

Endokanabinoidný systém a kosť

Mikuláš Pura^{1,2,3}, Peter Vaňuga¹

¹ Národný endokrinologický a diabetologický ústav, Ľubochňa, Slovenská republika

² Endokrinologická ambulancia, Ružomberok, Slovenská republika

³ Endokrinologická ambulancia, Poliklinika Novamed, Banská Bystrica, Slovenská republika

Súhrn

Pribúdajú dôkazy o tom, že kostný endokanabinoidný systém zohráva dôležitú úlohu v regulácii kostnej hmoty za fyziologických aj patologických podmienok. Oba hlavné endokanabinoidné ligandy (anandamid aj 2-arachidonoylglycerol), receptory endokanabinoidného systému – CB₁-receptor (CB₁R) a CB₂-receptor (CB₂R) a kľúčové enzýmy ich syntézy a degradácie sa nachádzajú, resp. sú exprimované v osteoblastoch aj osteoklastoch. Doterajšie štúdie génu *CNR2* identifikovali viaceré rizikové a protektívne varianty sekvencie génu vo vzťahu ku kostnej hustote, resp. k osteoporóze. Selektívne CB₁R-inverzní agonisti/antagonisti, resp. CB₂R-inverzní agonisti/antagonisti sú kandidáti na prevenciu straty kostnej hmoty a kombinovanú antirezorpcnú a osteoformačnú liečbu osteoporózy.

Kľúčové slová: endokanabinoidy – kanabinoidné receptory – marihuana – osteoporóza

The endocannabinoid system and bone

Summary

Recent studies suggest an important role for the skeletal endocannabinoid system in the regulation of bone mass in both physiological and pathological conditions. Both major endocannabinoids (anandamid and 2-arachidonoylglycerol), endocannabinoid receptors – CB₁-receptor (CB₁R) a CB₂-receptor (CB₂R) and the endocannabinoid metabolizing enzymes are present or expressed in osteoblasts and osteoclasts. Previous studies identified multiple risk and protective variants of *CNR2* gene dealing with the relationship to bone density and/or osteoporosis. Selective CB₁R/ CB₂R-inverse agonists/antagonists and CB₂R-inverse agonists/antagonists are candidates for prevention of bone mass loss and combined antiresorptive and anabolic therapy for osteoporosis.

Key words: cannabinoid receptors – endocannabinoids – marijuana – osteoporosis

Úvod

V odbornej literatúre z posledného obdobia je možné nájsť množstvo excelentných prehľadových článkov týkajúcich sa histórie, biochémie, farmakológie a liečebného potenciálu endokanabinoidného systému [1–5].

V skratke, tento tvoria:

- receptory endokanabinoidného systému (CB-receptory) – CB₁-receptor (CB₁R) kódovaný génom *CNR1* (lokus 6q15) a CB₂-receptor (CB₂R) kódovaný génom *CNR2* (lokus 1p36)
- ligandy – endokanabinoidy (týmito sú najmä N-arachidonoyletanolamín – AEA, syn. anandamid a 2-arachidonoylglycerol – 2-AG)
- syntetizujúce a degradačné enzýmy

Anandamid (zo sanskritského slova *ananda* – vnútorná blaženosť) vzniká jednak N-acyl-fosfatidyl-etanolamín-fosfolipáza D (NAPE-PLD)-dependentnou a independentnou cestou, jeho hlavným degradačným enzýmom je amidohydroláza mastných kyselín (FAAH). 2-AG vzniká z inozitol-fosfolipidov pod vplyvom fosfolipázy C

Obr. 1. Konopa siata (*Cannabis sativa*) vo vyobrazení Franza Eugena Köhlera z roku 1887



a diacylglycerolipáz (DAGL α a DAGL β), degraduje sa monoacylglycerol-lipázou (MAGL) [6].

