

Nederlandse samenvatting

Ziekte van Parkinson

De ziekte van Parkinson is een progressieve neurodegeneratieve ziekte, die vooral gekenmerkt wordt door verstoring van de motoriek. De drie belangrijkste symptomen zijn tremoren in rust, stijfheid van de ledematen en de afwezigheid van onbewuste bewegingen. Andere vaak voorkomende kenmerken zijn traagheid en verkleining van bewegingen en problemen met het starten van de bewegingen. Niet motorisch gerelateerde verschijnselen zoals dementie en depressie komen ook vaker voor bij patiënten met de ziekte van Parkinson. De gemiddelde leeftijd waarop de ziekte wordt gediagnosticeerd is 55 en het aantal gevallen neemt toe naar mate de leeftijd stijgt. Het geschatte aantal patiënten in Nederland is 60.000.

Pathologisch wordt de ziekte vooral gekenmerkt door het afsterven van neuronen in een klein gebied in de hersenstam, de substantia nigra. Deze neuronen geven dopamine af aan de basale ganglia. De basale ganglia zijn onderling verbonden hersengebieden die verantwoordelijk zijn voor de planning en uitvoering van bewegingen. In een gezonde situatie worden de bewegingen geïnhibeerd door de basale ganglia. Bij de juiste input (dopamine) wordt dit tijdelijk opgeheven waardoor er een beweging uitgevoerd kan worden. Door de verminderde dopaminerge input bij de ziekte van Parkinson, wordt de inhibitie van de basale ganglia versterkt. Dit heeft grote invloed op de uitvoering van bewegingen en resulteert in de voor de ziekte van Parkinson kenmerkende verslechterde motoriek.

Naast het afsterven van de neuronen zijn er, bij patiënten met de ziekte, eiwitophopingen in de neuronen gevonden en ook andere neurotransmittersystemen zijn, hetzij in mindere mate, aangedaan.

Bij de meeste patiënten met de ziekte van Parkinson is de oorzaak onbekend. Vijf procent van de patiënten heeft een genetische vorm van de ziekte van Parkinson. Tevens is bekend dat sommige toxische stoffen waaronder bepaalde bestrijdingsmiddelen Parkinson-achtige verschijnselen kunnen veroorzaken. Men denkt daarom dat een combinatie van genetische gevoeligheid en omgevingsfactoren resulteren in het ontstaan van de ziekte.

Er is een breed spectrum aan medicijnen ontwikkeld die de motorische symptomen kunnen verminderen. Een veelgebruikt geneesmiddel is levodopa. Deze stof wordt in de hersenen omgezet in dopamine, zodat de dopamine tekorten aangevuld kunnen worden. Dopamine agonisten worden ook veel gebruikt. Dit zijn stoffen die hetzelfde effect kunnen genereren als dopamine door aan de dopamine receptoren binden.

Het grootste nadeel van de huidige medicatie, naast het feit dat deze medicatie de progressie van de ziekte niet stopt, is dat langdurig gebruik resulteert in ontwikkeling van versturende bijwerkingen.

Naast het verbeteren van de huidige therapeutische medicatie wordt er onderzoek

gedaan naar methoden die de degeneratie tegen kunnen gaan. Ontwikkeling en onderzoek naar neuroprotectieve stoffen is veelbelovend. Bij neuroprotectie is het doel de cel te beschermen door middel van ingrijpen in de schadelijke processen die leiden tot celdood. Er is nog geen neuroprotectieve stof gevonden die effectief is bij Parkinson patiënten. Verder onderzoek is dus nodig. Een ideaal neuroprotectief werkende stof zou de complexe celdood processen moeten kunnen aanpakken via meerdere werkingsmechanismen. Uit de literatuur blijkt dat de stoffen modafinil en Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) dit potentieel hebben. Een bijkomend voordeel is dat deze stoffen in de kliniek bekend zijn dus bij bewezen effectiviteit gemakkelijk toegepast kunnen worden. Onderzoek naar de neuroprotectieve eigenschappen, maar ook de therapeutische effecten van deze stoffen bij de ziekte van Parkinson is dan ook het hoofdonderwerp van dit proefschrift.

