

Simmondsines uit de Jojoba-plant:

Efficiënte Inhibitoren van Angiogenese bij Reumatoïde Artritis

Denis De Keukeleire

Ere-gewoon Hoogleraar Universiteit Gent

Angiogenese is de vorming van nieuwe bloedvaten vanuit bestaande bloedvaten. Dit proces vindt plaats tijdens embryogenese en embryo-implantatie in het endometrium, tijdens wondherstel en tijdens diverse ziekteprocessen, waaronder kanker, ischemia, atherosclerose en tal van ontstekingsziekten, zoals reumatoïde artritis, retinopathie en maculaire degeneratie.

Mechanisme van angiogenese

Angiogenese is een geprogrammeerd en complex multistapsproces, dat nauwgezet gereguleerd wordt door talrijke cellulaire factoren, zowel activatoren, als inhibitoren (1). In volwassen weefsels zijn bloedvaten relatief weinig onderhevig aan veranderingen en, in normale fysiologische omstandigheden, houden activatoren en inhibitoren mekaar in evenwicht. Echter, wanneer neovascularisatie (expansie van het vasculaire netwerk) vereist is, helt de balans over naar activatoren, die vasculaire endotheelcellen aanzetten tot deling en vorming van nieuwe bloedvaten. Angiogenese wordt typisch geïnitieerd binnen hypoxische weefsels, die nieuwe bloedvaten nodig hebben om de zuurstofvoorziening in stand te houden. Wanneer een bepaald weefsel zuurstoftekort vertoont, worden cellulaire, zuurstofgevoelige mechanismen geactiveerd en wordt de genexpressie van pro-angiogene groeifactoren geïnduceerd.

De angiogenetische cascade wordt ingeleid door de vrijstelling van pro-angiogene groeifactoren, die aangemaakt worden door de omliggende cellen. Een belangrijke pro-angiogene groeifactor is VEGF ('vascular endothelial growth factor'), die de proliferatie en de migratie van cellen in gang zet gedurende angiogenese (2). De productie van VEGF wordt bepaald door de intracellulaire concentratie van het eiwit HIF1 α ('hypoxia-inducible factor 1 α '), dat zelf gereguleerd wordt door de aanwezigheid van de benodigde hoeveelheid zuurstof. Na uitscheiding wordt VEGF verspreid doorheen het omliggende weefsel en gebonden aan receptoren op

endotheelcellen (cellen aan de binnenkant van de bestaande bloedvaten), die hierdoor geactiveerd worden. Vervolgens worden enzymen geproduceerd, proteasen, die zorgen voor de afbraak van het basale membraan, dat omheen de endotheelcellen ligt, en van de extra-cellulaire matrix (ECM, 'extracellular matrix'), een netwerk van koolhydraten en proteïnen waarin de cellen zich bevinden. Vervolgens komen integrines aan bod, dit zijn receptoren op het celmembraan, die zorgen voor adhesie aan andere cellen. Zij positioneren de migrerende endotheelcellen tot tubulaire structuren, waardoor functionele bloedvaten gevormd worden. Tenslotte wordt het eiwit PDGF ('platelet-derived growth factor') afgescheiden, dat de omliggende cellen aanspoort om het nieuwe bloedvat te ondersteunen door het aanmaken van een nieuw basaal membraan. Geactiveerde endotheelcellen vervolledigen het angiogenetisch proces door bijkomende chemokines en cytokines af te scheiden, o.a. TGF β ('transforming growth factor β ') (2). Receptoren van de TGF β superfamilie zijn essentieel voor VEGF-regulering tijdens angiogenese (3). Jonah Folkman was, in de jaren 70, de eerste om de essentiële rol van angiogenese in de ontwikkeling van kwaadaardige ziekten te beschrijven en, met name, om de specifieke invloed van VEGF te benadrukken (4).

Met behulp van PCR kits kan de expressie geprofileerd worden van 84 sleutelgenen (SABiosciences, Frederick, Maryland, VSA), die betrokken zijn in het moduleren van de biologische processen van angiogenese. Elementen, die van belang zijn bij de ontwikkeling van nieuwe bloedvaten, omvatten groeifactoren en hun receptoren, chemokines en cytokines, matrix- en adhesiemoleculen, proteasen en hun inhibitoren, evenals transcriptiefactoren.