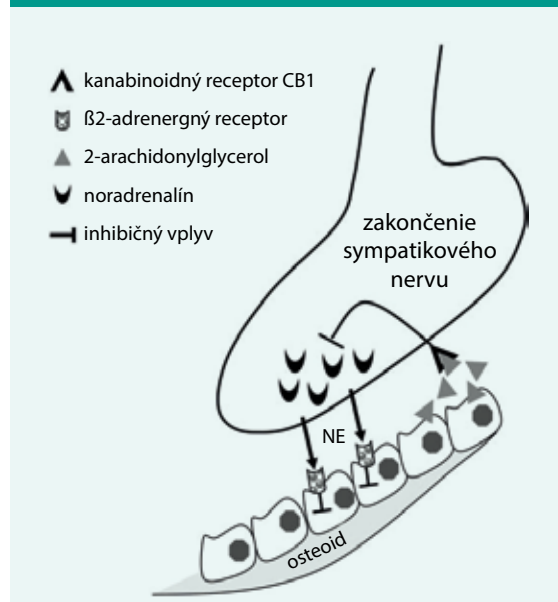
Hlavná aktívna zložka konope sietej (*Cannabis sativa* var. *indica*, syn. marihuana) (obr. 1) [7] – Δ^9 -tetrahydrokanabinol (THC) sa viaže na oba receptory endokanabinoidného systému. Všadeprítomnosť CB $_1$ R a CB $_2$ R je dôvodom, prečo psychoaktívne účinky, pre ktoré je marihuana najčastejšou zneužívanou látkou, nie sú jedinými účinkami, a už tisíce rokov sa marihuana pestuje a liečebne využíva (okrem množstva ďalších účinkov) napr. na utíšenie bolesti, utlmenie zápalu a ako sedatívum [6]. Prvá písomná zmienka pochádza z Číny, z najstaršieho dochovaného čínskeho liekopisu *Šennong Běi Cǎo Jīng* (*Materia Medica Božského sedliaka*), z rokov 200–250 nášho letopočtu [6].

V nasledujúcom prehľade sa venujeme kostnému endokanabinoidnému systému ako potencionálnemu terapeutickému cieľu u pacientov s osteoporózou, resp. inými kostnými poruchami.

Kostný endokanabinoidný systém

Oba endokanabinoidné ligandy a kľúčové enzýmy ich syntézy a degradácie sa nachádzajú, resp. sú exprimované v osteoblastoch aj osteoklastoch, z čoho vyplýva, že anandamid aj 2-AG sa tvoria lokálne v kostiach. 2-AG nemá priamym pôsobením cez CB $_1$ R na osteoblasty žiadny vplyv, resp. účinkuje ako inverzný agonista. Cez CB $_2$ R kontroluje funkciu osteoblastov inhibíciou uvoľňovania noradrenalinu zo sympatikových zakončení v okolí osteoblastov (obr. 2). Noradrenalin potláča osteoformáciu väzbou na β_2 -adrenergný receptor [8]. V kostiach CB $_2$ R-selektívne agonisticky pôsobiaci anandamid

Obr. 2. Model regulácie osteoformácie interakciou interakciou sympatikových zakončení a CB $_1$ -receptorov. Upravené podľa [31]



in vitro stimuluje proliferáciu osteoblastov a zvyšuje aj počet osteoklastov. Pri štúdiách so zvieracími modelmi sa zistilo, že kostné fenotypy CB $_1$ R aj CB $_2$ R „knockoutových“ myší závisia od konkrétnej kmeňovej línie pokusných zvierat alebo vytvorenej z mutácie. Odstránenie 233 terminálnych kodónov z N-konca má pohlavne-dependentný efekt – samičky majú normálnu trabekulárnu kosť s mierne rozšírenou kortikálnou kosťou, kým samčekovia línie CD1 (CD1^{CB $_1$ -/-}) majú kostnú hustotu zvýšenú [9,10]. Normálne parametre osteoformácie a osteorezorpcie svedčia o tom, že u oboch pohlaví vzniká samčí kostný fenotyp. Rovnaké výsledky s identickou mutáciou sa dosiahli aj pri kmeňovej línii ABH [11,12]. Naopak, odstránenie takmer celej proteín-kódujúcej sekvencie u myší línie C57BL6J (C57^{CB $_1$ -/-}) viedlo u oboch pohlaví k zníženej kostnej hustote, zvýšeniu počtu osteoklastov a zníženej osteoformácii [10]. Kostný fenotyp u C57^{CB $_2$ -/-} myší je nezávislý od pohlavia. Počas prvých 2–3 mesiacov života dosahuje trabekulárna kosť normálne prírastky, ale s narastajúcim vekom dochádza k výraznej strate kostnej hmoty. Vo veku jeden rok je kostná hustota v porovnaní s kontrolami polovičná [13]. C57^{CB $_2$ -/-} myší majú veľký kostný obrat so zvýšenou osteorezorpciou aj osteoformáciou s negatívnou bilanciou [13], čím sa zmeny podobajú postmenopauzálnnej osteoporóze [14].

