

Designerdrugs vormen een uitdaging voor controleorganen (zoals anti-dopingcontrole), voor forensisch en klinisch toxicologische laboratoria en voor wetgevende instanties. Een enorme verscheidenheid aan chemisch diverse drugs, die elk een adequate controle in specifieke populaties vereisen, bemoeilijkt de tijdige detectie in de overeenkomstige laboratoria. De snelle opkomst van nieuwe drugs vereist een voortdurende ontwikkeling en/of aanpassing van methodologieën en vergt tijdige evaluatie van de farmacologische en toxicologische eigenschappen van deze designerdrugs. Dit proefschrift omvat de studie met betrekking tot activiteitsgebaseerde detectie als een proactieve strategie om uitdagingen omtrent designerdrugs het hoofd te bieden. Verschillende aspecten werden geëvalueerd, waaronder (i) farmacologische karakterisering voor verschillende doeleinden, (ii) ongerichte detectie van drugs in menselijke biologische stalen en (iii) inzicht in druggerelateerde intoxicaties.

Hoofdstuk I geeft een overzicht, tot aan het schrijven van dit proefschrift, van het wetenschappelijk onderzoek omtrent het gebruik van activiteitsgebaseerde testen voor de detectie van prestatiebevorderende middelen (PED) in menselijke vloeistoffen. Er is aanzienlijke wetenschappelijke vooruitgang geboekt betreffende activeitsgebaseerde detectie van verschillende klassen van PED's, met een uitgesproken focus op hormoongerelateerde substanties zoals (designer)steroïden. Dit wordt aanzien als een gevolg van de ontdekking van de eerste designerdrug in doping in 2004, zijnde een designersteroïde. Uit deze literatuurstudie zijn belangrijke kenmerken van celgebaseerde testen naar voren gekomen waarmee rekening moet worden gehouden bij het ontwerpen van een optimaal testsysteem. De wijdverspreide toepassing van dergelijke detectiemethoden in de routinepraktijk is echter achtergebleven, wat waarschijnlijk te maken heeft met de atypische aard van deze technieken en de variabiliteit die inherent is aan celgebaseerde methodologieën. De uitstekende prestaties van biologische testen omtrent cannabinoïden, de recente validatiestudies aangaande glucocorticoid testmethodes en de ontwikkeling van nieuwe biologische testmethodologieën voor hypoxia-induceerbare factor (HIF) leidden echter tot de identificatie van verscheidene, veelbelovende toepassingen voor activiteitsgebaseerde testmethodes in controleprogramma's: (i) toekomstgerichte detectie om op een beredeneerde manier stalen voor langdurige termijn te bewaren, om stalen op intelligente wijze te heranalyseren, en om rationeel specifieke atleten te (her)testen, (ii) staalfractionering op basis van biologische resultaten om de identificatie van bioactieve substanties te vergemakkelijken en (iii) farmacologische karakterisering om prioriteiten te stellen voor onderzoeksinspanningen.

Hoofdstuk II beschrijft de ontwikkeling en evaluatie van nieuwe biologische detectiemethodes voor het monitoren van HIF-heterodimerisatie. Door gebruik te maken van de natuurlijke eiwit-eiwitinteractie tussen HIF-subeenheden, resulteerde de koppeling van NanoBIT® subeenheden aan HIF α en HIF β in een nieuw testsysteem voor de detectie en karakterisering van HIF-gerelateerde substanties, zoals besproken in

