



(Endo)cannabinoidomica: approcci di “targeted lipidomics” applicati agli endocannabinoidi e ai mediatori endocannabinoid-like nei disordini metabolici

Fabiana Piscitelli, PhD

Endocannabinoid Research Group (ERG)

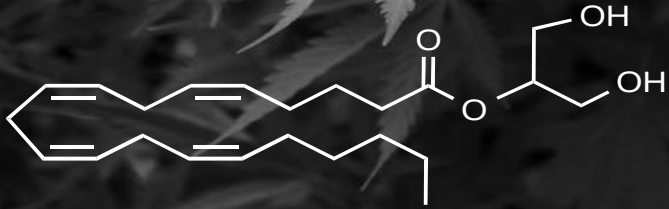
Istituto di Chimica Biomolecolare - Consiglio Nazionale delle Ricerche (ICB-CNR),

Via C.Flegrei 34, 80078 Pozzuoli (NA)

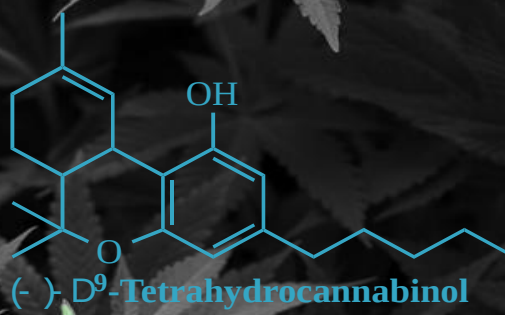




Anandamide (AEA)



2-arachidonoylglycerol (2-AG)

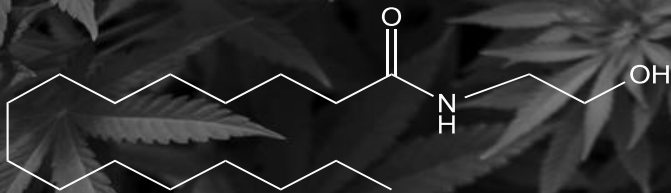


(-)-D⁹-Tetrahydrocannabinol

CB1

Enzimi di biosintesi e inattivazione

Lipidi bioattivi correlati



N-Palmitoyl-ethanolamine (PEA)



N-oleoyl-ethanolamine (OEA)

CB2

Il Sistema Endocannabinoide (SE)