Modafinil

Modafinil is een alertheidbevorderende stof. Het wordt onder andere voorgeschreven bij narcolepsie patiënten. Hoewel het precieze werkingsmechanisme van modafinil niet bekend is, wordt het wel geassocieerd met toename in activiteit van neurotransmitters als noradrenaline, glutamaat en hypocretine. Verder zijn afname in activiteit van de neurotransmitter GABA, en effecten op het dopaminerge systeem bekend. Op basis van dit brede spectrum aan effecten zou modafinil mogelijk ook de Parkinson effecten kunnen reduceren. Naast de therapeutische effecten is modafinil ook neuroprotectief in verschillende *in vivo* en *in vitro* neuronale schade modellen, waaronder specifieke schade in de verbinding tussen de substantia nigra en het striatum die leidt tot Parkinson symptomen.

Δ^9 -THC

Δ^9 -THC is een van de werkzame stoffen uit de bladeren en bloemknoppen van marihuana. Δ^9 -THC is vooral bekend van het opwekken van euforische gevoelens en veranderingen in cognitie via het cannabinoid systeem. Het cannabinoid systeem bestaat uit twee receptoren, de cannabinoid CB_1 en CB_2 receptor waarvan in de hersenen de eerstgenoemde het meeste voorkomt. Stimulatie van die receptoren met onder andere Δ^9 -THC leidt tot modulerende effecten op de afgifte van neurotransmitters als glutamaat, GABA en dopamine. Van cannabinoiden in het algemeen, maar Δ^9 -THC specifiek is aangetoond dat ze therapeutische effecten kunnen hebben. Ze reduceren bijvoorbeeld spasticiteit bij multipale sclerose en zijn als eetlustopwekker toepasbaar bij chemotherapie of bij HIV patiënten. Cannabinoiden hebben ook neuroprotectieve eigenschappen zoals bewezen in diverse modellen van neuronale schade. Een anti-oxidatieve werking of effecten via receptorstimulatie zijn onder andere gesuggereerd als neuroprotectief mechanisme. De positieve resultaten en het brede werkingsmechanisme tonen het neuroprotectieve potentieel van Δ^9 -THC tegen de ziekte van Parkinson.

Diermodel

Het onderzoek in dit proefschrift is experimenteel van aard en kan niet getest worden in patiënten met de ziekte van Parkinson. Als alternatief is er gebruik gemaakt van twee veelgebruikte diermodellen voor de ziekte van Parkinson, het niet-humane primaat (marmoset) en het muis MPTP model. Toediening van het neurotoxine 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) resulteert in degeneratie van de dopaminerge neuronen in de substantia nigra. Deze methode is veel gebruikt in experimenteel onderzoek naar de ziekte van Parkinson. Een beperking is wel dat de ziekte acuut wordt geïnduceerd en dat er geen sprake is van progressieve celdood. Het marmoset model wordt vooral gebruikt wanneer er gekeken wordt naar gedragsmatige effecten van een behandeling voor parkinsonisme. De marmosetten laten namelijk, na toediening van MPTP, Parkinson-achtige symptomen zien, die bijna identiek zijn aan symptomen van de patiënten. Hierdoor kan in een marmoset, een behandelingseffect specifiek gemeten worden. Muizen laten echter kortstondige gedragsmatige effecten zien na toediening van het neurotoxische MPTP, hoewel er wel celdood plaatsvindt. Dit model kan dus goed gebruikt worden wanneer er vragen over het werkingsmechanisme van celdood zijn.

Inhoud proefschrift

Dit proefschrift bestaat uit drie delen. Het eerste deel bestaat uit onderzoek naar effecten van modafinil en Δ^9 -THC bij gezonde marmosetten. Het tweede deel beschrijft het onderzoek naar de symptomatische effecten van modafinil en Δ^9 -THC bij marmosetten met Parkinson symptomen. Het derde deel beschrijft onderzoek naar de neuroprotectieve eigenschappen van modafinil en Δ^9 -THC en onderzoek naar het neuroprotectieve werkingsmechanisme van modafinil.