Angiogenese-inhibitoren in kankertherapie

Angiogenese is nodig bij de groei van weefsels omdat bouwstoffen, afvalstoffen en zuurstof anders te ver moeten diffunderen tussen de cel en een bloedvat. In kankerweefsels wordt angiogenese gestimuleerd. Een beginnende tumor kan slechts een kubieke millimeter (ongeveer een miljoen cellen) groot worden, zolang hij geen angiogenetische factoren afscheidt. Als hij nog groter zou worden, zouden de cellen in het midden immers geen zuurstof, energie of bouwstoffen krijgen. Door de productie van angiogene factoren worden nieuwe bloedvaten gevormd en kan de tumor groeien. Het nieuw gevormde netwerk van bloedvaten dringt binnen in de

kankergroei, voorziet de tumor van nutriënten en zuurstof en verwijdert afvalproducten. Continue neovascularisatie is een vereiste voor verdere tumorgroei en metastase. Bijgevolg kan anti-angiogene therapie met zogeheten angiogenese-inhibitoren een efficiënte anti-kankerbehandeling zijn. De huidige mogelijkheden van combinatietherapieën kunnen best geconsulteerd worden in overzichtelijke artikels, die recent in de biomedische literatuur gepubliceerd werden (5-8).

Angiogenese als target bij reumatoïde artritis

Reuma is eigenlijk een verzameling van meer dan 130 aandoeningen aan gewrichten, pezen en botten. In België en Nederland samen zouden er meer dan 3,5 miljoen mensen aangetast zijn door een reumatische aandoening, jong, oud, ook kinderen. Bij reumatoïde artritis (RA) speelt angiogenese een belangrijke rol, evenzeer bij tal van fibroproliferatieve ziekten, zoals diabetische retinopathie en psoriasis. Meer dan 150.000 mensen, in België en Nederland samen, hebben last van RA, waarbij pols-, hand- en voetgewrichten chronisch ontstoken zijn. Zij leven dagelijks met pijn en stijfheid. Op wereldschaal wordt 1% van de bevolking getroffen door RA. Bij vrouwen komt de ziekte driemaal meer voor dan bij mannen. RA is tevens geassocieerd aan verhoogde morbiditeit en mortaliteit. Zo hebben RA-patiënten een hogere prevalentie aan angina pectoris en beroertes.

RA is een chronische en destructieve ziekte, die typisch perifere gewrichten, doch ook synoviaal vocht in het lichaam aantast. Het synovium in RA ontsteekt en de massa ervan neemt toe, wat leidt tot zwellingen en pijn in de gewrichten. De abnormale laag van fibrovasculair weefsel wordt pannus genoemd, die de aanmaak van interleukine-1, PDGF en prostaglandinen stimuleert (9). Expansie van het synoviaal weefsel gaat noodzakelijkerwijze gepaard met een toename van aantallen en dichtheid van nieuwe bloedvaten. De pannus groeit uit zoals een tumor, met afbraak van kraakbeen en erosie van gebeente tot gevolg. Angiogenese treedt op vanaf het begin van de ziekte en onderhoudt de verdere ontwikkeling van artrose. Immers, door hypoxia in het ontstoken gewricht kan VEGF, via HIF1 α , geactiveerd worden. Concentraties van VEGF zijn duidelijk hoger in serum en synoviaal vocht van RA-patiënten ten opzichte van controle-patiënten. Ook zijn de VEGF-niveaus in RA-patiënten gecorreleerd met concentraties van de ontstekingsmarker, 'C-reactive protein'.

De gelijkenissen tussen de ontwikkeling van pannus en de groei van vaste tumoren enerzijds, en de efficiëntie van anti-angiogene behandeling in oncologie anderzijds, openen perspectieven om angiogenese in RA direct te targetten (10). Verschillende specifieke en niet-specifieke strategieën werden ontwikkeld om de activiteit van angiogene mediators in RA te blokkeren (11). Een 30-tal natuurlijk geproduceerde of synthetische moleculen werden reeds onderzocht, vooral in experimentele diermodellen en met behulp van menselijke celculturen (12). Ondanks vele interessante pre-klinische gegevens, werd de enige, zuiver anti-angiogene behandeling, uitgetest bij RA-patiënten met het monoclonaal antilichaam, vitaxine, afgebroken wegens een gebrek aan therapeutisch resultaat (13). Blijkbaar bevindt anti-angiogene therapie bij RA zich nog in een embryonaal stadium en moet gewacht worden tot een echte doorbraak gemeld wordt.