Dôležitým zistením je, že znížená kostná hustota je u týchto myší jediným doteraz zisteným fenotypovým prejavom. Keďže C57^{CB $_2$ -/-} myší sú inak zdravé, zdá sa, že hlavnou fyziologickou úlohou CB $_2$ R je udržiavanie rovnováhy kostného obratu. Mladé samičky CD1^{CB $_2$ -/-} majú s porovnaním s wt-myšami naopak nízky kostný obrat a nadštandardnú trabekulárnu kostnú hmotu. S narastajúcim vekom osteoformácia klesá a vo veku jedného roka nie je oproti wt-myšiam rozdiel v hustote trabekulárnej kosti. Týmto sa líšia oproti fenotypu myší C57^{CB $_2$ -/-}. U samčiek je kostný fenotyp trabekulárnej kosti nezmenený. Kortikálna kosť u myší oboch pohlaví sa nelíši od wt-myší. Sumárne možno povedať, že:

- CB $_1$ R regulujú osteorezorpciu u dospelých myší
- v podmienkach zvýšeného kostného obratu môžu CB $_2$ R regulovať stratu kostnej hmoty
- deficit CB $_1$ /CB $_2$ má špecifický dopad v závislosti od typu kosti (trabekulárna vs kortikálna) a pohlavia, zmeny kostnej hustoty postihujú najviac trabekulárnu kosť a sú ovplyvnené genetickými rozdielmi medzi kmeňovými líniami študovaných myší [15]

Zvýšenú kostnú hustotu vďaka poruche osteoklastogenézy pri nepostihnutom množstve osteoblastov majú aj dospelé myši bez receptorov GPR55 [16]. Tieto sa pokladajú za možný 3. typ endokanabinoidných receptorov [17,18]. Kostné abnormality GPR55^{-/-} myší sa veľmi podobajú zmenám u CB $_1$ ^{-/-} myší [11], na základe čoho sa predpokladá, že receptor GPR55 je súčasťou regulácie účinku endokanabinoidov pri osteorezorpcii [19].

Čiastočnou odpoveďou na otázku, či rozdiely vo výsledkoch štúdií medzi kmeňovými líniami študovaných myší s modelmi deficitov CB $_1$ /CB $_2$ možno analogicky oča-

kávať aj u ľudí, sú štúdie polymorfizmov génov kódujúcich CB₁R (gén *CNR1*, lokus 6q15) a najmä CB₂R (gén *CNR2*, lokus 1p36). Práve lokus 1p36 vo viacerých nezávislých starších štúdiách preukázal spojitosť s rizikom zníženej kostnej hustoty a osteoporózy [20,22–25]. Na krátkom ramienku sa nachádzajú viaceré gény, ktorých zmeny sa spájajú s rizikom zníženej kostnej hustoty – gén *ALPL* pre tkanivovo-nešpecifický izoenzým alkalické fosfatázy podmieňujúci adultnú a detskú formu hypofosfatázy, gén *MTHFR* pre metyltetrahydrofolátreduktázu podmieňujúci homocysteinémie, gén *PLD1* pre prokolagén-lyzín, 2-oxoglutarát 5-dioxygenázu 1 podmieňujúci Ehlersov-Danlosov syndróm typ VI a gén *HSPG2* pre špecifický heparansulfát proteoglykán jadrový proteín bazálnej membrány podmieňujúci Schwartov-Jampelov syndróm typ 1 [25]. Ani v jednej zo štúdií však nebol ako kandidátny gén identifikovaný gén *CNR2*. Doterajšie asocičné štúdie jediného kódujúceho exónu génu *CNR2* realizované v kaukazoidnej/evropoidnej [26] aj mongoloidnej [27–29] populácii zhodne identifikovali viaceré rizikové a protektívne varianty sekvencie génu vo vzťahu ku kostnej hustote/k etiológii osteoporózy u ľudí [26–29].