- ✓ memoria
- ✓ umore
- ✓ appetito

- ✓ disordini neurodegenerativi
- ✓ dipendenza
- ✓ depressione

- ✓ modulazione immunitaria

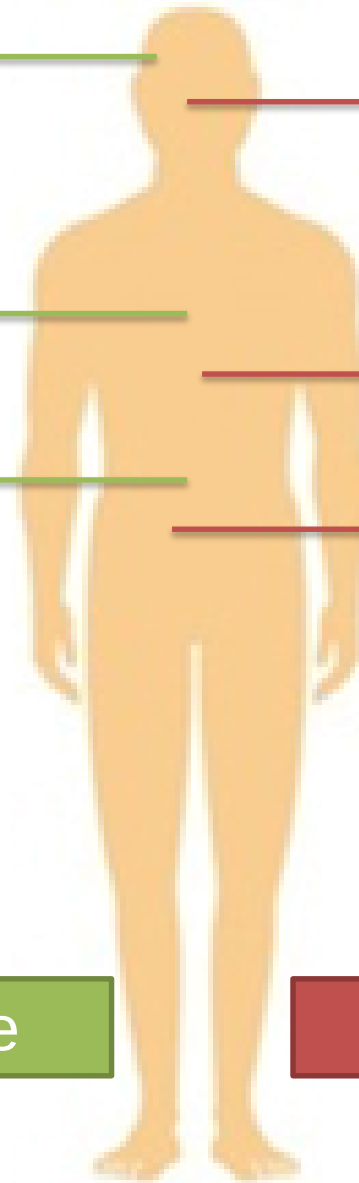
- ✓ aterosclerosi

- ✓ bilancio energetico

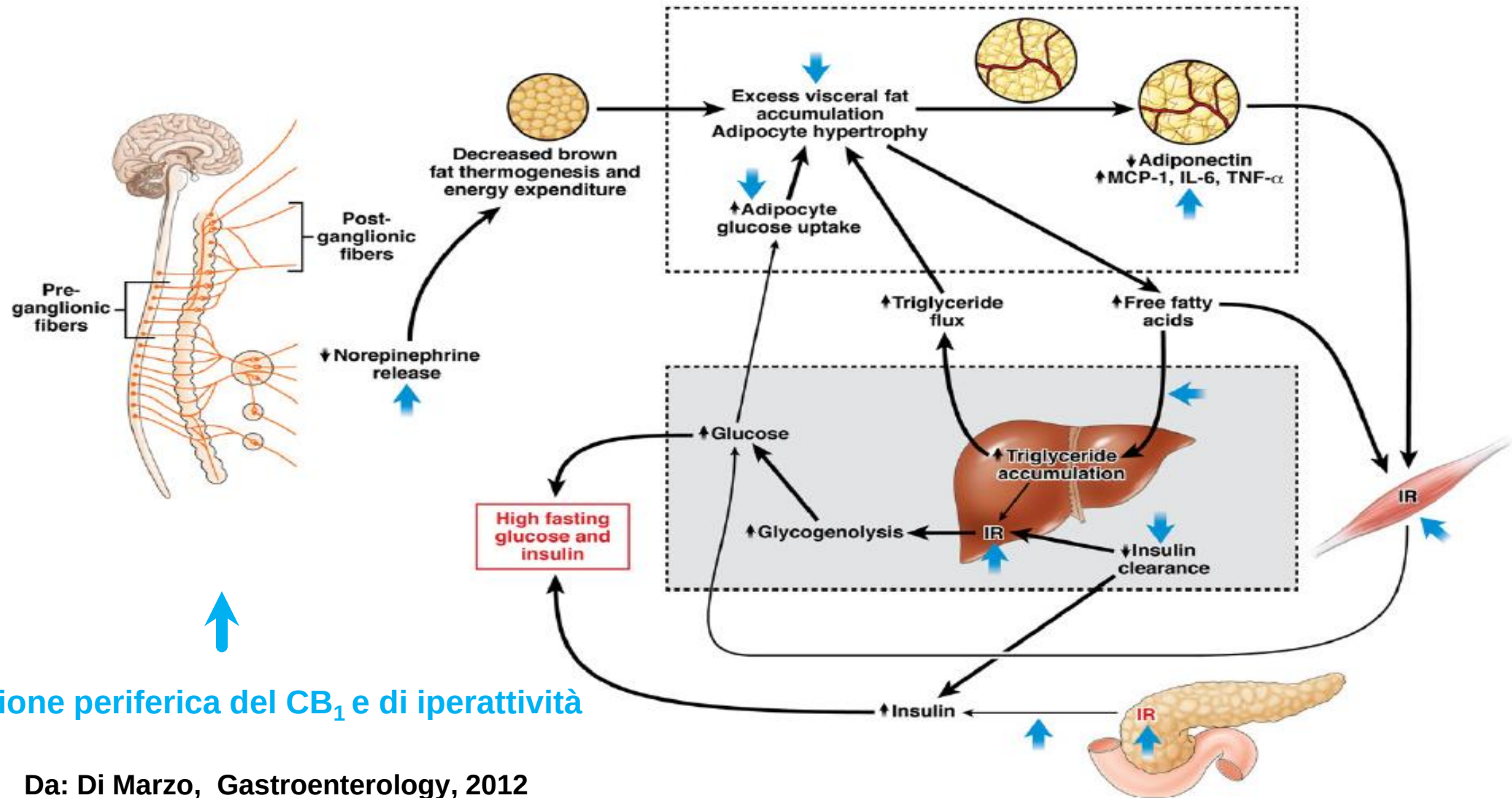
- ✓ obesità
- ✓ sindrome metabolica
- ✓ diabete di tipo 2

Condizioni fisiologiche

Condizioni patologiche



Disregolazione del sistema eCB sul controllo periferico del bilancio energetico durante l'obesità e disordini correlati



Sito di azione periferica del CB₁ e di iperattività

Table 1. Therapeutic Strategies against Obesity and the Metabolic Syndrome that Are Based on or Affect Endocannabinoid Deregulation

