

Endokanabinoidní systém a ovlivnění trombogeneze

T. Kvasnička

Trombotické centrum, vedoucí prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc., Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha, přednosta prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA

Souhrn: Endokanabinoidní systém je endogenní signální systém, který hraje důležitou roli v regulaci energetické homeostázy a metabolismu tuků a sacharidů, což může potenciálně ovlivnit kardiometabolické riziko. Za normálních podmínek se jedná o neaktivní fyziologický systém, k jehož přechodné aktivaci dochází pouze v případě aktuální potřeby. Velmi zajímavý je vztah mezi endokanabinoidy a krevními buňkami. Existují důkazy, že endokanabinoidy, zvláště 2-arachidonoylglycerol (2-AG), mohou způsobovat aktivaci krevních destiček i endotelu, a tímto mechanismem se mohou účastnit regulace zánětu a trombózy. Krevní destičky jsou současně zapojené do metabolismu i uvolňování endokanabinoidů a také je pravděpodobné, že jejich cirkulující hladiny mohou být regulovány destičkami. 2-AG může být považován za nového fyziologického agonistu krevních destiček schopného indukovat aktivaci a agregaci krevních destiček zprostředkovaně mechanismem přes non- CB_1/CB_2 receptory. Endokanabinoidy mohou nejenom regulovat funkci krevních destiček a event. vést k trombogenezi, ale mohou také ovlivňovat hematopoézu.

Klíčová slova: endokanabinoidy – anandamid – receptory: CB_1 , CB_2 – krevní destičky – trombóza – endotel

The endocannabinoid system and interference with thrombogenesis

Summary: The endocannabinoid system is an endogenous signaling system that plays a role in the regulation of energy homeostasis and lipid and glucose metabolism—all of which can influence cardiometabolic risk. The endocannabinoid system is normally a silent physiologic system that becomes transiently activated, that is, only when needed. Endocannabinoids may also be secreted by the endothelium. Accordingly, there has been interest in the interactions between endocannabinoids and blood cells. There is certainly evidence that endocannabinoids, especially 2-arachidonoylglycerol (2-AG), may promote platelet activation, indicating that they may participate in regulation of thrombosis and inflammation. Platelets are involved both in the metabolism and release of endocannabinoids, and so it is possible that their circulating levels may be regulated by platelets. 2-AG can be considered a new physiologic platelet agonist able to induce full platelet activation and aggregation with a non- CB_1/CB_2 receptor-mediated mechanism. Not only may endocannabinoids regulate platelet function and possibly lead to thrombogenesis, but they may also influence haematopoiesis.

Key words: endocannabinoids – anandamide – receptors CB_1 , CB_2 – platelets – thrombosis – endothelium

Endokanabinoidní systém – obecně

Endokanabinoidní systém, jako fyziologický signální systém, tvoří jedinečný způsob komunikace mezi buňkami, které jsou jeho součástí a které se mohou navzájem ovlivňovat. Je složen z kanabinoidních receptorů (CB_1 a CB_2), jejich endogenních ligandů (endokanabinoidů) a enzymů pro jejich biosyntézu a degradaci. Jeho součástí na sebe vzájemně působí, jsou nezávislé a přispívají k vitálním funkcím organismu, včetně energetické homeostázy a metabolismu látek. Tvoří jedinečný způsob komunikace mezi buňkami, které jsou jeho součástí a které se mohou navzájem ovlivňovat [1].