Endokanabinoidné receptory regulujú osteoklastogénu aj nepriamo – ovplyvňovaním spriahnutia procesov osteoformácie a osteorezorpcie (tzv. coupling phenomenon). Tvorba osteoklastov je výrazne nižšia v kultúrach kostnej drene, v ktorých boli osteoblasty pripravené z CB₁^{-/-} myši [20,21]. Dôvodom je nižšia expresia RANKL na osteoblastoch, v dôsledku čoho sú osteoblasty menej schopné stimulovať aktiváciu a novotvorbu osteoklastov [20]. Špecifickí CB₂R-agonisti HU-308, HU-433 a JWH133 zmierňujú stratu kostnej hmoty u ovariectomovaných zvierat

[12,13,30]. CB₁R/CB₂R-špecifické ligandy (selektívne CB₁R-inverzní agonisti/antagonisti, resp. CB₂R-inverzní agonisti/antagonisti) bez výskytu vedľajších psychických účinkov sú preto kandidáti na prevenciu straty kostnej hmoty a kombinovanú antirezorpcnú a osteoformačnú liečbu osteoporózy (schéma) [19,31].

Záver

Množstvo otázok týkajúcich sa pôsobenia „endokanabinoidómu“, tj. systému aktuálne s >100 metabolitmi a > 25 proteínmi, ostáva otvorených. Pribúdajú dôkazy o tom, že kostný endokanabinoidný systém zohráva dôležitú úlohu v regulácii kostnej hmoty za fyziologických aj patologických podmienok. Tretnosť prechovávaní a užívania marihuany vo väčšine krajín limituje údaje z klinických štúdií a údaje týkajúce sa THC sú tak vo veľkej miere založené na retrospektívnych dátach, kazuistických popisoch a zvieracích modeloch. Rozchádzajú sa názory laickej, ako aj odbornej verejnosti na postavenie marihuany v rebríčku drog. Treba podotknúť, že v porovnaní s marihuanou je dopad iných spoločensky široko rozšírených drog (alkohol, nikotín) hodnotený sumárom ujmy užívateľa a spoločnosti omnoho väčší [32–35], nehovoriac o tom, že ich liečebný potenciál je nulový.

Objavy nových látok ako napr. fluorofor-konjugovanej CB₂R-selektívnej zlúčeniny CM-157 (3-[[4-[2-*tert*-butyl-1-(tetrahydropyran-4-ylmetyl)benzimidazol-5-yl]sulfonyl-2-pyridyl]oxy]propán-1-amín) čoskoro umožnia farmakologickú charakteristiku CB₂R [36] a uľahčia vývoj selektívnych agonistov CB-receptorov so sľubným potenciálom v liečbe osteoporózy.

