

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19086> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Hu, Chiuxiu

Title: Systems biology for evaluating system-based medicine

Issue Date: 2012-06-14

Samenvatting

Systeembioologie is een wetenschappelijke discipline die zich richt op de studie van biologische systemen als een geïntegreerd, dynamisch en interactief systeem op het nivo van genen, eiwitten, metabolieten, metabole routes en cellen. De systeembioologische benadering biedt unieke mogelijkheden tot een holistisch begrip van (patho)fysiologische processen. Eén van de hoekstenen van de systeembioologie is de studie van het metabooloom; de verzameling van alle metabolieten (producten van de stofwisseling) in een cel, orgaan, lichaamsvloeistof of organisme. Metabolomics richt zich op het gedetailleerd in kaart brengen (zowel kwalitatief, kwantitatief en functioneel) van het metabooloom.

Dit proefschrift beschrijft een systeembioologisch onderzoek naar de therapeutische effecten van enkele moderne Westerse geneesmiddelen als well van complexe traditionele (kruiden)geneesmiddelen. Daarbij zijn (dier)modelsystemen gebruikt die gerelateerd zijn aan het zgn. metabool syndroom (o.a. het zgn. hoog-vet dieet geïnduceerde zwaarlijvigheidsmodel en een genetisch gemanipuleerde suikerziekte). Qua metabolieten ligt de focus in dit onderzoek op de lipiden. *Lipidomics* is een onderdeel van metabolomics waarin men streeft naar een zo breed mogelijke beschrijving en functionele modelering van de in het biologische systeem aanwezige lipiden. Momenteel is lipidomics een wetenschappelijk *hot topic* vanwege het brede (patho-)fysiologische belang van de lipiden en vanwege de recente technologische ontwikkelingen op het gebied van de analyse van de lipiden. Het doel van het hier beschreven onderzoek is het verkrijgen van een dieper inzicht, vanuit een holistisch perspectief, in de effecten en werkingsmechanismen van beide therapeutische strategieën op het metabool syndroom. Deze aanpak gaat dan tevens gepaard met een kritische evaluatie van de potentie van “omics” technologieën in systeembioologische strategieën.

In **hoofdstuk 2** worden de vereisten en uitdagingen voor de analyse van zeer complexe lipidenmengsels uit biologische monsters als lichaamsvloeistoffen, cellijnen en weefsels beschreven. Voor de brede lipidomics aanpak zijn de gerapporteerde analytische strategieën samengevat in het kader van hun toepassingen in biomarker en interventie onderzoek. Aan de hand van een studie naar de relatie tussen fysiologie/phenotype en de samenstelling van de plasmalipiden wordt de kracht van multivariate statistische data analyse geïllustreerd.

Hoofdstuk 3 beschrijft de ontwikkeling van een nieuwe, volledig gevalideerde methode voor de profilering van lipiden in humaan en dierlijk plasma. De analytische karakterisering (validatie) bevestigt de betrouwbaarheid en toepasbaarheid van de methode voor de routine-analyse van complexe mengsels van lipiden: de methode is *high throughput* (honderden lipiden per analyse) en snel (minder dan 30 minuten analysetijd). Andere belangrijke karakteristieken zijn: lineariteit (R^2 , 0.994–1.000), detectielimiet (0.08–1.28 $\mu\text{g/ml}$ plasma), *intra-day* herhaalbaarheid (RSD, 3–8%), *inter-day* herhaalbaarheid (RSD, 3–16%), en extractieopbrengsten voor LPCs 80–85%; PGs 67–71%; PCs 91–105%; PEs, 90–100% en TG 94–105%). Deze methode is op diverse punten beter dan eerder gerapporteerde methoden, onder andere in verminderd monsterverbuik (15–30 μl) en kortere analysetijd (18 min

chromatografie-tijd) met een betere en reproduceerbaardere scheiding van de lipiden. De methode is vervolgens succesvol toegepast in een studie naar de fenotypische effecten van p53 expressie in p53 gemuteerde transgene muizen. Met deze studie is het lipidomics analytisch platform in de praktijk van biomarker onderzoek in het kader van ziektepreventie en gezondheidsbevordering getest en gevalideerd.

