
Samenvatting en conclusie

Zo'n 15 jaar geleden begonnen nieuwe psychoactieve stoffen (NPS) wereldwijd te verschijnen op recreatieve drugsmarkten. Aangewakkerd door globalisering en pogingen om de wetgeving te omzeilen, is het NPS fenomeen de laatste jaren sterk toegenomen, zowel in aantal nieuwe stoffen als in complexiteit van de NPS markt. Van de verschillende klassen van NPS is de groeiende groep van nieuwe synthetische opioïden (NSO's) bijzonder zorgwekkend omwille van het hoge risico op fatale overdosering. NSO's kunnen op basis van hun chemische structuur worden onderverdeeld in enerzijds analogen van de krachtige pijnstillers fentanyl en structureel diverse, niet-fentanyl-gerelateerde stoffen anderzijds.

Tussen 2012 en 2018 waren de meeste opkomende NSO's fentanyl analogen. Tegen 2019 was deze balans verschoven naar niet-fentanyl-gerelateerde NSO's, wat vorm gaf aan wat wordt beschouwd als het huidige 'post-fentanyl analogen tijdperk'. Veel van deze stoffen werden ooit onderzocht door de farmaceutische industrie vanwege hun potentieel als narcotische pijnstillers, maar werden nooit als medicijn op de markt gebracht. Vandaag de dag worden verschillende van deze 'oude' drugs afgeleid naar de recreatieve drugsmarkt als NSO's. Tegelijkertijd worden stoffen die nooit eerder zijn bestudeerd, nu geproduceerd op clandestiene wijze en gedistribueerd als echte 'nieuwe' synthetische opioïden. De schijnbaar eindeloze lijst van mogelijke chemische structuren maakt het moeilijk om te voorspellen welk NSO als volgende zal verschijnen.

Of ze nu oud, nieuw of (on)verwacht zijn - inzicht in de biologische effecten van opkomende NSO's is cruciaal om belanghebbenden te informeren over de potentiële risico's die gepaard gaan met het gebruik van deze drugs en hun aanwezigheid op de drugsmarkt. Het overkoepelende doel van dit doctoraat is om te helpen bij de risicobeoordeling van niet-fentanyl NSO's door middel van *in vitro* en *in vivo* farmacologische karakterisering. Als secundair doel illustreert deze thesis het brede potentieel van een *in vitro* NanoBIT®-gebaseerde bioassay in de context van klinische en forensische toxicologie.

Hoofdstuk 1 kadert waarom er voor- en nadelen zijn verbonden aan het gebruik van opioïden: enerzijds zijn het krachtige pijnstillers, maar tegelijkertijd kunnen opioïden ook de ademhaling onderdrukken, wat potentieel fataal kan zijn. De lezer maakt kennis met de μ -opioïde receptor (MOR), het voornaamste moleculaire doelwit dat verantwoordelijk is voor de belangrijkste effecten van klinisch toegepaste en misbruikte opioïden. Om inzicht te krijgen in de farmacologie van NSO's, kunnen verschillende *in vitro* assays gebruikt worden die MOR-

activatie monitoren. **Hoofdstuk 2** evalueert het potentieel en de valkuilen van vaak toegepaste assays en bevat een compilatie van gepubliceerde *in vitro* functionele parameters van reeds gekende NSO's.

Hoofdstukken 3-8 bieden een farmacologisch perspectief op NSO's van het post-fentanyl analogen tijdperk. Beginnend met opioïden van het zogenaamde 'U-type', toont **Hoofdstuk 3** het verschil aan in MOR-activeringspotentieel tussen twee positionele isomeren van naftyl U-47700. Deze bevindingen illustreren hoe kleine structurele veranderingen in een molecule een grote invloed kunnen hebben op de activiteit van opioïden. **Hoofdstuk 4** concentreert zich op de klasse van cinnamylpiperazine 'AP'-opioïden, waaronder 2-methyl AP-237 en AP-238. *In vitro* karakterisering geeft aan dat cinnamylpiperazines over het algemeen minder actief zijn dan fentanyl. Dit werd bevestigd door de relatief hogere concentraties van cinnamylpiperazines ten opzichte van fentanyl in een reeks *post mortem* zaken. **Hoofdstuk 5** gaat over de karakterisering van dipyanone, desmethylmoramide en acetoxymethylketobemidone - NSO's die structureel verwant zijn aan de voorschriftplichtige opioïde geneesmiddelen methadon en ketobemidone. Dipyanone toont *in vitro* een vergelijkbare opioïdactiviteit als methadon en werd bovendien geïdentificeerd in een poeder en in het bloedstaal van een individu met een polydrugsintoxicatie.