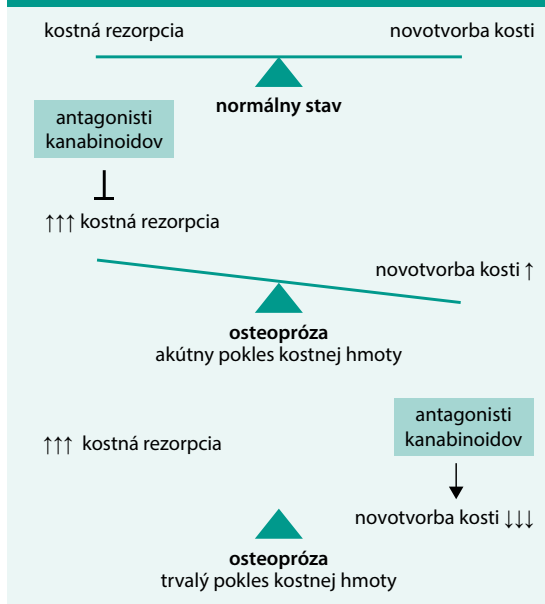
Legendárny Šen Nung – Božský sedliak, praotec Číňanov a Vietnamcov, žil údajne v rokoch 2 838–2 698 p. n. l. (tj. úctyhodných 140 rokov!), podľa inej legendy dokonca až božských 5 000 rokov. Ani jeden z uvedených číselných údajov dlhovekosti nedosiahne ani jeden z nás, či už s alebo bez ovplyvnenia svojho endokrinného a endokanabinoidného systému endo- či exo(fyto)kanabinoidmi. Veríme však tomu, že jubilujúci 80ročný prof. Zamrazil, legenda českej a slovenskej endokrinológie, bude ešte dlho Šen Nungovi šliapať na päty.

Venované prof. MUDr. Václavovi Zamrazilovi, DrSc., pre ktorého sú hormóny drogou.

Literatúra

1. Bab I, Zimmer A, Melamed E. Cannabinoids and skeleton: from marijuana to reversal of bone loss. *Ann Med* 2009; 41(8): 560–567. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1080/07853890903121025>>.
2. Lambert DM, Fowler CJ. The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J Med Chem* 2005; 48(16): 5059–5087.
3. Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol* 2006; 147(Suppl 1): S163–S171.
4. Kogan NM, Mechoulam R. Cannabinoids in health and disease. *Dialogues Clin Neurosci* 2007; 9(4): 413–430.
5. Marx J. Drug development. Drugs inspired by a drug. *Science* 2006; 311(5759): 322–325.

Schéma. Model prevencie a liečby osteoporózy s použitím kanabinoidných ligandov.
Upravené podľa [19]