In **hoofdstuk 4** is het lipidomics platform toegepast in een studie naar de effecten op de glycaemische regulatie en lipiden huishouding in een Goto-Kakizaki (GK) rattenmodel met spontane type 2 diabetes (T2D); dit na een negen-weekse behandeling met een enkelvoudig geneesmiddel (*i.e.* metformin) of met een bekend, multicomponenten kruidengeneesmiddel (ginsengwortel, *Panax ginseng Radix*). Hierbij werden naast de lipiden en diverse biochemische parameters, ook de samenstelling van de ginsengwortels (in relatie tot de ouderdom van de wortel) bepaald met behulp van vloeistof chromatografie-massaspectrometrie (LC-MS). Een hypothese is dat de bioactiviteit van de ginsengwortel ten aanzien van de glycaemische regulatie en het lipidenmetabolisme, gerelateerd is aan de leeftijd van de wortel. De resultaten tonen aan dat behandeling met 4- en 6-jaar oude ginsengwortel significante verbetering gaf in het glucosemetabolisme, en dat behandeling met 5 jaar oude ginsengwortel significante verhoging in HDL (high density lipoprotein cholesterol) te zien gaf ten opzichte van onbehandelde controles. Behandeling met 6 jaar oude ginseng verlaagde het totaal TG en VLDL-C en verbeterde het plasma geglycoliseerde hemoglobine niveau. In het perspectief van lipidomics, behandeling met 4- tot 6-jaar oude ginsengwortel beïnvloedde het plasma lipiden metabolisme in diabetische GK ratten door het verlagen van TG lipiden. Metformin verlaagde significant de nuchtere bloed glucose spiegels en verlaagde het HbA1c, maar had geen effect op de plasmalipiden. Deze resultaten tonen aan dat ginseng een wortel-ouderdoms afhankelijk therapeutisch effect heeft op hyperlipidemie en hyperglycemie in diabetische GK ratten. Dit leeftijdsafhankelijke effect hangt mogelijk samen met de variatie in, en concentratieratio's van, de specifieke, bioactieve ginsenosides. Nader onderzoek aan de medicinale werking van de gezuiverde, individuele bioactieve componenten, en die van diverse combinaties, is noodzakelijk om het exacte mechanisme van de waargenomen multi-dimensionale therapeutische effecten van ginsengwortel op T2D te ontrafelen. Deze studies zouden kunnen leiden tot de ontwikkeling van een nieuwe klasse geneesmiddelen voor de behandeling van diabetes. Tevens zal dit onderzoek bijdragen in de inzichten en eisen in de kwaliteitscontrole van Fytogeneesmiddelen bij de ontwikkeling van nieuwe therapeutische producten

In **hoofdstuk 5** is het lipidomics platform toegepast ter karakterisering en kwantificering van plasma lipiden van apolipoproteïne E3 Leiden cholesteryl ester transfer protein (ApoE*3Leiden.CETP) transgene muizen die onderworpen werden aan een dieet met hoog vetgehalte. Bestudeerd werd het effect van een 4-weekse behandeling met rimonabant (ten opzichte van een onbehandelde controle). Biochemische lipide parameters en lipoproteïne-profielen werden ook voor deze studie bepaald. Rimonabant-behandeling leidde tot een significante afname van het lichaamsgewicht, een significante verlaging van totaal cholesterol in plasma en een sterke aanwijzing tot afname in plasma triglyceriden. *Principle component analysis* (PCA) van de plasma lipidomics dataset (per muis werden 131

verschillende lipiden bekeken) geeft een duidelijke clustering van de beide groepen te zien. Zes plasmalipiden werden geïdentificeerd als zijnde meest significant in de respons op de rimonabant behandeling. Na een intensieve validatie van de methode, werd het lipidomics analytisch platform ook toegepast voor de bepaling van lipiden in de lever. Evenals in het plasma, gaven de lipidenprofielen van de levers (op basis van 133 verschillende lipiden) een duidelijke clustering te zien van rimonabant behandelde en onbehandelde ApoE*3Leiden.CETP transgenene muizen. Drie lipiden, die het meest bijdroegen aan deze clustering, werden geïdentificeerd. De relatief kleine verschillen in lipidenprofielen kan mede gerelateerd zijn aan het vroege stadium van obesitas in de proefdieren. De resultaten van de plasma- en levermetingen geven aan dat de effecten van rimonabant op het lichaamsgewicht en de cardiovasculaire risicofactoren gematigd zijn in geval van een vroeg stadium obesitas.