Effecten van modafinil en Δ^9 -THC op gedrag

In *hoofdstuk 2* is er onderzocht wat de gedragseffecten van modafinil zijn in een gezonde marmoset. Twee uur na orale toediening van modafinil in doseringen 50, 100, 150 en 225 mg/kg zijn de dieren getest in diverse gedragstesten. Een toename van locomotor activiteit was gevonden in doseringen hoger dan 100 mg/kg in de Bungalow test en op de activiteitsparameters van de human threat test. Modafinil toediening leidde ook tot reductie van angst gerelateerde gedragingen gemeten met de human threat test. Modafinil veroorzaakte geen veranderingen in de gedragingen gescoord met behulp van observatielijsten en had ook geen effect op de startle reflex en de hand-oog coördinatie. Er is geconcludeerd dat naast psychostimulatie, modafinil geen andere bijwerkingen veroorzaakt binnen de gemeten parameters. De angstverlagende effecten van modafinil kunnen mogelijk een nieuwe therapeutische toepassing van modafinil vormen.

Het onderzoek naar de gedragseffecten van modafinil wordt in *hoofdstuk 3*

uitgebreid met een studie naar de mogelijkheid of modafinil de negatieve gevolgen van slaapdeprivatie zoals vermoeidheid, verminderde alertheid en verslechterde taakuitvoering kan tegengaan. De effecten zijn vergeleken met de effecten van de alertheidbevorderende stof, cafeïne. De dieren zijn na een normale actieve dag, gedurende een nacht wakker gehouden en met de alertheidverhogende stoffen of een vehicle behandeld. Drie maal gedurende de slaapdeprivatie nacht zijn de dieren getest in de Bungalow test om de mate van vermoeidheid te testen en in de hand-oog coördinatie taak om de effecten op taakuitvoering te meten.

De resultaten toonden dat beide stoffen in staat waren om de verslechterde taakuitvoering als gevolg van de slaapdeprivatie in zekere mate tegen te gaan. Modafinil hield de activiteit op een niveau die vergelijkbaar was zonder slaapdeprivatie, maar kon de taakuitvoering niet de gehele nacht op niveau houden. Cafeïne was echter in staat om de taakuitvoering op een niveau te houden van voor slaap deprivatie, maar de activiteit verslechterde wel gedurende de slaapdeprivatie nacht. Chronisch gebruik van de stoffen verslechterde de effecten niet. Er is dan ook geconcludeerd dat modafinil en cafeïne beide in staat zijn om in zekere mate de vermoeidheid en verslechterde taakuitvoering als gevolg van slaapdeprivatie tegen te gaan.

In *hoofdstuk 4* zijn de gedragseffecten van orale toediening van Δ^9 -THC in de marmoset onderzocht. De dieren zijn 30 en 90 minuten na toediening van Δ^9 -THC in de doseringen van 2, 4 en 8 mg/kg getest op activiteit gerelateerd gedrag, taakuitvoering en emotioneel gerelateerd gedrag. 4 en 8 mg/kg Δ^9 -THC veroorzaakten apathie, onvrijwillige bewegingen van de romp en onderste ledematen, traagheid in beweging en verslechtering van de balans bij het springen. Δ^9 -THC verlaagde tevens de emotionele respons zoals aangetoond met een verlaging van de startle reflex en vermindering van angst gerelateerd gedrag tijdens de human threat test. Δ^9 -THC reduceerde na de doseringen 2 en 4 mg/kg de activiteit, maar dit is afhankelijk van de toegepaste test, de Bungalow test of parameters van de human threat test. De conclusie is dan ook dat orale Δ^9 -THC in de marmoset resulteert in dosis afhankelijke effecten op de activiteit, startle respons en angst gerelateerd gedrag.

Parkinson symptoom bestrijdende effecten van modafinil en Δ^9 -THC

In *hoofdstuk 5* is onderzocht of modafinil en Δ^9 -THC in staat zijn de Parkinson symptomen te reduceren in een MPTP behandelde marmoset. Reden is dat beide stoffen mogelijk een bijdrage kunnen leveren in het huidige medicatie spectrum omdat beide stoffen indirect de dopamine release kunnen beïnvloeden. In het onderzoek zijn modafinil (100 mg/kg), Δ^9 -THC (4 mg/kg) of een vehicle toegediend bij dieren met Parkinson symptomen. Vervolgens zijn de dieren geobserveerd met behulp van scoringsschalen voor Parkinson symptomen en het effect op beweging is gekwantificeerd met een locomotor activiteit test en de hand-oog coördinatie test. Δ^9 -THC toediening resulteerde in verbeterde activiteit en hand-oog coördinatie, maar ook Δ^9 -THC gerelateerde bijeffecten zijn geobserveerd. Modafinil resulteerde in verbeterde activiteit en afname van Parkinson symptomen, maar niet in verbetering van de hand-oog coördinatie. Er kan geconcludeerd worden dat beide stoffen

therapeutisch eigenschappen hebben en daarom een toevoeging kunnen zijn aan het huidige medicatiespectrum.