6. Fattore L (ed). Canabinoids in neurologic and mental disease. Elsevier: San Diego 2015. ISBN 978-0124170414
7. Köhler FE. Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte. Gera-Untermyhaas: 1887. Dostupné z WWW: <http://www.botanicus.org/item/31753002839139>.
8. Raphael B, Gabet Y. The skeletal endocannabinoid system: clinical and experimental insights. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2016; 27(3): 237–245. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/jbcp-2015-0073>.
9. Ledent C, Valverde O, Cossu G et al. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 1999; 283(5400): 401–404.
10. Tam J, Ofek O, Fride E et al. Involvement of neuronal cannabinoid receptor CB1 in regulation of bone mass and bone remodeling. *Mol Pharmacol* 2006; 70(3): 786–792.
11. Idris AI, van't Hof RJ, Greig IR et al. Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat Med* 2005; 11(7): 774–779.
12. Bab I, Ofek O, Tam J et al. Endocannabinoids and the regulation of bone metabolism. *J Neuroendocrinol* 2008; 20(Suppl 1): S69–S74. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01675.x>.
13. Ofek O, Karsak M, Leclerc N et al. Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103(3): 696–701.
14. Brown JP, Delmas PD, Malaval L et al. Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1984; 1(8386): 1091–1093.
15. Sophocleous A, Idris AI, Ralston SH. Genetic background modifies the effects of type 2 cannabinoid receptor deficiency on bone mass and bone turnover. *Calcif Tissue Int* 2014; 94(3): 259–268. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00223-013-9793-8>.
16. Whyte LS, Rynberg E, Sims NA et al. The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106(38): 16511–16516. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0902743106>.
17. Ryberg E, Larsson N, Sjogren S et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 2007; 152(7): 1092–1101.
18. Begg M, Pacher P, Batkai S et al. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* 2005; 106(2): 133–145.
19. Idris AI. Cannabinoid receptors as target for treatment of osteoporosis: a tale of two therapies. *Curr Neuropharmacol* 2010; 8(3): 243–253. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/157015910792246173>.
20. Idris AI, Sophocleous A, Landao-Bassonga E et al. Cannabinoid receptor type 1 protects against age-related osteoporosis by regulating osteoblast and adipocyte differentiation in marrow stromal cells. *Cell Metab* 2009; 10(2): 139–147. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2009.07.006>.
21. Idris AI, Sophocleous A, Landao-Bassonga E et al. Regulation of bone mass, osteoclast function, and ovariectomy-induced bone loss by the type 2 cannabinoid receptor. *Endocrinology* 2008; 149(11): 5619–5626. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2008-0150>.
22. Devoto M, Shimoya K, Caminis J et al. First-stage autosomal genome screen in extended pedigrees suggests genes predisposing to low bone mineral density on chromosomes 1p, 2p and 4q. *Eur J Hum Genet* 1998; 6(2): 151–157.
23. Devoto M, Specchia C, Li HH et al. Variance component linkage analysis indicates a QTL for femoral neck bone mineral density on chromosome 1p36. *Hum Mol Genet* 2001; 10(21): 2447–2452.
24. Devoto M, Spotila LD, Stabley DL et al. Univariate and bivariate variance component linkage analysis of a whole-genome scan for loci contributing to bone mineral density. *Eur J Hum Genet* 2005; 13(6): 781–788.
25. Valdéz-Flores M, Casas-Avila L, Ponce de León-Suárez V. Genetic diseases related with osteoporosis. In: Valdéz-Flores M (ed). Topics in osteoporosis. In Tech. Dostupné z WWW: <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/topics-in-osteoporosis/genetic-diseases-related-with-osteoporosis>.
26. Karsak M, Cohen-Solal M, Freudenberg J et al. Cannabinoid receptor type 2 gene is associated with human osteoporosis. *Hum Mol Genet* 2005; 14(22): 3389–3396.
27. Yamada Y, Ando F, Shimokata H. Association of candidate gene polymorphisms with bone mineral density in community-dwelling Japanese women and men. *Int J Mol Med* 2007; 19(5): 791–801.
28. Zhang C, Ma J, Chen G et al. Evaluation of common variants in CNR2 gene for bone mineral density and osteoporosis susceptibility in postmenopausal women of Han Chinese. *Osteoporosis Int* 2015; 26(12): 2803–2810. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-015-3195-x>.
29. Woo JH, Kim H, Kim JH et al. Cannabinoid receptor gene polymorphisms and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause* 2015; 22(5): 512–519. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/GME.0000000000000339>.
30. Smoum R, Baraghithy S, Chourasia M et al. CB2 cannabinoid receptor agonist enantiomers HU-433 and HU-308: an inverse relationship between binding affinity and biological potency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(28): 8774–8779. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1503395112>.
31. Raphael B, Gabet Y. The skeletal endocannabinoid system: clinical and experimental insights. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2016; 27(3): 237–245. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/jbcp-2015-0073>.
32. Nutt D, King LA, Saulsbury W et al. Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *Lancet* 2007; 369(9566): 1047–1053.
33. Nutt DJ, King LA, Phillips LD et al. Independent Scientific Committee on Drugs. Drug harms in the UK: a multicriteria decision analysis. *Lancet* 2010; 376 (9752): 1558–1565. Dostupné z DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61462-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61462-6).
34. Hanuš LO, Kotrba Š. Nad léčivými jointy s Lumírem Hanušem. *Britské listy* [18–09–2008]. Dostupné z WWW: <http://blisty.cz/art/42801.html>.
35. Holland J (ed). Tráva. Kompletní průvodce světem marihuany v medicíně, vědě, kultuře a politice. Pragma: Praha 2014. ISBN 978-80-7349-408-7
36. Martínez-Pinilla E, Rabal O, Reyes-Resina I et al. Two affinity sites of the cannabinoid subtype 2 receptor identified by a novel homogeneous binding assay. *J Pharmacol Exp Ther* 2016; 358(3): 580–587. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.116.234948>.

prim. MUDr. Peter Vaňuga, CSc.

✉ peter.vanuga@nedu.sk

Endokrinologické oddelenie, Národný endokrinologický a diabetologický ústav, Ľubochňa, Slovenská republika
www.nedu.sk

Doručeno do redakce 6. 9. 2016

Přijato po recenzii 17. 9. 2016