Het is interessant om na te gaan of de natuur kan helpen en of plant-afgeleide verbindingen het angiogenetisch proces op diverse stadia van ontwikkeling van nieuwe bloedvaten kunnen moduleren en inhiberen. Voor toepassing bij reumatische aandoeningen is brandnetel (*Urtica dioica*) meest bekend. Specifiek voor RA blijken moederkruid (*Tanacetum parthenum*), moerasspirea (*Filipendula ulmaria*) en een saponinerijk extract van de yucca-plant enige werking te vertonen, maar blijkbaar zonder veel concrete resultaten. Over nieuwe plantaardige moleculen met anti-angiogene activiteit is de recente biomedische literatuur zeer schaars. Onlangs kwam een nieuwe aanpak van RA in het nieuws, waarbij een chip (< 1 cm) in de nek (nervus vagus) van patiënten, zoals een pacemaker, ingeplant wordt. Door het afgeven van elektrische signalen zouden ontstekingen geremd worden. De Nederlandse professor Paul-Peter Tak, verbonden aan het Academisch Medisch Centrum van Amsterdam, vond dat RA bij muizen en ratten afgeremd werd door gedurende één minuut per dag een klein elektrisch signaal af te geven. Praktische humane toepassingen liggen evenwel nog zeer ver af. Van essentieel belang is dat mensen, die nu onderhevig zijn aan RA, kunnen geholpen worden met middelen die direct effect hebben.

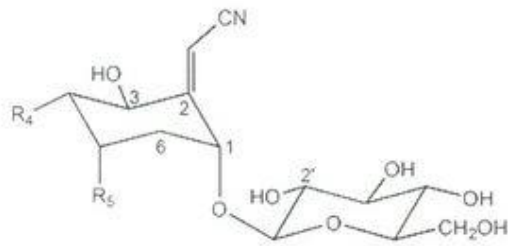
Inhibitie van angiogenese door simmondsines uit de joba-plant

Een geheel innovatieve aanpak van RA kan geboden worden door toepassing van een bijzondere medicinale plant, joba (*Simmondsia chinensis* (Link) C. K.

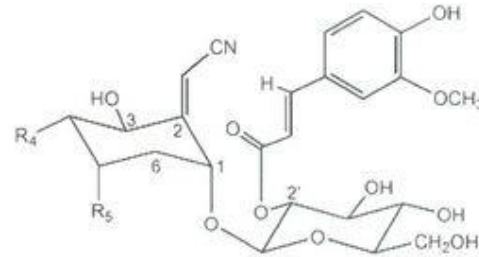
Schneider), die behoort tot de familie van de Simmondsiaceae, algemeen bekend als de jojoba-familie. De jojoba-plant is een doorgroeiende, immergroene, tweehuizige struik die tot een hoogte van 1-2 meter groeit. Enkel de vrouwelijke planten dragen kleine clusters van groen-gele bloemen en vruchten. De oorsprong van de jojoba-plant, waarvan meer dan 320 verschillende fenotypes bekend zijn, ligt in de Sonora en Mojave woestijnen van Zuid-Californië en Mexico. De economisch meest interessante fenotypes groeien over geheel de wereld in semi-aride zones. Jojoba wordt commercieel geteeld voor de vloeibare was, die gewoonlijk jojoba-olie genoemd wordt en gekenmerkt wordt door de aanwezigheid van esters met extreem-lange, lineaire ketens. De olie wordt geperst uit de donkerbruine rijpe zaden. Jojoba-olie wordt toegepast in de cosmetica als een vochtigheidsregulator en als een dragerolie voor speciale parfums. De overblijvende perskoek kende tot op heden geen toepassingen.

Wanneer de perskoek aan een specifieke solvent extractie onderworpen wordt, wordt een geelachtig poeder bekomen dat heel rijk is aan diverse simmondsine moleculen waarvan gebleken is dat zij sterke angiogenese inhibitoren zijn.