Hoofdstuk II.1. Er werden twee verschillende celgebaseerde detectiemethoden ontworpen, wat toelaat om twee isovormen van de HIF-transcriptiefactor (HIF1 en HIF2) te monitoren. Deze testmethodes werden met succes gebruikt om klinische HIF-stabilisatoren en algemene hypoxiemimetica te karakteriseren. De biologische testen werden geoptimaliseerd naar een stabiel celsysteem in **Hoofdstuk II.2** om het testprotocol te vereenvoudigen en de variabiliteit van de detectiemethode te verminderen. Deze optimalisatie resulteerde in een verhoogde gevoeligheid vergeleken met de initiële testopzet in **Hoofdstuk II.1**. Dit was gunstig om de detectie van relevante concentraties in dopingstalen mogelijk te maken met de biologische testen. Een grondige vergelijking tussen de HIF1- en HIF2-testmethodes identificeerde de HIF1 stabiele test als optimale methode om biologische stalen te onderzoeken. **Hoofdstuk II.2** dient dus als *proof-of-concept* dat HIF-stabilisatoren als dopingsubstanties kunnen worden gedetecteerd in urinestalen met deze nieuw ontwikkelde en toekomstbestendige testmethode. Tot zover wordt de gevoeligheid van de methode nog belemmerd door de invloed van de biologische matrix (in dit geval urine). Toekomstige studies kunnen worden gewijd aan het elimineren van de invloed van matrixeffecten. Desalniettemin kan de HIF-biologische test op dit moment een belangrijk doel dienen voor retrospectieve studies om na te gaan of dopingcontroles de afgelopen jaren wel of niet een achterstand kenden bij de opkomst van verschillende potentiële HIF-gerelateerde dopingmiddelen. Verder zijn zowel de HIF1- als de HIF2-biologische testmethodes uitgebreid geëvalueerd in **Hoofdstuk II.3** om mogelijke toepassingen voor farmacologische doeleinden te onderscheiden. Hierbij zijn verschillende voordelen met betrekking tot de testsystemen geïdentificeerd en zijn belangrijke overwegingen zoals interfererende en niet-specifieke effecten aan het licht gebracht. Dit laatste deel van hoofdstuk II over HIF-stabilisatoren benadrukt de grote veelzijdigheid van de nieuw ontwikkelde testmethodes. Dit betreft zowel de diverse experimentele opstellingen als de verschillende testprotocollen waarmee zowel toenames als afnames in de biologische uitlezing kunnen worden gemeten en waarmee zowel indirecte als directe effecten op HIF-heterodimerisatie kunnen worden gedetecteerd. Deze nieuw ontwikkelde HIF-testmethodes kunnen daarom dienen als farmacologische hulpmiddelen in meerdere disciplines voor de karakterisering van stoffen met uiteenlopende werkingsmechanismen.

Synthetische cannabinoïde receptor agonisten (SCRA's) als recreatieve drugs zijn de protagonisten in **Hoofdstuk III**. Eerder ontwikkelde biologische testmethodes voor het monitoren van deze designerdrugs, geclassificeerd als nieuwe psychoactieve stoffen (NPS), worden gehanteerd om de veelzijdigheid van celgebaseerde testmethodes te demonstreren. De drie verschillende proactieve strategieën die aan het begin van deze samenvatting werden aangehaald komen ook aan bod in **Hoofdstuk III**. *Farmacologische karakterisering* kan dienen om de activiteit van SCRA's in kaart te brengen, inclusief de beoordeling van zogenaamde vertekende voorkeuren voor bepaalde celsignalisatieroutes in **Hoofdstuk III.1**. Activiteitsprofilering geeft inzicht in het intrinsieke receptoractiveringspotentieel van een substantie, dat (naast andere

aspecten) gerelateerd is aan diens farmacologische en/of toxicologische effecten. Farmacologische karakterisering is relevant bij het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen, in het onderzoek omtrent de preklinische ontwikkelingsfase van geneesmiddelen, bij de beoordeling van potentiële gezondheidsrisico's van mogelijk gevaarlijke recreatieve drugs en bij het stellen van prioriteiten omtrent onderzoeksinspanningen, wetsvoorstellen en controlemaatregelen. Dit laatste doel is in het bijzonder van toepassing in **Hoofdstuk III.6**, waar een groot panel van zowel natuurlijke als synthetische varianten van Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) werd gescreend op cannabinoïde activiteit om het potentieel voor misbruik in te schatten, gebaseerd op hun intrinsieke vermogen om de CB₁ cannabinoïde receptor te activeren. Dit onderzoek resulteerde in de identificatie van meerdere verbindingen met een hogere cannabinoïde activiteit dan het voornaamste psychoactieve bestanddeel in cannabis (Δ^9 -THC) – wat de volgende designerdrugs in de rij kunnen zijn om op de recreatieve drugsmarkt te verschijnen. Deze informatie werd doorgegeven aan de Europese (EMCDDA) en nationale autoriteiten (Sciensano) ter ondersteuning van de besluitvorming omtrent aanpassingen aan bestaande wetgeving en het prioriteit stellen van controlemaatregelen. Farmacologische karakterisering maakt ook studies omtrent structuur-activiteitsrelaties mogelijk, waarbij de activiteit van structureel verwante verbindingen wordt onderzocht, zoals besproken in **Hoofdstuk III.2**. Deze studies zijn belangrijke oriëntatiepunten voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. Deze studies vormen eveneens belangrijke leidraden voor medicinale chemici om op een bewuste manier nieuwe structuren voor geneesmiddelen te ontwerpen en voor het voorspellen van farmacologische en/of toxicologische effecten van structurele varianten van designerdrugs voordat ze op de (zwarte) markt verschijnen. **Hoofdstuk III.2** toont ook verschillen aan tussen de karakterisering door verschillende testsystemen. De veranderingen in kinetiek na inkorting van eiwitten in testmethodologieën, en het 'plafondeffect' van testmethododes met signaalversterking benadrukken het belang van het inzicht in welk signalisatie-element de methodologie monitort. De selectie van het ideale testsysteem hangt af van de vragen die beantwoord moeten worden (bijv. therapeutisch potentieel, gezondheidsrisico), wat op zijn beurt afhangt van het doel dat gediend moet worden (respectievelijk medicijnontwerp of volksgezondheid).

