

Samenvatting

Het ontwikkelen van geneesmiddelen is de afgelopen decennia een steeds grotere uitdaging geworden. Om de kans op klinische successen te verhogen, is het belangrijk om in vroege fases van geneesmiddelontwikkeling inzicht te verkrijgen in de relatie tussen het werkingsmechanisme van een geneesmiddel en de dynamiek van een ziekte. Systeembioïologie (*systems biology*) is een interdisciplinair onderzoeksveld dat de relatie tussen verschillende biologische elementen, zoals genen, eiwitten en metabolieten, onderzoekt. Dit is belangrijk gebleken bij het bestuderen en begrijpen van complexe biologische systemen, inclusief ziektemechanismen. Systeemfarmacologie (*systems pharmacology*) ontleent concepten aan de systeembioïologie door integrale netwerken te kwantificeren die de interacties tussen ziekteverloop en geneesmiddeleffecten in kaart brengen. Op deze wijze kan vroegtijdig het inzicht vergroot worden in de up- en downstream effecten van behandelingen met geneesmiddelen, wat bewezen is van groot belang te zijn voor geneesmiddelontdekking en -ontwikkeling. Bij het ontwikkelen van systeem-farmacologische modellen kan gebruik worden gemaakt van metabolomics netwerken, hierbij worden tientallen of honderden metabolieten gemeten en via metabole routes verbonden aan andere -omics metingen om zo het ontstaan en de modulatie van endogene metabolieten te beschrijven.

In dit proefschrift ligt de focus op het endocannabinoïde systeem (ECS). Het ECS is een signaleringsnetwerk dat betrokken is bij verscheidene fysiologische en pathofysiologische processen. De ontwikkeling van geneesmiddelen gericht op het ECS heeft een laag slagingspercentage, onder meer door de complexe interacties van dit systeem op diverse plaatsen in het lichaam. Metabolomics methoden gebaseerd op vloeistofchromatografie–massaspectrometrie (LC-MS) zijn in dit proefschrift gebruikt voor het in kaart brengen van profielen van de endocannabinoïden (eCBs) en eCB gerelateerde moleculen. Om meer inzicht te krijgen in de regulatie van het ECS en gerelateerde metabole routes, zijn twee LC-MS methoden (platformen) ontwikkeld en geoptimaliseerd, met enerzijds een brede dekking van de ECS gerelateerde metabolieten en anderzijds hoge gevoeligheid voor metabolieten die in lage concentraties aanwezig zijn. Deze platformen zijn toegepast in klinische studies naar cardiometabole aandoeningen en de resultaten wezen op een correlatie tussen deze ziekten, endogene metabole signalering en de voordelen van voldoende lichaamsbeweging.

De eerste twee experimentele hoofdstukken beschrijven de twee ontwikkelde LC-MS methoden die elk een specifieke doel hebben. Hoofdstuk 2 beschrijft de ontwikkeling van het LC-MS platform dat metabolieten van de voornaamste metabole ECS routes kwantificeert in lysaat van muizenhersenen. De gemeten moleculen vallen in de volgende klassen: N-acyl-phosphatidylethanolamines (NAPEs), plasmalageen-NAPEs (pNAPEs), 2-lyso-N-acyl-phosphatidylethanolamines (lyso-NAPEs), glycerol-phospho-acylethanolamines (GP-NAEs), lyso-pNAPEs, N-acylethanolamines (NAEs), diacylglycerolen (DAGs), 2-acyl-glycerolen (2-AcGs) en vrije vetzuren (FFAs). De chromatografische scheiding is gebaseerd op een ternaire gradiënt, waardoor het mogelijk was om alle genoemde metabolietklassen gezamenlijk te meten met een enkele injectie. De identificatie van de individuele metabolieten is gedaan met behulp van zogeheten retentietijd (RT) *mapping*. De inzet van deze strategie vergroot het vertrouwen in de identificatie van, in het bijzonder, metabolieten met meerdere vetzuurstaarten, zoals NAPEs, terwijl het aantal interne standaarden beperkt blijft. De ontwikkelde methode is toegepast op monsters van verschillende studies die de rol van enzymen in het ECS onderzochten en/of het effect van inhibitors gericht op enzymen in het ECS evalueerden (dit is niet beschreven in dit proefschrift).