De belangrijkste inhoudsstoffen zijn simmondsine glycosiden en de overeenkomstige ferulaten. Simmondsines zijn laagmoleculaire 1,3,4,5-tetrahydrocyclohexaan-derivaten, gesubstitueerd met een cyanomethyleengroep aan C-2 en met een glucoserest aan C-1, die zelf een ferulaatresidu aan C-2' kan dragen. De hydroxygroepen aan C-4 en C-5 kunnen al dan niet gemethyleerd zijn. Aldus komen simmondsines steeds voor als mengsels, waarvan de samenstelling bepaald wordt door het fenotype en de groeizone. Duidelijke karakterisatie is noodzakelijk. Immers, het is bekend dat dimethylsimmondsines, in exuberante hoeveelheden (vele grammen per dag) toegediend, fungeren als eetlustremmers (14-16). Er is dus een duidelijke dosis-afhankelijke, biologisch gedifferentieerde activiteit. Het gebruik als eetlustremmer is absoluut af te raden. De toepassing van simmondsines als inhibitoren van angiogenese of voor behandeling van angiogenese-gerelateerde ziekten werd recent gepatenteerd (17). De actieve verbindingen vertonen lage niveaus van toxiciteit, wat bewezen werd in volwassen ratten, die één enkele dosis van 4 gram per kilogram lichaamsgewicht toegediend kregen (16).



structure formula: Simmondsin



structure formula: Simmondsin-ferulate

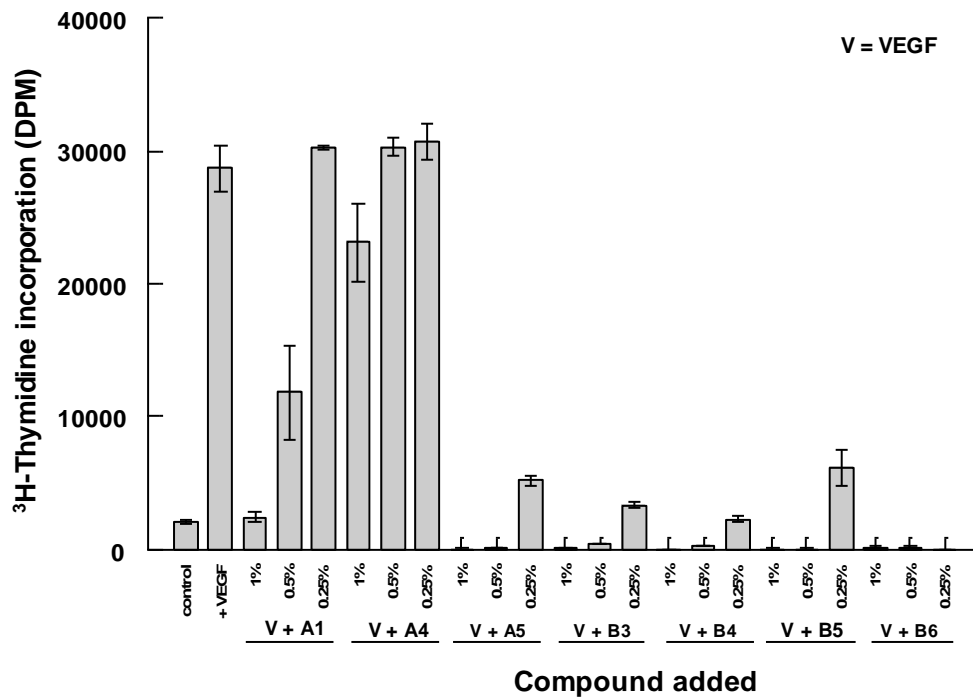
| | | | |
|--|---|--|--|
| <p>1. 4,5 Didesmethyl Simmondsine also as a 2'-ferulate</p> <p>R4 = OH R5 = OH</p> | <p>2. 5-Desmethyl Simmondsin also as 2'- ferulate</p> <p>R4 = OCH₃ R5 = OH</p> | <p>3. 4-Desmethyl Simmondsin also as a 2'-ferulate</p> <p>R4 = OH R5 = OCH₃</p> | <p>4. 4,5-Dimethyl Simmondsin also as a 2'-ferulate</p> <p>R4 = OCH₃ R5 = OCH₃</p> |
|--|---|--|--|

Structuren van simmondsines

In vitro en in vivo studies met simmondsines

Diverse studies, uitgevoerd o.a. aan TNO Prevention and Health, Leiden, Nederland, bevestigen in vitro en in vivo de activiteit van simmondsines als angiogenetische inhibitoren (18). Zo wordt de proliferatie van menselijke HUVEC ('Human Umbilical Vein Endothelial Cells') endotheelcellen, na stimulatie met VEGF- α of met bFGF ('basic Fibroblast Growth Factor'), geïnhibeerd door toevoeging van simmondsines (Figuur 1).