Gezien de complexiteit en de multi-factoriele manifestaties van het metabool syndroom, loopt een therapeutische strategie met een enkele chemische stof waarschijnlijk snel tegen zijn beperkingen aan, zeker in het licht van het complexe, gereguleerde netwerk van een “ziek” biosysteem. Om deze reden staat combinatietherapie, aangrijpend op multiple targets met daarbij geen of geringe bijwerkingen, nu zeer in de belangstelling.

In **hoofdstuk 6** zijn de effecten van een multi-component, Multi target preparaat (SUB885C) op plasma- en leverlipidemetabolism in ApoE*3Leiden.CETP transgenic mice model met vroeg metabool syndroom onderzocht. Onderzocht is (1) de therapeutische effecten van behandeling met SUB885C op het lichaamsgewicht en de lipiden metabolisme, (2) de mogelijke relatie tussen cholesteryl ester transfer protein (CETP) en SUB885C geïnduceerde regulatie van lipiden en lipidenprofielen, (3) de activiteit van SUB885C in een cannabinoid-1 receptor binding affinity assay en in lipogenesis. De resultaten toonden aan dat behandeling met SUB885C geen effect heeft op voedselinname of lichaamsgewicht, maar wel significante verlaging gaf van het plasma cholesterol en triglyceride, van de plasma CETP spiegels en CETP activiteit, en een significante toename gaf in HDL-C. De toename in HDL-C na behandeling met SUB885C kan het gevolg zijn van de afname in CETP spiegels en CETP activiteit of van de verlaagde spiegels van VLDL-TG, welke de activiteit kan verminderen van CETP transfer activiteit door vermindering van de transfer van cholesteryl van HDLs naar TG-verrijkte lipoproteïnen, met als gevolg meer cholesterol-verrijkte HDL deeltjes. Tevens geeft SUB885C extract *in vitro* aanleiding tot adipolysis stimulering en remming van adipogenesis in 3T3-L1 cells. De experimenten beschreven in dit hoofdstuk, met nieuwe preparaten die zich bevinden op het grensvlak van voeding en geneesmiddel, tonen aan dat deze gebruikt kunnen bij de preventie van metabool syndroom of ter vermindering van de eerste symptomen. Dit werk demonstreert ook dat een systeembioïologische/lipidomics aanpak veelbelovend is bij het ontrafelen van therapeutische effecten en bij het vinden van nieuwe targets en nieuwe ingrediënten voor medicatie.

Concluderend, de onderzoeken beschreven in dit proefschrift laten zien dat een systeembioïologische /lipidomics benadering, in combinatie met passende bioinformatica ontwikkelingen, onmisbare gereedschappen zijn voor een holistische beschrijving van de dynamische metabole respons van levende systemen (van homeostase, via sub-optimale gezondheid tot uiteindelijke dysfunctie) op biologische stimuli, genetische modificatie en

therapeutische interventies. Dit soort onderzoek biedt uitzicht op het ontdekken van lipide-biomarkers in relatie to gezondheidsbevordering en ziektepreventie en verdiept daarbij het inzicht in van complex gereguleerde mechanismen in mens en dier. De introductie van de systeembioologische denkwijze zal niet alleen leiden tot dieper inzicht in multi-target synergistische effecten (welke nog nauwelijks gebruikt worden in de moderne geneeskunde), maar kan het ook een brug vormen tussen Chinese (multi-target) geneeswijzen en de Westerse geneeskunde (moleculaire farmacologie).