Zeer gevoelige methoden zijn nodig voor het meten van metabolieten met lage endogene concentraties. Hoofdstuk 3 beschrijft de ontwikkeling van een zeer gevoelige micro-LC-MS methode voor het meten van eCBs in menselijk hersenvocht (liquor), wat met name voor anandamide (AEA) van belang is, omdat de concentraties van dit molecuul in liquor onder de detectielimieten vielen van conventionele LC-MS methoden. Een vloeistofstroomsnelheid van 4 $\mu\text{L}/\text{min}$, 100 keer lager dan bij conventionele LC-technieken, was optimaal in termen van looptijd en scheiding. Door de beperkte kolomcapaciteit van micro-LC systemen, kan maar een klein monstervolume geïnjecteerd worden. Om de negatieve gevolgen hiervan te beperken, is voor deze toepassing een injectie uitgevoerd met een oplosmiddel dat meer polair is dan de mobiele fase aan de start van het gradiënt, zodat er een relatief groot volume geïnjecteerd kon worden (3 μL) en tegelijkertijd een adequate piekvorm behouden werd. Al deze verbeteringen culmineerden in een 20 keer hogere gevoeligheid voor het kwantificeren van eCBs ten opzichte van conventionele methoden.

In de daarop volgende hoofdstukken zijn de ontwikkelde LC-MS methoden toegepast op monsters van klinische studies met betrekking tot cardiometabole gezondheid. De relaties tussen

bloedplasmawaarden van de eCBs, eCB analogen (Hoofdstuk 4) en oxylipinen (Hoofdstuk 5) en de klinische parameters lichaamssamenstelling en cardiometabole risicofactoren (CMR), zijn bestudeerd. In een cohort van jonge volwassenen met een inactieve levensstijl, waren de bloedplasmawaarden van de meeste eCBs, eCB analogen en meerdere omega-6 oxylipinen, positief gecorreleerd met steatose (vervetting) en traditionele CMR factoren, terwijl de bloedplasmawaarden van enkele omega-3 oxylipinen daar juist negatief aan gecorreleerd waren. Stapsgewijze lineaire regressie modellen laten zien dat sommige eCBs, eCB analogen en oxylipinen de voorspelling van verscheidene parameters voor lichaamssamenstelling en CMR factoren kunnen verbeteren. Deze metaboliëtklassen zouden daarom verder onderzocht moeten worden, om hun potentie als vroege diagnostische biomarker voor CMR vast te stellen.

In Hoofdstuk 6 zijn de onderliggende moleculaire mechanismen van het positieve effect van lichaamsbeweging op cardiometabole gezondheid onderzocht. Zowel duursport als krachtsport zorgen voor een directe verhoging van de eCBs, eCB analogen en oxylipinen in bloedplasma tijdens het sporten. Dit suggereert dat deze metaboliëten mogelijk betrokken zijn bij acute inflammatoire reacties die veroorzaakt worden tijdens het sporten. Daarentegen blijken basislijn plasmaconcentraties van de eCBs, eCB analogen en het aminozuurderivaat omega-6 oxylipine verlaagd te zijn na 6 maanden gematigd sporten. Deze verlaging suggereert een vermindering van systemische ontsteking. Deze resultaten, tezamen met die beschreven in Hoofdstuk 4 en 5, verklaren mogelijk de positieve effecten van regelmatig sporten op de cardiometabole gezondheid.

Concluderend, dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling van metabolomics methoden en demonstreert de mogelijkheid om hiermee complexe biologische systemen te bestuderen. Er zijn nog steeds talrijke uitdagingen voordat deze methoden optimaal ingezet kunnen worden in klinische studies en geneesmiddelenonderzoek. Bij de monstervoorbewerking moet bijvoorbeeld de stabiliteit van metaboliëten gegarandeerd kunnen worden, daarom moet er een standaardmethode worden ontwikkeld voor het afnemen en daarna hanteren van de monsters. Daarbij moeten de verschillende omstandigheden als het antistollingstype van het bloedplasma bij afname, de temperatuur tijdens het hanteren van de monsters en het aantal vries-dooi cycli geoptimaliseerd en gecontroleerd worden. In de sample analyse moeten monstervoorbewerking en LC-MS instellingen worden geoptimaliseerd en zouden zich herhalende stappen uit de workflow moeten worden geautomatiseerd. Hierdoor zou een hogere

robuustheid en doorlooptijd mogelijk moeten zijn. Tegelijkertijd is het automatiseren van de datavoorbewerking belangrijk en hieruit voortvloeiend kunnen richtlijnen voor het controleren en de kwaliteitsgarantie van de metabolomics data worden uitgeschreven. De standaardisatie van alle mogelijke stappen garandeert de efficiëntie en kwaliteit van metabolomics methoden. Daarnaast zoude de metabolomics methoden beter geïntegreerd moeten worden in het geneesmiddelenonderzoek. Dit kan bijvoorbeeld door metaboliet- en geneesmiddelspiegels tegelijkertijd te meten om zo naast blootstelling ook informatie te krijgen over geneesmiddelbinding (*target binding*) en -werking (*efficacy*). Het integreren van deze data met de overige -omics data kan leiden tot een zeer compleet beeld van de pathofysiologische interacties tijdens een ziekteverloop en op deze manier kunnen we tevens inzicht verkrijgen in de interacties tussen ziekteprocessen en geneesmiddeleffecten.