Menselijke microvasculaire endotheelcellen (hMVEC, 'human Microvascular Endothelial Cells') op fibrine-matrices werden gestimuleerd met VEGF- α en TNF- α ('tumor necrosis factor α ') en de vorming van tubulaire structuren van hMVEC in de driedimensionale matrix werd geanalyseerd met behulp van fase-contrast microscopie. Simmondsines inhibeerden de vorming op een concentratieafhankelijke wijze (Figuur 2). Ook de VEGF-gestimuleerde CAM-test ('chorio-allantoic membrane') (18) toonde ondubbelzinnig aan dat angiogenese onderdrukt wordt door simmondsines.



Controle: niet-gestimuleerde HUVEC-cellen ('Human Umbilical Vein Endothelial Cells')

V: VEGF ('Vascular Endothelial Growth Factor')

A1: totaal polair extract uit de geraffineerde, olievrije jojoba perskoek

A4: dimethylsimmondsine (> 90% zuiver, gehydroxyleerd)

A5: dimethylsimmondsine ferulaat (> 90% zuiver, gehydroxyleerd)

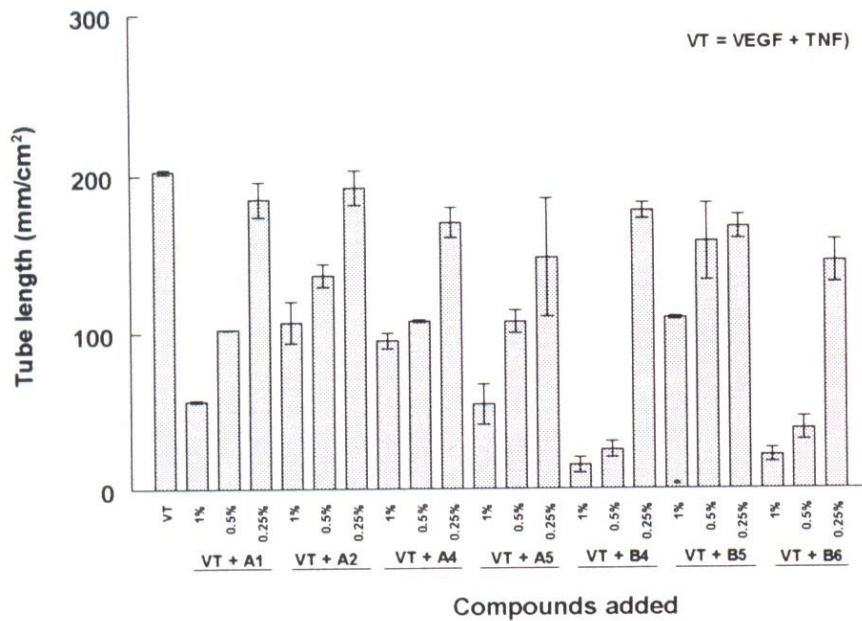
B3: 4-desmethylsimmondsine (> 90% zuiver, gehydroxyleerd)

B4: 5-desmethylsimmondsine (> 90% zuiver, gehydroxyleerd)

B5: 4,5-didesmethylsimmondsine (> 90% zuiver, gehydroxyleerd)

B6: gedeeltelijk gezuiverde fractie (+/- 87%) die vooral ferulaten van alle simmondsines (gehydroxyleerd) bevat

Figuur 1



Controle: niet-gestimuleerde hMVEC-cellen ('human Microvascular Endothelial Cells')

VT: VEGF- α + TNF- α

A1: totaal polair extract uit de geraffineerde, olievrije jojoba perskoek

A2: gedeeltelijk gezuiverde fractie, die vooral bevat: dimethylsimmondsine, desmethylsimmondsine (2 isomeren) en didesmethylsimmondsine (alle gehydroxyleerd)

A4: dimethylsimmondsine (> 90% zuiver, gehydroxyleerd)

A5: dimethylsimmondsine ferulaat (> 90% zuiver, gehydroxyleerd)