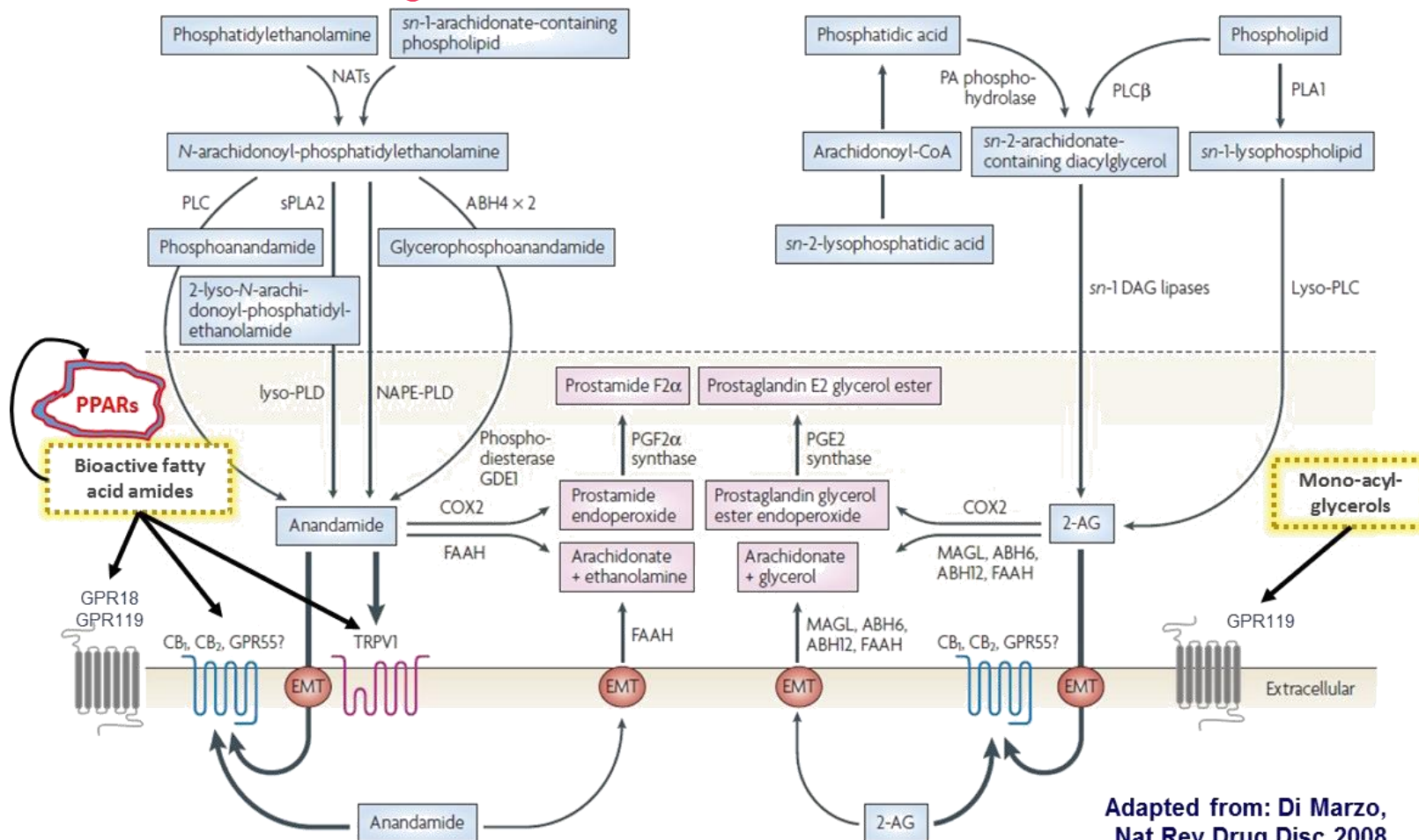
Therapy	Inhibitory Effect on EC Tone	Reduction of Food Intake	Reduction of Body Weight	Reduction of Glucose Intolerance and Insulin Resistance ^a	Reduction of Plasma Triglycerides	Reduction of Visceral Adipose Tissue ^b	Reduction of Liver Fat	Central Side Effects	References
CB1 inverse agonists	In all tissues where EC levels are higher and/or CB1 is constitutively coupled to G protein	Yes, transient	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	(Addy et al., 2008; Bajzer et al., 2011; Colombo et al., 1998; Gary-Bobo et al., 2007; Jourdan et al., 2010; Kim et al., 2012a; Mølhoj et al., 2010; Rohrbach et al., 2012, Vaidyanathan et al., 2012)
CB1 neutral antagonists	In all tissues where EC levels are higher	Yes	Yes	Yes	Yes	Not yet assessed	Not yet assessed	Not yet fully assessed	(Silvestri and Di Marzo, 2012)
Peripherally restricted CB1 blockers	In all peripheral tissues where EC levels are higher and/or CB1 is constitutively coupled to G protein	Yes, through resensitization to leptin, observed with a CB1 inverse agonists	Yes	Yes	Yes	Not yet assessed	Yes	No	(Silvestri and Di Marzo, 2012; Tam et al., 2010, 2012)
DAGL inhibitors	In all tissues where EC levels are higher	Yes	Yes	Not yet assessed	Not yet assessed	Not yet assessed	Not yet assessed	Not yet assessed	(Bisogno et al., 2009, 2012)
Dietary n-3 PUFAs	In all peripheral tissues where EC levels are higher	No	No	Yes	Yes	Not yet assessed	Yes	No	(Banni et al., 2011; Batetta et al., 2009; Di Marzo et al., 2010; Matias et al., 2008a, Piscitelli et al., 2011; Rossmesl et al., 2012)
Lifestyle (exercise + caloric restriction)	Plasma EC levels	–	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	(Bennetzen et al., 2011; Di Marzo, et al., 2009a; Heyman et al., 2012)

EC, endocannabinoid; n-3 PUFAs, n-3 polyunsaturated fatty acids (i.e., docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids).

^aFasting glucose or insulin, oral glucose tolerance test.

^bAs assessed by waist circumference or computer tomography scans in humans.

L'Endocannabinoidoma



	eCB system	eCB-ome
Lipid signals	2	>200
Metabolic enzymes	4	>20
Molecular targets	2	>20

Adapted from: Di Marzo,
Nat Rev Drug Disc 2008

L'endocannabinoidoma apre nuove domande

Con così tanti organi e target cellulari e molecolari, come sappiamo se e in quale direzione il sistema eCB è disregolato durante la sindrome metabolica e come possiamo predire le conseguenze di tale disregolazione?

Con così tanti enzimi biosintetici, come sappiamo quale di questi debba essere inibito per ridurre il tono eCB e come possiamo far fronte ai possibili effetti di compensazione di tale ridondanza?