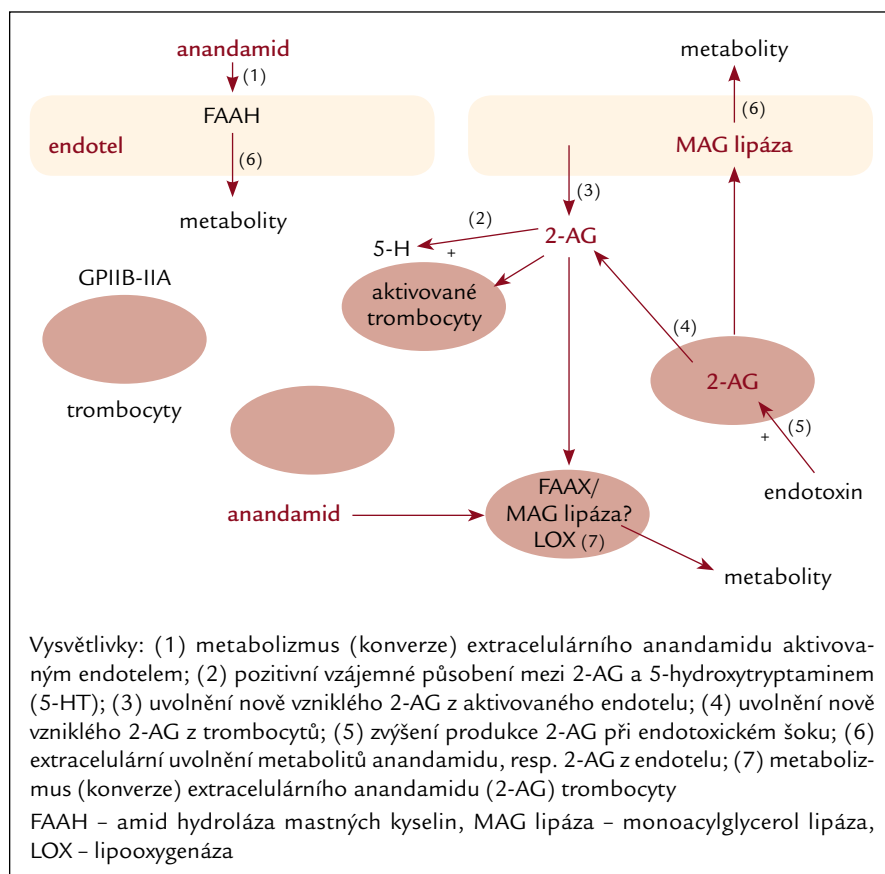
K nejvíce studovaným endogenním ligandům kanabinoidních receptorů neboli endokanabinoidům, které se vážou na CB_1 receptory a aktivují

je, patří anandamid (N-arachidonoyl ethanolamid), sn-2-arachidonoylglycerol (2-AG), noladin ether (2-arachidonoylglycerylether) [2,3], virodhamin (O-arachidonoyl ethanolamin), N-arachidonoyldopamin. Tyto endogenní působky jsou strukturně blízké eikosanoidům. Jako lipofilní signální molekuly jsou syntetizované de novo z membránových fosfolipidů v odezvě na postsynaptickou depolarizaci nebo aktivaci metabotropních glutamátových receptorů. Z mimobuněčného prostoru jsou odstraňovány selektivním satureovatelným systémem zpětného vychytávání a poté jsou nitrobuněčně hydrolyzovány [4].

Receptory CB_1 se nacházejí v srdci a cévním systému, kde působí vazodilataci, endoteliální růst a proliferaci a také angiogenezi [5,6]. V řadě dalších orgánů se podílejí na kontrole energie-

tického metabolismu (např. v mozku, tukové tkáni, gastrointestinálním traktu, játrech a kosterních svaích) [7,8]. CB_2 receptory jsou primárně exprimovány v imunitním systému [9]. Oba podtypy receptorů působí přes G_i/G_o proteiny negativně na adenylátcyklázu a pozitivně na p42/44 mitogenem aktivovanou proteinkinázu a fosfatidylinositol 3-kinázu (PI3-kinázu). Trombocyty exprimují tzv. CB receptory, které mají odlišné vazebné vlastnosti, a neklasifikují se tedy jako CB_1 , resp. CB_2 receptory, ale jako non- CB_1/CB_2 .

Endokanabinoidy netvoří v buňkách zásoby, jako je tomu u jiných neurotransmiterů. Vznikají jako okamžitá reakce na fyziologický (depolarizace neuronu) nebo patologický stimulační podnět, které vedou k aktivaci enzymů syntetizujících endokanabinoidy.



Obr. 1. Schematický obrázek možných interakcí mezi endokanabinoidy, trombocyty a endotelem.

2-AG (sn-2-arachidonoylglycerol)

2-AG je derivátem arachidonové kyseliny konjugované s glycerolem. 2-arachidonoylglycerol (2-AG) je endogenní lipid, který účinkuje prostřednictvím vazby na G-proteiny (vazbou na kanabinoidní receptory) a hraje významnou úlohu v mnoha fyziologických stavech [11]. V rámci kardiovaskulárního systému je 2-AG vytvářen jak z aktivovaných endoteliálních buněk, tak i krevních destiček a podílí se na ovlivňování vzniku zánětu a trombózy [12,13]. Po svém vzniku může 2-AG difundovat přes plazmatickou membránu a cílit své působení na CB receptory v téže samé buňce, kde byl vytvořen, nebo může aktivovat CB receptory jiných buněk po uvolnění do extracelulárního prostoru. Navíc může být 2-AG transportován dovnitř buněk specifickým absorpčním systémem. Navzdory zvyšujícímu se počtu výsledků z experimentálních farmakologických studií [14] je k dispozici stále málo znalostí,