Neuroprotectieve effecten van modafinil en Δ^9 -THC

In de hoofdstukken 6 en 7 staan het onderzoek naar de neuroprotectieve effecten van modafinil in het MPTP marmoset model voor de ziekte van Parkinson beschreven. Bij twee groepen marmosetten werden de Parkinson verschijnselen geïnduceerd met MPTP. Tegelijkertijd met de start van de ziekte inductie kreeg de ene groep een dagelijkse behandeling met modafinil gedurende 27 dagen. De andere groep kreeg in plaats van modafinil, vehicle toegediend. De ernst van de symptomen werd dagelijks gescoord en gedragstesten die de activiteit, hand-oog coördinatie, kleine snelle bewegingen, angst gerelateerde gedragingen en startle response meten werden een aantal maal gedurende de onderzoeksperiode toegepast. Voor ziekte inductie en twee maal na ziekte inductie werden veranderingen in de hersenen gemeten met behulp van MRI scans. Aan het einde van het experiment werden de post-mortem hersenen gebruikt voor quantificatie van de overlevende neuronen door middel van immunohistochemie en analyse van de neurotransmitter niveaus in het striatum.

De toepassing van een dergelijk breed scala aan meetmethodes levert een veelheid aan informatie op binnen een dier. Metingen binnen een dier versterken ook de waarde van de uitkomst.

De modafinil behandeling resulteerde in een verhoogde overleving van de neuronen ten opzichte van de vehicle behandelde dieren. Het functioneren van de neuronen door middel van meting van de neurotransmitter niveaus toonden ook een betere neuronale functie van de modafinil behandelde groep. Deze resultaten zijn ook bevestigd met de MRI scans. Op gedragsniveau resulteerde de modafinil behandeling in verminderde aanwezigheid van de Parkinson symptomen.

Uit dit experiment kan geconcludeerd worden dat modafinil in staat is om de cellen in het MPTP model te beschermen en dus potentie heeft als neuroprotectieve therapie bij de ziekte van Parkinson.

Er is weinig bekend over het neuroprotectieve werkingsmechanisme van modafinil. Er wordt gesuggereerd dat modafinil direct ingrijpt op de celdood processen, maar modafinil kan ook indirect effect hebben door de genexpressie te beïnvloeden, welke effect heeft op de productie van eiwitten die een rol spelen in de celdood processen. In hoofdstuk 8 is de mogelijkheid van neuroprotectie via indirecte effecten van modafinil onderzocht op twee manieren. De eerste methode is een onderzoek in het MPTP muis model waarbij 12 uur voor de inductie van de Parkinson verschijnselen modafinil is toegediend. Op dat tijdstip is modafinil uit het lichaam verdwenen en alleen secundaire effecten van modafinil zouden de schade door MPTP tegen kunnen gaan. De praktijk wees uit dat deze theorie niet klopte. De tweede methode is het meten van de effecten van modafinil op de genexpressie van humane astrocyten. Met behulp van microarrays zijn de mogelijke modafinil geïnduceerde veranderingen op cytokines en chemokines geïnventariseerd. De resultaten toonden dat modafinil geen duidelijke direct effecten heeft op de genexpressie. Uit deze twee experimenten kan geconcludeerd worden dat de neuroprotectieve effecten van

modafinil hoogstwaarschijnlijk niet via indirecte effecten wordt bewerkstelligd.

In *hoofdstuk 9* staat het onderzoek beschreven naar de neuroprotectieve werking van Δ^9 -THC in het marmoset MPTP model. De proefopzet was gelijk aan die van modafinil zoals is beschreven in hoofdstuk 6 en 7. De orale Δ^9 -THC (4 mg/kg) toediening was niet in staat de neuronen te beschermen tegen de schade door MPTP. Dit in tegenstelling tot onderzoek in een 6-OHDA rat model waarbij was aangetoond dat Δ^9 -THC dopaminerge neuronen in de substantia nigra kan beschermen tegen de neurotoxine 6-OHDA. Redenen voor het wegblijven van bescherming kunnen een combinatie zijn van een ernstiger schade model en een te lage dosering voor de anti-oxidatieve bescherming. Tevens kan het zijn dat dit onderzoek in een model dichterbij de mens, neuronale bescherming door Δ^9 -THC uitsluit.