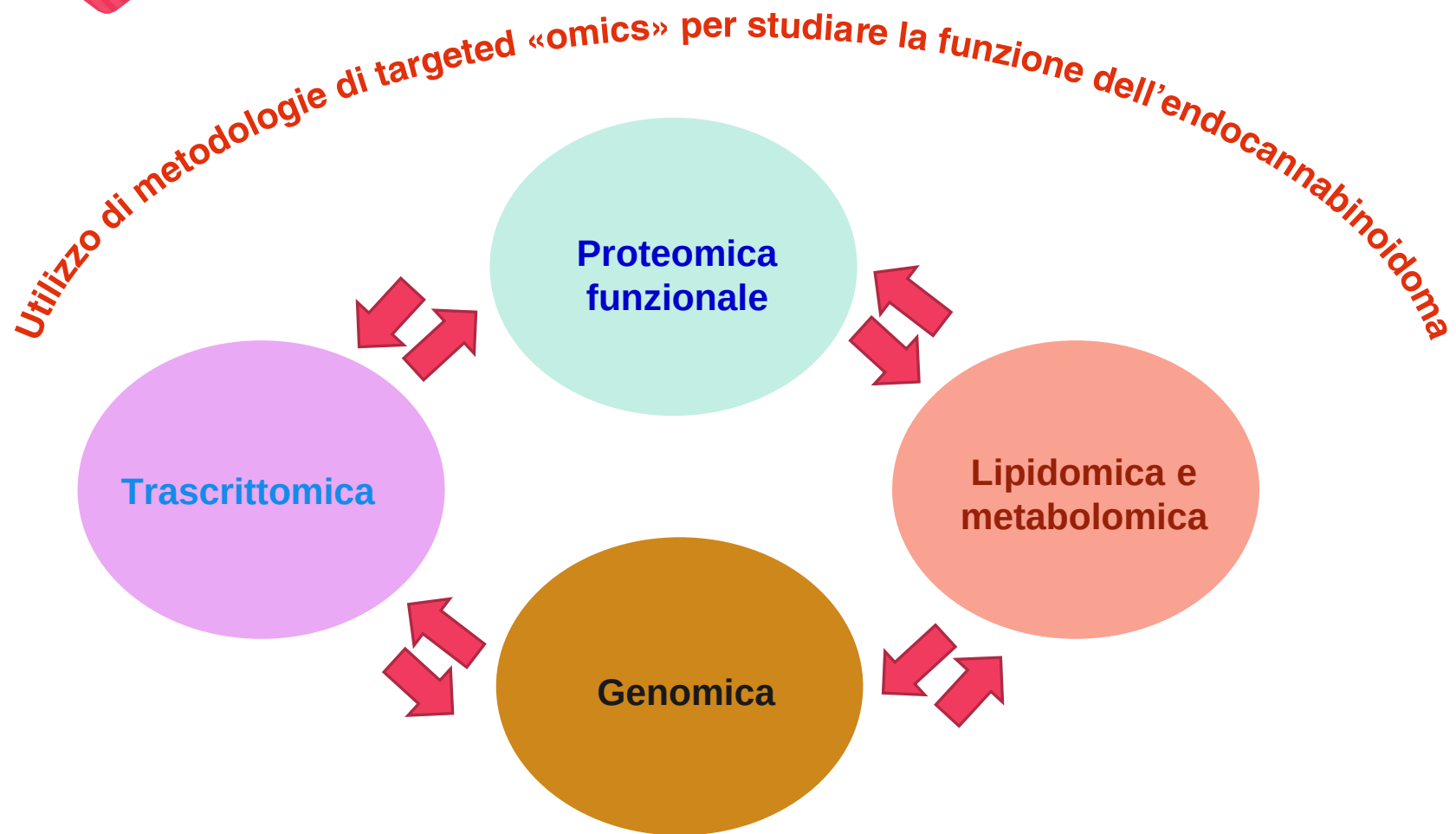
Con così tanti mediatori eCB-like prodotti insieme o degradati dagli stessi enzimi degli eCB, e con così tanti potenziali target che possono essere disregolati contemporaneamente, come sappiamo che un'alterata produzione o inattivazione degli eCB contribuisce realmente ai rischi cardiometabolici, e come decidiamo che è veramente il caso di intervenire, per es. con gli acidi grassi n-3?

Come possiamo essere sicuri che la strategia di intervento sta realmente agendo attraverso la correzione del sistema eCB?



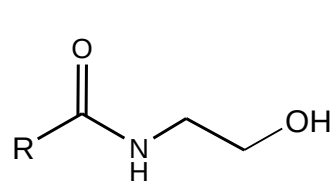
Attraverso il targeted profiling degli output trascrizionali, proteici e metabolici dell'eCBoma in vari tessuti e organi coinvolti nel dismetabolismo e rischio cardiometabolico

Endocannabinoidomica

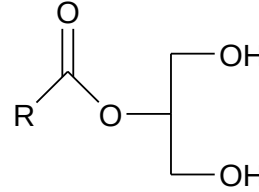


Endocannabinoidomica: approcci di «targeted lipidomics» applicati all'identificazione e quantificazione degli eCB e mediatori eCB-like