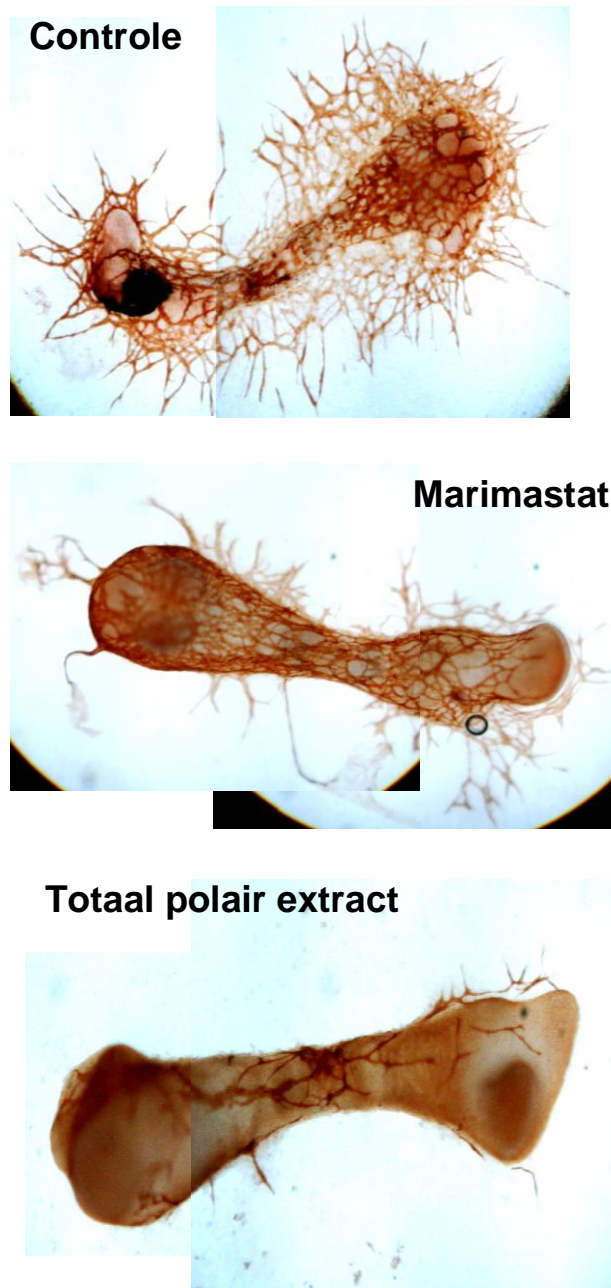
B4: 5-desmethylsimmondsine (> 90% zuiver, gehydroxyleerd)

B5: 4,5-didesmethylsimmondsine (> 90% zuiver, gehydroxyleerd)

B6 : gedeeltelijk gezuiverde fractie (+/- 87% zuiver) die vooral ferulaten van alle simmondsines (gehydroxyleerd) bevat