De haalbaarheid van *niet-gerichte screening* met activiteitsgebaseerde assays wordt benadrukt in **Hoofdstuk III.3**. Een screeningstest wordt verondersteld universeel, snel, eenvoudig, gevoelig, selectief, reproduceerbaar en goedkoop te zijn. Universaliteit wordt in dit onderzoek bevestigd door de aanhoudende uitstekende prestaties van de cannabinoïden biologische test bij de detectie van een heel ander panel aan SCRA's in biologische stalen in vergelijking met 3 jaar voorheen. De gevoeligheid wordt sterk benadrukt door de lage concentraties aan SCRA's en SCRA-metabolieten die in serum werden gedetecteerd. Verder toonde dit hoofdstuk de mogelijkheid aan om de beoordeling van biologische resultaten door de computer te laten uitvoeren door middel van een '*machine learning*' model, waardoor de resultaten versneld kunnen worden

geanalyseerd en de tijd en werkdruk voor het laboratoriumpersoneel kan worden verminderd.

Tot slot bestuderen **Hoofdstuk III.4** en **Hoofdstuk III.5** de toegevoegde waarde van het gebruik van activiteitsgebaseerde testen voor het evalueren en begrijpen van *acute drugsintoxicaties*. Beide hoofdstukken detecteren *ex vivo* cannabinoïde activiteit met de cannabinoïde biologische test in serumstalen en interpreteren deze meting door middel van farmacologische karakterisering. **Hoofdstuk III.4** richt zich op mono-SCRA-intoxicaties met één bepaalde designerdrug en toont de mogelijkheid om de cannabinoïde activiteit in serumextracten te voorspellen op basis van farmacologische karakterisering van de SCRA (en zijn metabolieten). Deze studie toont daarmee ook aan dat het mogelijk is om de uitlezing van de biologische test te corrigeren voor matrixeffecten en onthult een verband tussen de cannabinoïde activiteit in serum en het bewustzijnsniveau van de patiënten onder invloed. **Hoofdstuk III.5** onderzoekt het gebruik van een referentie-SCRA om mono- en poly-SCRA-intoxicaties inzichtelijk te benaderen door gebruik te maken van activiteitsequivalenten. Deze aanpak maakt gelijktijdige ongerichte screening en evaluatie van de mate van intoxicatie mogelijk, zonder voorafgaande kennis over de ingenomen drug.

Concluderend draagt dit proefschrift bij aan de wetenschappelijke vooruitgang die de implementatie van activiteitsgebaseerde methoden in routinematige teststrategieën beoogt. Er werd een nieuwe ongerichte celgebaseerde assay ontwikkeld voor de proactieve detectie van (onbekende) dopingstoffen. De haalbaarheid en toegevoegde waarde van activiteitsgebaseerde detectie als screeningsaanpak werd aangetoond en besproken als een toekomstbestendige methode voor de detectie van designerdrugs. Er werd inzicht verkregen in recreatieve drugsintoxicaties, wat een nieuwe strategie opleverde voor het interpreteren van de intoxicatie van patiënten met onbekende designerdrugs. De verschillende doeleinden van farmacologische karakterisering werden aangetoond, met implicaties op verschillende niveaus en in verschillende velden. De verschillende toepassingen, voordelen, experimentele protocollen en interessegebieden illustreren de grote veelzijdigheid van celgebaseerd onderzoek, met als resultaat niet alleen een wetenschappelijke, maar eveneens een maatschappelijke relevantie.