R=Alkyl chain
 $R_1=H$ or CH_3
 $R_2=-NH-CH_2-CH_2-OH$



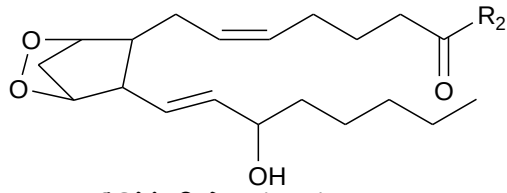
N-acyl-ethanolamine



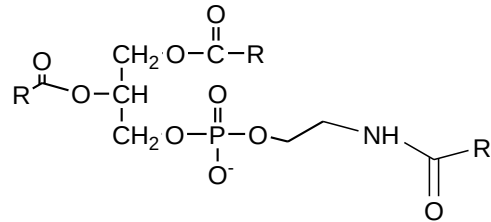
Mono-acyl-glycerol



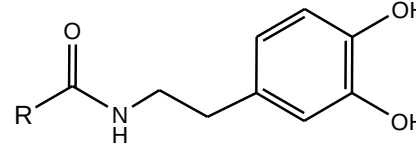
LC-MS-IT-TOF



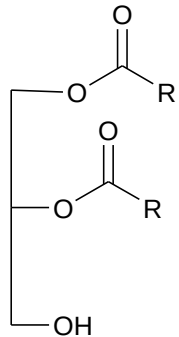
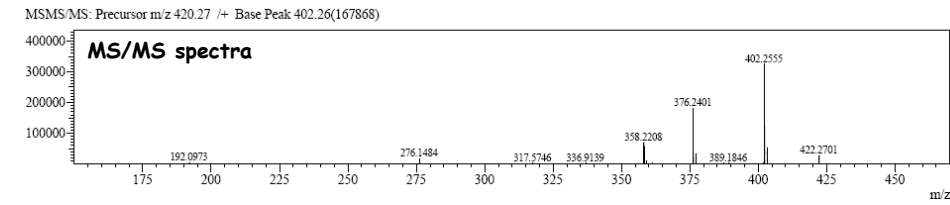
COX-2 Derivatives



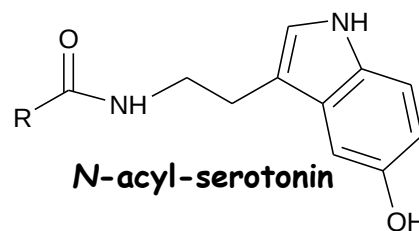
N-acyl-phosphatidyl-ethanolamine



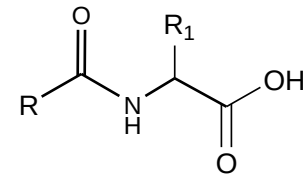
N-acyl-dopamine



Diacyl-glycerol (DAG)



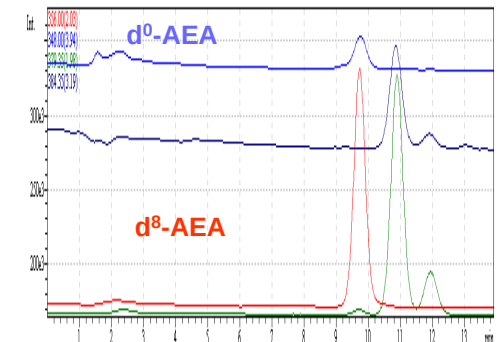
N-acyl-serotonin



N-acyl-amino acid



LC-APCI-MS

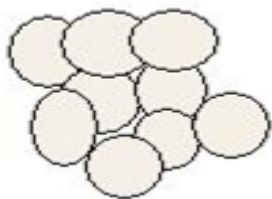


Endocannabinoid regulation in white and brown adipose tissue following thermogenic activation

Lucia M. Krott,^{1,*} Fabiana Piscitelli,^{1,†} Markus Heine,^{*} Simona Borrino,[†] Ludger Scheja,^{*} Cristoforo Silvestri,[†] Joerg Heeren,^{2,*} and Vincenzo Di Marzo^{2,†}

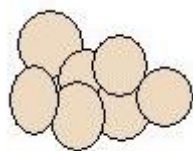
Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology,^{*} University Medical Center Hamburg Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany; and Endocannabinoid Research Group,[†] Institute of Biomolecular Chemistry, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 80078 Pozzuoli, Naples, Italy

¹L. M. Krott and F. Piscitelli contributed equally to this work.



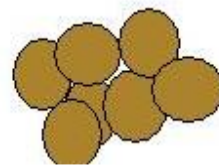
Tessuto adiposo bianco (WAT)

Riserva di energia



Adipociti beige

Browning



Tessuto adiposo bruno (BAT)

Termogenesi



Iniezione acuta o cronica con agonista del recettore β_3 -adrenergico CL316,243

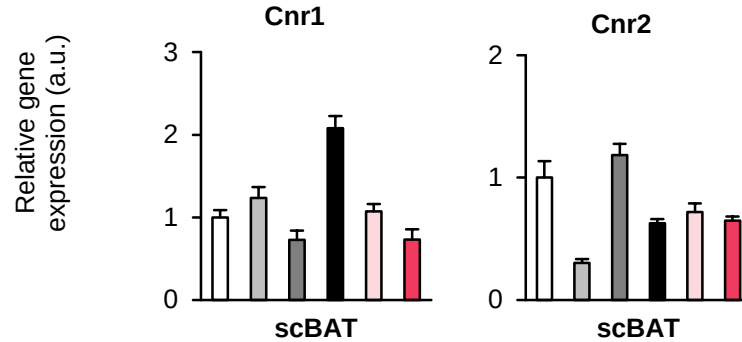
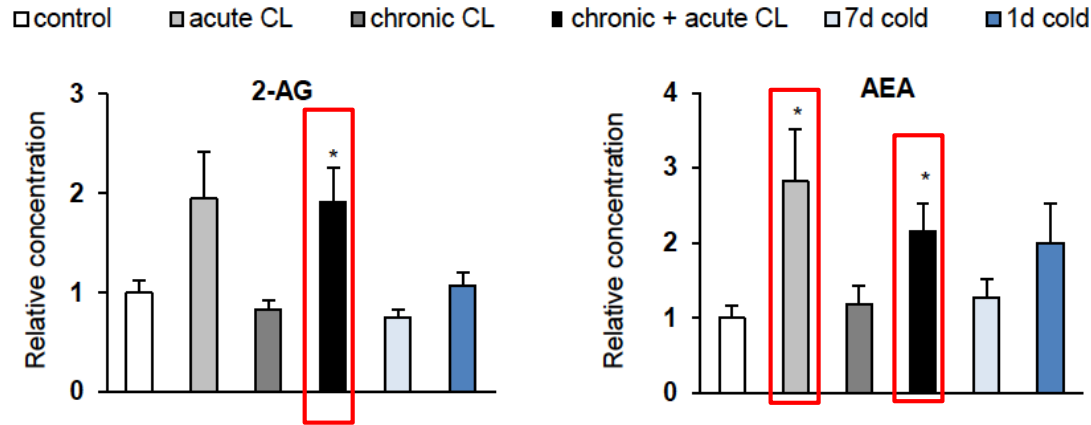