Figuur 2

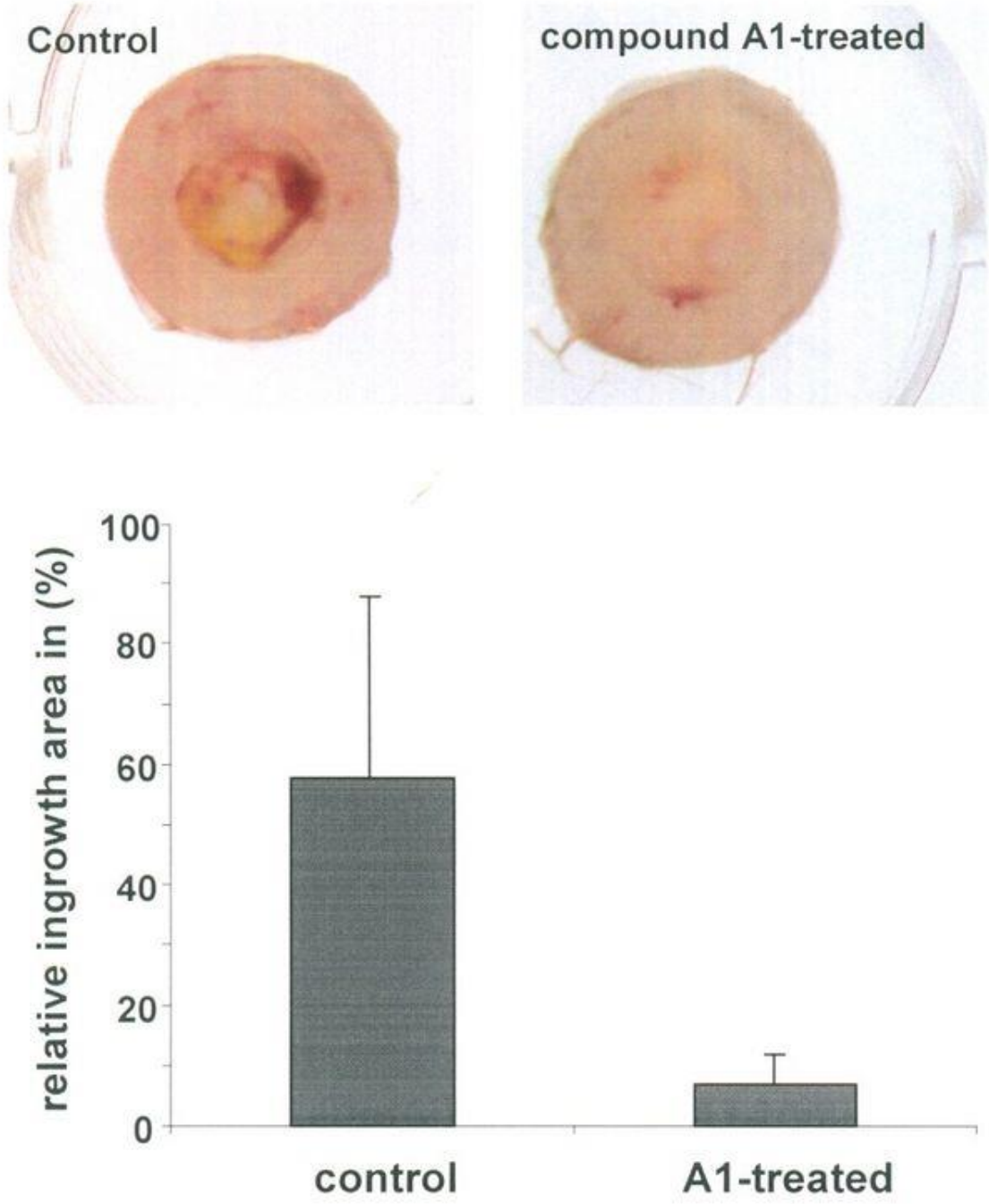
Een ex-vivo angiogenese-test werd uitgevoerd met gebruik van foetale middenvoetsbeentjes van muizen (18). Incubatie met rhVEGF- α gebeurde in aan- of afwezigheid van marimastat (inhibitor van matrix metalloproteïnase) of van simmondsines. De controle-beenderen vertoonden een duidelijke uitgroei van bloedvaten, eventueel ook vergezeld van beenderresorptie (Figuur 3). Simmondsines waren meer efficiënte inhibitoren dan marimastat, hoewel de inhiberende eigenschappen wel via verschillende mechanismen kunnen verlopen.



Figuur 3

Ook experimenten op muizen tonen zeer interessante resultaten (18). Muizen werden subcutaan voorzien van matrigelkamer-implanten, waarin bFGF geïnjecteerd werd, gevolgd door co-agulatie. Naast de controlegroep werden simmondsines (totaal polair extract) oraal toegediend aan de andere groep gedurende 2 weken. Vervolgens werden de implanten verwijderd en de angiogenetische vaatingroei werd onderzocht met digitale beeldvorming, immunochemische kleuring met computergeassisteerde beeldanalyse en bepaling van de fluorescentie in matrigel als maat voor het gehalte aan GFP-positieve (GFP: 'Green Fluorescent Protein') bloedvaten.

De controle-muizen vertoonden een sterkere ingroei van bloedvaten in de matrigel kamers ten opzichte van de behandelde groep (Figuur 4). Verder werd de ontwikkeling van MCF-7/6 tumoren in naakte muizen duidelijk afgeremd (MCF: 'Michigan Cancer Foundation'; borstkanker-cel lijn).



Figuur 4

Recent werd een alomvattend octrooi toegekend voor bedrijfseigen extractie van simmondsines uit de jobjoba-plant en voor toepassing ervan als therapeutische angiogenese-inhibitoren bij behandeling van alle ziekten, waarbij angiogenese een cruciale rol speelt (17). De claims betreffen zowel individuele simmondsines en hun metabolieten, als mengsels van deze bioactieve stoffen. Bovendien wordt om het even welke farmaceutische formulering beschermd. De angiogenese-gerelateerde ziekten omvatten o. a. kankers, ontstekingsziekten, artritis, psoriasis, fibrose van lever en nieren en oogandoeningen, zoals proliferatieve retinopathie, maculaire degeneratie en neovasculair glaucoom.