Algemene discussie

In *hoofdstuk 10*, de algemene discussie worden er verbanden gelegd tussen de bevindingen van modafinil en Δ^9 -THC in naïeve gezonde dieren en als anti-parkinson of neuroprotectief middel in dieren met Parkinson symptomen. Hieruit blijkt dat 100 mg/kg modafinil duidelijk effect heeft op de activiteit zowel bij slaap gedepriveerde dieren als bij MPTP behandelde dieren. De neuroprotectieve werking vindt plaats op cellulair niveau. In de discussie wordt uitgesloten dat modafinil ingrijpt op het metabolisme van MPTP in plaats van de veroorzaakte schade. De discussie gaat tevens in op de mogelijke neuroprotectieve werkingsmechanismen van modafinil. Dit zal hoogstwaarschijnlijk via directe effecten op de celdood processen gaan, zoals wordt ondersteund door de data uit hoofdstuk 8.

De gedragseffecten in marmosetten van Δ^9 -THC waren vergelijkbaar met de menselijke verschijnselen, maar op sommige punten afwijkend van de knaagdieren. Sommige effecten op knaagdieren zoals apathie waren ook waarneembaar bij de Δ^9 -THC behandelde marmosetten met Parkinson verschijnselen. Deze behandeling leidde ook tot symptoom verlagende effecten zoals waargenomen in de locomotor activiteit test en ook met de hand-oog coördinatie taak. Dit is een opvallend resultaat omdat er in de literatuur over knaagdieren juist positieve resultaten van cannabinoid antagonist worden verwacht. Deze waarneming bevestigt daarom de verschillen in het cannabinoid systeem tussen knaagdieren en niet-humane primaten en bevestigt tevens de potentie van Δ^9 -THC om Parkinson symptomen te onderdrukken. De potentiële neuroprotectieve werking van Δ^9 -THC is niet bevestigd in de marmoset MPTP model. Verder onderzoek moet de reden hierachter achterhalen. Het gebruik van Δ^9 -THC in de kliniek is niet geheel onomstreden met name door de bijwerkingen die de psychoactieve stof veroorzaakt en de discussie rondom mogelijke neurotoxische effecten.

In de discussie wordt ook ingegaan op de toepassing van neuroprotectieve medicatie bij patiënten met de ziekte van Parkinson. Ondanks de positieve vindingen in het experimentele onderzoek is er nog geen effectieve neuroprotectieve stof bij de mens gevonden. Oorzaken zijn gebrek aan goede klinische methoden om effectiviteit te bewijzen en de discrepantie tussen experimentele modellen en de ziekte in de mens.

Conclusie

Conclusie uit het onderzoek gepresenteerd in dit proefschrift is dat modafinil potentie heeft als neuroprotectieve en therapeutische stof bij de ziekte van Parkinson. Verder onderzoek is nodig naar achterliggende neuroprotectieve werkingsmechanisme. Dit kan een bijdrage leveren aan het onderzoek naar mechanismen om de celdoodprocessen te stoppen. Tevens heeft het geregistreerde geneesmiddel modafinil voldoende potentie om in een klinische studie met Parkinson patiënten te worden getest. Over Δ^9 -THC kan geconcludeerd worden dat het potentie heeft als therapeutische stof bij behandeling van de Parkinson symptomen. Het gebrek aan neuroprotectie door Δ^9 -THC in dit onderzoek toont dat verder onderzoek nodig is, vooral naar de mogelijke verschillen tussen de geteste Parkinson diermodellen.

Met de resultaten van modafinil en Δ^9 -THC gepresenteerd in dit proefschrift is er bijgedragen aan de ontwikkeling van behandelingen ingrijpend op de progressie van de ziekte van Parkinson, een ziekte die in loop van de tijd de kwaliteit van leven van zijn slachtoffers ernstig verstoort.