Hoofdstuk 6 is toegewijd aan de farmacologische karakterisering van 2-benzylbenzimidazole 'nitazene' opioïden. In de loop van de onderzoeksperiode die in deze thesis wordt beschreven (2019-2023), begon deze groep NSO's bijzondere aandacht te krijgen: van de eerste identificatie van isotonitazene in 2019, tot de opeenvolgende opkomst van 14 analogen en hun snel groeiende betrokkenheid bij drugs-gerelateerde sterfgevallen - in slechts 4 jaar tijd werden 2-benzylbenzimidazole 'nitazene' opioïden de overheersende klasse van niet-fentanyl NSO's in grote delen van de wereld. **Hoofdstuk 6.A** geeft een gedetailleerd overzicht van de 'opkomst en ondergang' van isotonitazene op de recreatieve drugsmarkten, wat de typerende dynamische levenscyclus van NSO's illustreert. De volgende hoofdstukken zijn georganiseerd volgens de verschillende 'golven' waarin divers gesubstitueerde nitazenes op de recreatieve drugsmarkten terechtkwamen. **Hoofdstuk 6.B.1** onderzoekt de structuur-activiteitsrelaties van nitazenes van de 'eerste golf', zoals isotonitazene, metonitazene en etodesnitazene. In **Hoofdstuk 6.B.2** wordt een aangepast protocol van de standaard NanoBiT[®] bioassay met succes toegepast voor de activiteits-gebaseerde screening van isotonitazene en andere NSO's

in biologische stalen. De overgang naar de 'tweede golf' nitazenes is gedocumenteerd in **Hoofdstuk 6.C**. Dit hoofdstuk omvat de *in vitro* en *in vivo* karakterisering van *N*-pyrrolidino etonitazene (**Hoofdstuk 6.C.1**) en *N*-piperidinyl etonitazene (**Hoofdstuk 6.C.2**), waarvan de resultaten wijzen op belangrijke opioïdactiviteit. Het risicoprofiel van andere 'tweede golf'-nitazenes wordt geëvalueerd in **Hoofdstuk 6.C.3**, waarin *in vitro* farmacologie wordt gecombineerd met de tot nu toe grootste reeks van toxicologische cases waarin nitazenes werden geïdentificeerd. Tot slot wordt in **Hoofdstuk 6.D** onderzoek gedaan naar de *in vitro* en *in vivo* effecten van nitazenes die naar verwachting zullen opduiken in een potentiële 'derde golf'. De relevantie van deze voorspellende benadering werd bevestigd toen ethyleenoxynitazene, een van de voorgestelde 'profetische' nitazenes, begin 2023 voor het eerst werd geïdentificeerd op de drugsmarkt.

In **Hoofdstuk 7** verschuift de focus van NSO's met een benzimidazole kern (nitazenes) naar verwante benzimidazolone-bevattende NSO's. **Hoofdstuk 7.A** beschrijft de eerste identificatie en karakterisering van brorfine, een krachtig NSO dat werd gedetecteerd in een poeder en in serumstalen van een patiënt die hulp zocht voor detoxificatie. In **Hoofdstuk 7.B** wordt meer inzicht verkregen in de *in vitro* en *in vivo* farmacologie van brorfine en vier 'profetische' brorfine-analogen. De resultaten geven aan dat brorfine-achtige stoffen potentieel schade kunnen veroorzaken bij gebruikers, mochten ze op de NSO markt verschijnen. Tot slot wordt in **Hoofdstuk 8 (A-C)** de opioïdactiviteit van structureel verschillende niet-fentanyl NSO's (waaronder sommige NSO's die in afzonderlijke hoofdstukken zijn besproken) rechtstreeks vergeleken met behulp van verschillende *in vitro* en *in vivo* testen.

Hoofdstuk 9 verkent de bredere internationale context van deze thesis, waaronder de verschillende stadia van de opioïden crisis in de Verenigde Staten en inzichten in het veranderende landschap van de recreatieve opioïdenmarkt in Europa. Dit hoofdstuk portretteert het groeiende risico van nitazenes voor de volksgezondheid, verergerd door hun aanwezigheid op straatniveau. Als laatste onderzoekt dit hoofdstuk de gecombineerde rol van wetgeving, behandeling en schadebeperkingsstrategieën om opioïd-gerelateerde risico's te verminderen.

Synthetische opioïden - oude, nieuwe en (on)verwachte - zullen ook in de toekomst blijven verschijnen als recreatieve drugs. Terwijl sommige niet meer dan een deining zullen veroorzaken, kunnen andere geheel nieuwe golven vormen. Het werk dat in dit proefschrift

wordt beschreven, laat zien hoe farmacologisch onderzoek kan worden gebruikt om door dit complexe landschap te navigeren. Er werden nieuwe inzichten verkregen in de biologische effecten van opkomende NSO's, wat bijdraagt aan het sturen en prioriteren van nieuwe wetgevingen en strategieën voor risicobeperking. De toegepaste *in vitro* NanoBiT®-gebaseerde assay bleek nuttig voor verschillende doeleinden, waaronder de detectie van opioïdactiviteit in drugsmateriaal of biologische stalen - toepassingen die steeds belangrijker zullen worden als er in de toekomst een toenemende interactie optreedt tussen NSO's en de bestaande illegale drugsmarkt. Deze delicate situatie vereist een gecoördineerde, multidisciplinaire aanpak. Farmacologische karakterisering is slechts één stukje van die puzzel, maar is cruciaal om te helpen het tij te keren.