kteří se týkají molekulárních vlastností vlastního transportního systému pro 2-AG. Rozhodně je však známo, že 2-AG je rychle metabolizován různými typy buněk na arachidonovou kyselinu a glycerol. Nejdůležitějším mechanismem degradace 2-AG je katalýza lipázou monoacylglycerolu. 2-AG může být navíc hydrolyzován amidem-hydrolázou mastných kyselin [15,16]. Za fyziologických podmínek hraje 2-AG důležitou roli v různých biologických systémech, např. jako retrográdní messenger molekula v regulaci transmise na synaptických spojeních, nebo je zapojený do regulace různých typů zánětlivé reakce a imunitní odpovědi [17]. Velké množství buněk, které se účastní procesu zánětu, a imunokompetentních buněk, jako jsou makrofágy a dendritické buňky [18], po své stimulaci generují a následně uvolňují 2-AG do extracelulárního prostoru, kde se váže na CB₂ receptory jiných zánětlivých nebo imunokompetentních

buněk, zvyšuje produkci chemokinů a spouští přímou migraci makrofágů, B-lymfocytů, eozinofilů a NK (natural killer) buněk, a tím stimuluje zánětlivou reakci a imunitní odpověď [19]. Různé typy buněk, jako jsou endoteliální buňky a krevní destičky, vytvářejí po stimulaci rovněž 2-AG [20].

Endokanabinoidy a krevní destičky

Krevní destičky mohou být aktivovány endokanabinoidy, i když pouze ve velmi vysokých koncentracích, ale současně mohou být zapojené do metabolické konverze endokanabinoidů. Samotné krevní destičky vykazují specifickou vazbu synteticky připraveného kanabinoidního radioligandu (3HCP55940) na tzv. CB receptory, označované pro své odlišné vlastnosti jako non-CB₁/CB₂ [10]. Je prokázáno, že zvýšená koncentrace anandamidu způsobuje aktivaci krevních destiček prostřednictvím FAAH (fatty acid amide hydrolyse), a to dependentním uvolňováním arachidonové kyseliny spolu s uvolněním intracelulárního kalcia [21]. Tento efekt anandamidu nebyl ovlivněn inhibicí aktivity cyklooxygenázy a FAAH. Trombocyty konvertují anandamid prostřednictvím 12-lipoxygenázy na 12(S)-hydroxyeicosatetraenoylethanolamid [12(S)-HAEA], který je farmakologicky aktivní s podobnou afinitou na receptory jako anandamid. Na základě těchto poznatků se zdá, že konverze endokanabinoidů trombocyty je tím způsobem, kterým může být aktivita endokanabinoidů v cirkulaci prodloužena.

Jinak je právě 2-AG nejvíce zastoupeným endokanabinoidem v krevních destičkách. Uplatňuje se jako modulator při aktivaci krevních destiček, indukuje změny jejich tvaru, agregaci a sekreci (na dávce dependentním mechanismem, který vyžaduje zapojení destičkových TxA₂ receptorů) [22]. V závislosti na dostupnosti TxA₂ pak 2-AG způsobuje zvýšení kalcia v cytosolu. Serotonin napomáhá vazbě 2-AG na krevní destičky a jejich následné aktivaci, což způsobuje zvýšení inositol trisfosfátu a snížení cAMP [23].

Cirkulující krevní buňky představují důležitý zdroj endokanabinoidů, které se mohou účastnit patofyziologických dějů. Lipopolysacharid, klíčový činitel při endotoxickém šoku, způsobuje downregulaci exprese FAAH v lidských lymfocytech. Snížení metabolismu anandamidu vede k jejím zvýšeným hladinám. Tento mechanismus může vést k dalšímu zvyšování hladin cirkulujícího anandamidu při endotoxickém šoku. Endotoxický šok je spojován s DIC (diseminovanou intravaskulární koagulopatií), která v sobě zahrnuje i zvýšenou agregaci krevních destiček [24].

Anandamid odvozený z kultivace endoteliálních buněk stimulovaných estrogeny může ve skutečnosti snižovat uvolňování serotoninu z ADP-stimulovaných krevních destiček. Z tohoto důvodu je možné se domnívat, že interakce mezi destičkami a endotelem může být spojená s vaskulárním účinkem estrogenů [25].

Endotel může být prostorem pro metabolismus endokanabinoidů. Vysoké koncentrace endokanabinoidů produkováných endotelem mohou způsobovat aktivaci krevních destiček, což může být důležité i při vzniku trombózy.