Stabulati per 1 o 7 giorni alla temperatura di 4°C

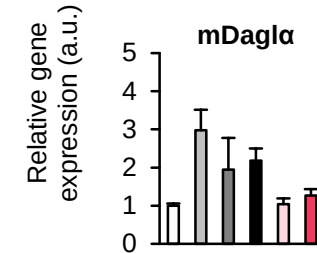


Profiling degli endocannabinoidi in tessuti periferici di topo dopo attivazione del tessuto adiposo bruno (BAT) o del "browning" del tessuto adiposo bianco (WAT), tramite trattamento acuto e/o cronico con un agonista β_3 -adrenergico o per stimolazione attraverso esposizione acuta o prolungata a bassa temperatura.

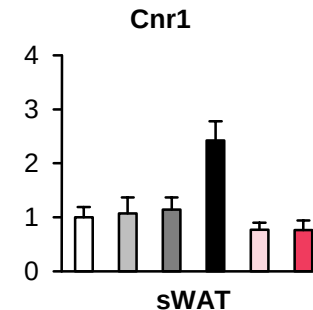
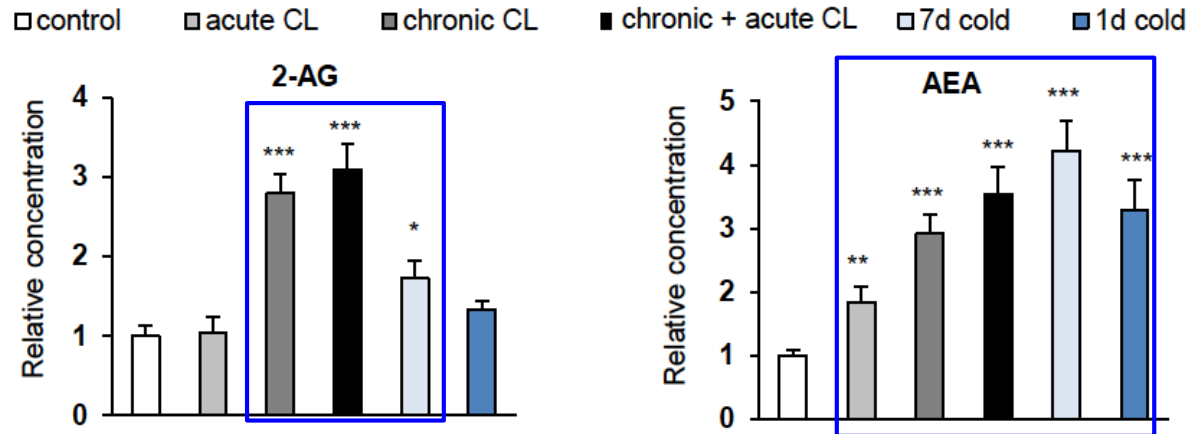
Tessuto adiposo bruno (BAT)



I livelli di espressione dell' mRNA del principale enzima biosintetico del 2-AG (Dagl α) rispecchiano le variazioni osservate nel BAT



Tessuto adiposo bianco (WAT)

