme, zoals het fenomeen van mogelijke tolerantie en afhankelijkheid veroorzaakt door cannabinoïd-gebaseerde geneesmiddelen te onderzoeken. We gebruikten kleuringen, visueel motorische respons test en ¹H-NMR gebaseerde metabolomics om de fenotypische, gedrags- en metabole effecten van cannabinoïden in de zebravis embryo's te bestuderen.

Hoofdstuk 5 beschrijft de effecten van het natuurlijke cannabinoïd Δ^9 -THC, en de synthetische cannabinoïden WIN 55,212-2 en CP 55940, en de cannabinoïd antagonist Am 251 op zebravis embryo motorische activiteit. We vonden een significante overeenkomst tussen fysiologische reacties van knaagdieren en zebravis embryo's op deze cannabinoïden. Het zebravis embryo lijkt daarom een betrouwbaar gedragsmodel voor het testen van deze psychoactieve verbindingen.

High-resolution proton nucleaire magnetische resonantie (¹H-NMR) is een ideaal hulpmiddel voor het profileren van de metabolieten in biovloeistoffen, weefsel extracten en zelfs in intacte weefsels. Het is onder andere gebruikt om de biochemische samenstelling van verschillende weefsels te onderzoeken in een organisme en voor het bepalen van geneesmiddeltoxiciteit door analyse van bloedserum, lever en testis van knaagdieren. We hebben met succes ¹H-NMR in combinatie met multivariate data-analyse toegepast voor de metaboliet profilering van zebravis embryos op 5 dagen na bevruchting (5dpf). Blootstelling van embryos aan Δ^9 -THC en AM251 leidde tot een uitgesproken effect op de metabolieten die direct betrokken zijn bij neurotransmissie. De tegengestelde effecten van Δ^9 -THC en AM251 laten zien dat de CB1-receptoren zijn betrokken bij hun werking in deze embryos. Onze resultaten

suggereren dat zebravisembryos kunnen worden gebruikt als modelorganisme om de metabole “footprint” van bepaalde geneesmiddelen (**hoofdstuk 6**) te bestuderen.

In de bioassays worden organische oplosmiddelen gebruikt om hydrofobe test stoffen op te lossen. Water oplosbare verbindingen kunnen eenvoudig worden opgelost in het waterige kweek medium van de verschillende experimentele cellen of organismen. Het is echter belangrijk te weten of het oplosmiddel zelf - inclusief het type buffer - een effect op de organismen, cellen of assay heeft. Daarom hebben we de metabole effecten gemeten van de meest gebruikte organische oplosmiddelen (dimethylsulfoxide, ethanol) en de twee gebruikte waterige buffers (HBSS en EW) waarin zebravis embryos worden gekweekt. Dimethylsulfoxide (DMSO) geeft een significant verlaagd niveau van veel primaire metabolieten. Ethanol heeft daarentegen geen invloed op het embryo's metabool bij de geteste concentraties. Ook beide waterige buffers leiden tot verschillende embryo metabolomen. Tezamen tonen deze resultaten dat een kritische evaluatie van carrier stoffen en waterige media belangrijk is om vals negatieve resultaten te voorkomen. Vooral bij zebravis embryo, heeft DMSO relatief een sterker effect op metabolietvorming dan ethanol heeft. Als drager oplosmiddel dienen DMSO concentraties lager te zijn dan 0,01%. ¹H-NMR gebaseerde metabolomics kan met succes worden toegepast voor het in kaart brengen van metabolische veranderingen, bijvoorbeeld voor de identificatie van markers van stress-geïnduceerde toxiciteit (**hoofdstuk 7**).

Concluderend, in relatie tot de doelstellingen van het proefschrift werd aangetoond dat:

- het gebruik van bacteriën en plantencelcultures is veelbelovend voor de grootschalige productie van polaire derivaten van Δ^9 -THC. Verdere evaluatie

van deze derivaten met betrekking tot hun bindingsaffiniteit voor CB-receptoren zou kunnen helpen bij het begrijpen van de farmacologische eigenschappen van deze polaire metabolieten.

- Bij het volgen van het gedrag van zebravis embryos / larven, met behulp van de visuele motorische respons test bleek dat embryo's een vergelijkbare fysiologische respons geven als knaagdieren na toedienen van cannabinoïden. Dit betekent mogelijk dat de zebravis embryos kunnen worden toegepast in het begin van de drug discovery pijplijn en bij de beoordeling van de veiligheid van geneesmiddelen, zoals bijvoorbeeld voor nieuwe cannabinoïde agonisten en antagonist.

Toekomstperspectieven

Een aantal studies naar de catabole routes van THC in verschillende soorten zoogdieren hebben geleid tot de ontdekking van een groot aantal THC metabolieten. Micro-organismen en plantencel cultures bleken geschikt voor de grootschalige productie van polaire derivaten van THC. Echter, slechts een klein deel van deze THC-derivaten zijn farmacologisch geëvalueerd en de therapeutische mogelijkheden van een groot deel van deze verbindingen moeten nog worden onderzocht. Derivaten met verschillende bindingsaffiniteiten aan CB receptoren of met een relatief zwakke bindingsaffiniteit zijn interessant, met inbegrip van de mogelijkheid om geneesmiddelen te ontwikkelen die specifiek zijn en minder bijwerkingen hebben.

Hoewel zebravis embryos een knaagdier-achtige fysiologische respons hebben op CB1-agonisten en antagonist, moet er nog veel werk worden gedaan om hun mogelijkheden als een alternatief model systeem in de cannabinoïde farmacologie volledig te kunnen beoordelen. Met name de vraag hoe de verschillende functies van de twee bekende cannabinoïdereceptoren bij de mens

zich vertalen naar het zebraavis model is van belang. Onder de problemen die bijzondere aandacht in dit verband vereisen, zijn de aminozuursequentie homologie van zebraavis, menselijke en knaagdieren CB receptoren; de verdeling en expressie van CB-receptoren in verschillende stadia van ontwikkeling van de zebraavis; en de interactie van andere receptoren met de cannabinoïden G-eiwit-gekoppelde receptor 55 (GPR55) in knaagdieren (Pertwee 2007). Toekomstig onderzoek langs deze lijn zou kunnen leiden tot een meer omvattend begrip van de effecten van natuurlijke, synthetische en endogene cannabinoïden in de zebraavis. Bovendien zou een combinatie van moleculaire technieken zoals in situ hybridisatie (ISH), kwantitatieve PCR (qPCR) en de kleuring van embryos niet alleen verder het nut van de zebraavis als modelsysteem bewijzen, maar ook het begrip verbeteren van cannabinoïde geassocieerde effecten in de dierfysiologie.

Tot slot, het gebruik van de zebraavis voor farmacokinetische studies naar nieuwe psychoactieve en niet-psychoactieve cannabinoïden houdt een grote belofte in voor nieuwe geneesmiddelen. Deze belofte zal zeker verder worden versterkt door het combineren van de klassieke genetische methoden, state-of-the-art moleculaire technieken en geavanceerde metabolomics technologieën gebaseerd op NMR of LC / GC-MS met de hoge doorvoer van analyses die zebraavis embryos mogelijk maken.