Závěr a perspektivy

Je známý fakt, že endokanabinoidní systém je signální systém, který hraje důležitou roli ve složité regulaci energetické homeostázy. Nyní se ukazuje, že existuje významný vztah mezi endokanabinoidy a krevními buňkami. Endokanabinoidy mohou způsobovat aktivaci krevních destiček a tímto mechanismem mohou být protrombogenní. Lidské krevní destičky jsou rovněž sami zapojené do metabolismu i uvolňování endokanabinoidů a také je pravděpodobné, že jejich cirkulující hladiny mohou být regulovány destičkami. Tento proces je změněn při různých onemocněních. Samotný endotel může být navíc významným zdrojem endokanabinoidů, zvláště 2-AG, což může být opět důležité při vzniku a regulaci zánětu a trombózy. 2-AG může být považován za nového fyziologického agonistu trombocytů se schopností in-

dukovat aktivaci i agregaci krevních destiček vazbou na non-CB₁/CB₂ receptory. Tento fakt může být významný při testování účinků nových synteticky připravených ligandů kanabinoidních receptorů nebo látek endokanabinoidní systém jinak ovlivňujících.

Práce vznikla za podpory VZ MZOVFN 2005.

Literatura

1. Kvasnička T. Význam endokanabinoidního systému v regulaci energetické rovnováhy. *Vnitř Lék* 2008; 54: 25–28.
2. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346: 561–564.
3. Devane WA, Hanus L, Breuer A et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258: 1946–1949.
4. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 83–90.
5. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215: 89–97.
6. Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB et al. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol* 1999; 266: H2085–H2093.
7. Liu J, Gao B, Mirshahi F et al. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J* 2000; 346: 835–840.
8. Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T et al. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J Biol Chem* 2000; 275: 13484–13492.
9. Costa D, Marsicano G, Tschöp M et al. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 2003; 112: 423–431.
10. Berdyshev E, Schmid PC, Krebsbach RJ et al. Activation of PAF receptors results in enhanced synthesis of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in immune cells. *FASEB J* 2001; 15: 2171–2178.
11. Begg M, Pacher P, Bátkai S et al. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* 2005; 106: 133–145.
12. Kishimoto S, Kobayashi Y, Oka S et al. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces accelerated production of chemokines in HL-60 cells. *J Biochem* 2004; 135: 517–524.
13. Maccarrone M, Del Principe D, Finazzi-Agrò A. Endocannabinoids: new physiological (co-)agonists of human platelets. *Thromb Haemost* 2002; 88: 165–166.
14. Maccarrone M, Bari M, Menichelli A et al. Human platelets bind and degrade 2-arachidonoylglycerol, which activates these cells through a cannabinoid receptor. *Eur J Biochem* 2001; 268: 819–825.
15. Beltramo M, Piomelli D. Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Neuroreport* 2002; 11: 231–235.
16. Bojesen IN, Hansen HS. Membrane transport of anandamide through resealed human red cell membranes. *J Lipid Res* 2005; 46: 1652–1659.
17. Braud S, Bon C, Touqui L et al. Activation of rabbit platelets by anandamide through its cleavage into arachidonic acid. *FEBS Lett* 2000; 471: 12–16.
18. Beltramo M, Piomelli D. Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Neuroreport* 2000; 11: 1231–1235.
19. Maestroni GJ. The endogenous cannabinoid 2-arachidonoyl glycerol as in vivo chemoattractant for dendritic cells and adjuvant for Th1 response to a soluble protein. *FASEB J* 2004; 18: 1914–1916.
20. Maccarrone M, Bari M, Menichelli A et al. Human platelets bind and degrade 2-arachidonoylglycerol, which activates these cells through a cannabinoid receptor. *Eur J Biochem* 2001; 268: 819–825.
21. Cupini LM, Bari M, Battista N et al. Biochemical changes in endocannabinoid system are expressed in platelets of female but not male migraineurs. *Cephalalgia* 2005; 26: 277–281.
22. Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Thromboxane generation. Platelet. London: Academic Press 2007: 565–574.
23. Maccarrone M, Bari M, Principe DD et al. Activation of human platelets by 2-arachidonoylglycerol is enhanced by serotonin. *Thromb Haemost* 2003; 89: 340–347.
24. Maccarrone M, Bari M, Battista N et al. Endocannabinoid degradation, endotoxic shock and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 1: 53–63.
25. Moro L, Reineri S, Piranda D et al. Non-genomic effects of 17β-estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor β and Src kinase. *Blood* 2005; 105: 115–121.

doc. MUDr. Tomáš Kvasnička, CSc.
www.vfn.cz
e-mail: tomas.kvasnicka@lf1.cuni.cz,
tomas.kvasnicka@seznam.cz

Doručeno do redakce: 5. 11. 2009
Přijato po recenzi: 30. 11. 2009