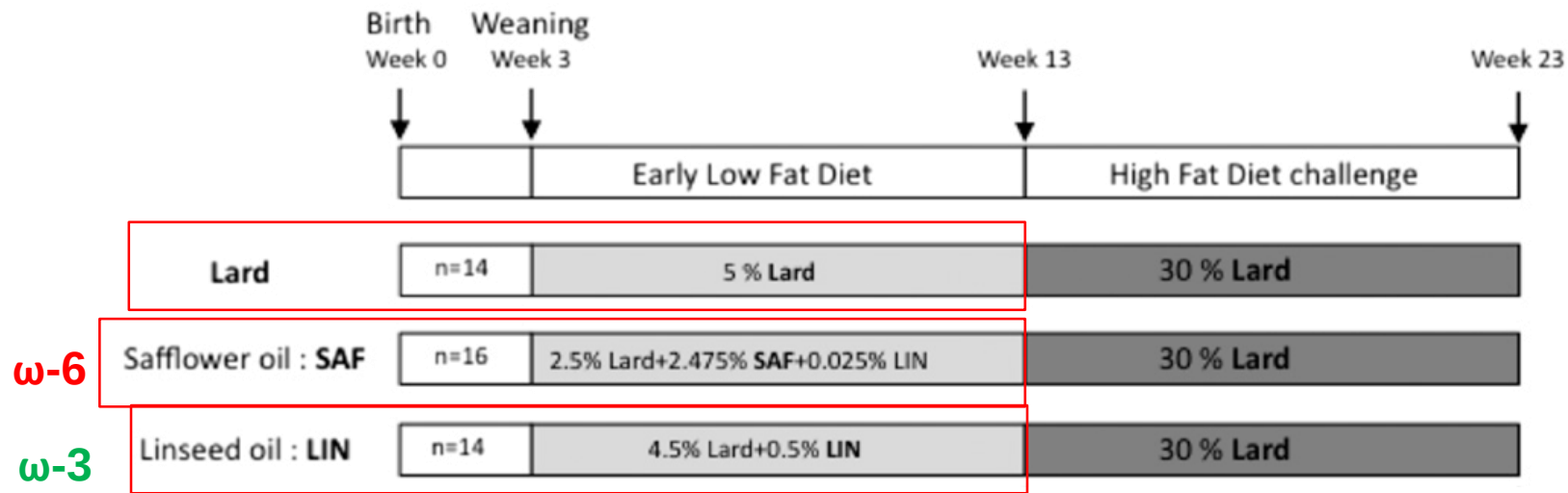
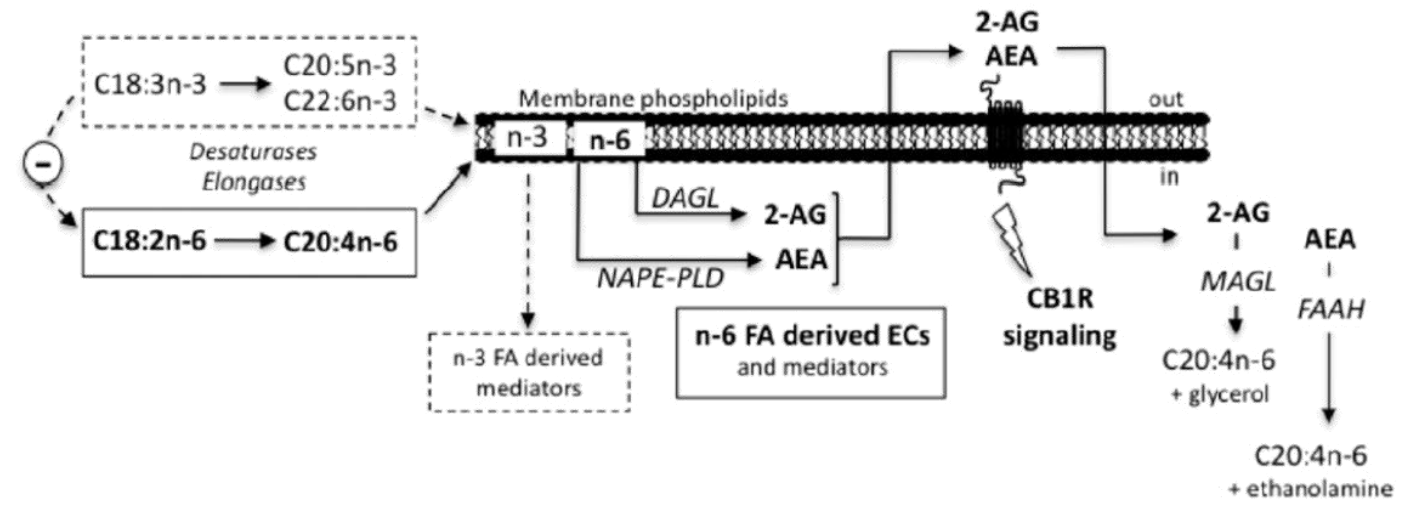


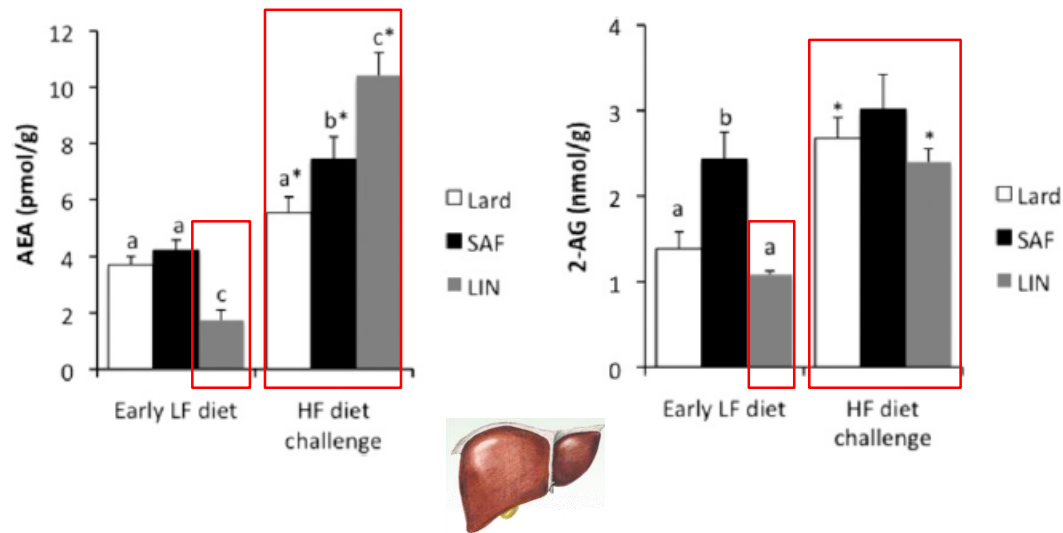
- La stimolazione acuta del BAT con l'agonista del recettore β_3 -adrenergico induce il SE.
- Nel WAT la stimolazione dei recettori β_3 -adrenergici e il browning è accompagnata da una up-regolazione del SE.