Besluit

Angiogenese is een zeer complex proces, zoals aangetoond door angiogenese-inhibitoren, die vele cellulaire mechanismen tegelijk moeten beïnvloeden om efficiënte activiteit te vertonen. Signaaltransducties zijn niet lineair, maar vormen netwerken, waarbij elke stap interacties vergt tussen diverse reactiewegen met ingewikkelde positieve en negatieve feedbacklusen. Simmondsines uit de jobjoba-plant bieden gunstige perspectieven voor ondersteuning (inhibitie van angiogenese) van het fysiologisch proces, dat gepaard gaat bij diverse fibroproliferatieve ziekten, zoals reumatoïde artritis (RA). Ook voor ziekten, waarbij angiogenese centraal staat, wordt nu de mogelijkheid geboden (onder octrooi) om geneesmiddelen te ontwikkelen op basis van simmondsines.

Referenties

- (1) Egginton, S. (2009) Invited review: activity-induced angiogenesis, *Pflugers Archiv-Eur. J. Physiol.* 457:963-977.
- (2) Fong, G. H. (2008) Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia, *Angiogenesis* 1:121-140.
- (3) Shao, E.S., Lin, L., Yao, Y. & Bostrom, K. I. (2009) Expression of vascular endothelial growth factor is coordinately regulated by the activin-like kinase receptors 1 and 5 in endothelial cells, *Blood* 114:2197-2206.
- (4) Folkman, J., Bach, M., Rowe, J. W., Davidoff, F., Lambert, P., Hirsch, C., Goldberg, A., Hiatt, H. H., Glass, J., Henshaw, E. (1971) Tumor angiogenesis - Therapeutic implications, *New Engl. J. Med.* 285:1182-&.
- (5) De Paepe, B. (2009) Anti-angiogenic agents and cancer: current insights and future perspectives, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 4:180-186.
- (6) Carmeliet, P., Jain, R. K. (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis, *Nature* 473:298-307.

- (7) Wilson, W. R., Hay, M. P. (2011) Targeting hypoxia in cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer* 11:393-410.
- (8) Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144:646-674.
- (9) Paleolog, E. M. (2002) Angiogenesis in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res.* 4 (suppl. 3):S81-S90.
- (10) Koch, A. E. (2003) Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 62 (Suppl. III): ii60-ii67.
- (11) Szekanecs, Z., Koch, A. E. (2009) Angiogenesis and its targeting in rheumatoid arthritis, *Vasc. Pharmacol.* 51:1-7.
- (12) Szekanecs, Z., Besenyi, T., Paragh, G., Koch, A. E. (2010) New insights in synovial angiogenesis, *Joint Bone Spine* 77:13-19.
- (13) Semerano, L., Clavel, G., Assier, E., Denys, A., Boissier, M.-C. (2011) Blood vessels, a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine* 78:118-123.
- (14) Flo G., Van Boven M., Vermaut S., Decuypere E., Daenens P., Cokelaere M. (1998) The vagus nerve is involved in the anorexigenic effect of simmondsin in the rat, *J. Agric. Food Chem.* 46:1910-1913.
- (15) Flo G., Vermaut S., Darras V. M., Van Boven M., Decuypere E., Kuhn E. R., Daenens P., Cokelaere M. (1999) Effects of simmondsin on food intake, growth, and metabolic variables in lean (+/?) and obese(fa/fa) Zucker rats, *Br. J. Nutr.* 81:159-167.
- (16) Lievens S., Flo G., Decuypere E., Van Boven M., Cokelaere M. (2003) Simmondsin: effects on meal patterns and choice behavior in rats, *Physiol. Behav.* 78: 669-677.
- (17) D'Oosterlynck, A. (2011) Simmondsin for Use as an Angiogenesis Inhibitor, PCT application No. PCT/EP2003/07270 (granted on 21 July, 2011; filed on July 7, 2003, claiming priority of the Belgian patent application No. 2002/0428 filed on July 8, 2002); US 7,387,999B2 (June 17, 2008).
- (18) D'Oosterlynck, A. & Raes, S. (2008) The Effect of Simmondsin Derivates, YOEME cvba, Westerring 12, 9700 Oudenaarde, 95 pp.