Early Low-Fat Diet Enriched With Linolenic Acid Reduces Liver Endocannabinoid Tone and Improves Late Glycemic Control After a High-Fat Diet Challenge in Mice

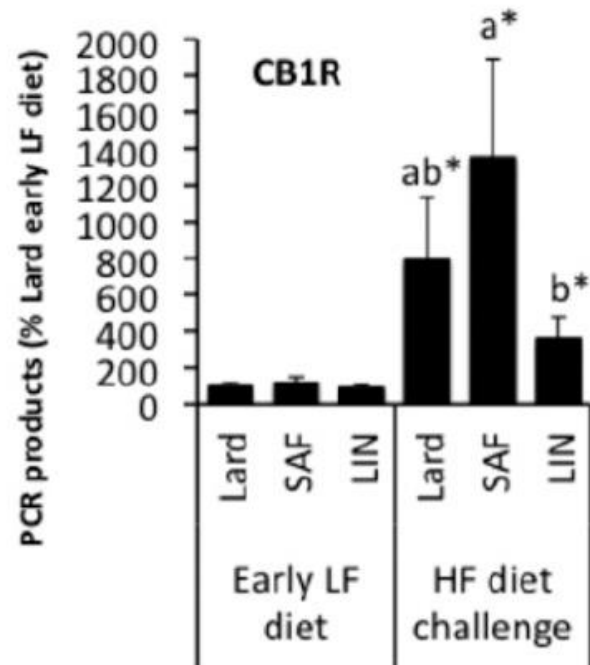
Diabetes 2016;65:1824–1837 | DOI: 10.2337/db15-1279

SCOPO: Investigare la relazione tra il tono endocannabinoide e la composizione della dieta in termini di PUFA (ω -6 vs. ω -3) in topi giovani (durante lo svezzamento) per verificare che una dieta ricca in ω -3 possa prevenire l'obesità indotta da una dieta grassa in età adulta attraverso la down-regolazione dei livelli degli endocannabinoidi.





I livelli di espressione dei geni relativi alla sintesi e degradazione degli EC e del recettore CB₁ in accordo con i livelli.



Una dieta precoce arricchita in ω -3, è in grado di ridurre il tono endocannabinoide dimostrando quindi che l'introduzione nella dieta di questi acidi grassi, può rappresentare una strategia alternativa all'uso dei farmaci per ridurre il tono endocannabinoide nei disordini metabolici.

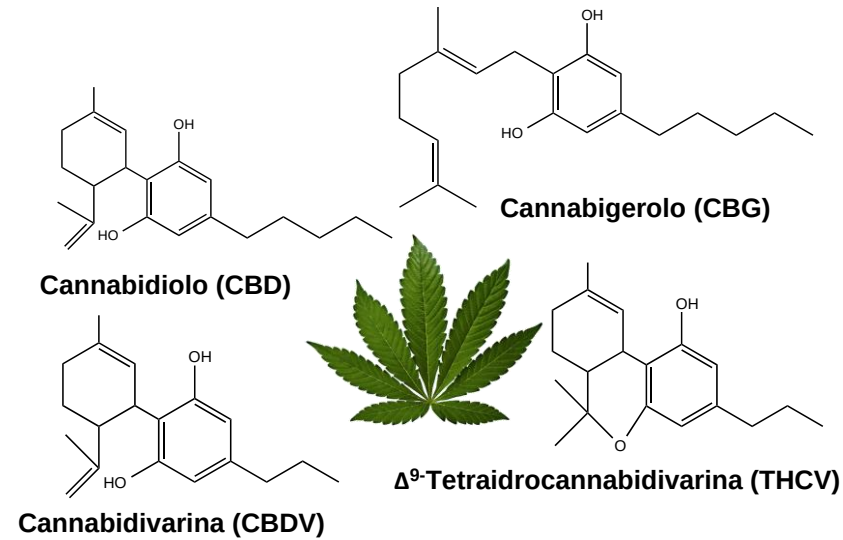
Development of a Rapid LC-MS/MS Method for the Quantification of Cannabidiol, Cannabidivarin, Δ^9 -Tetrahydrocannabivarin, and Cannabigerol in Mouse Peripheral Tissues

Fabiana Piscitelli,^{*,†,§} Ester Pagano,^{‡,§} Anna Lauritano,^{†,§} Angelo A. Izzo,^{‡,§} and Vincenzo Di Marzo^{*,†,§}

[†]Institute of Biomolecular Chemistry, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pozzuoli, Naples, Italy

[‡]Department of Pharmacy, University of Naples Federico II, Naples, Italy

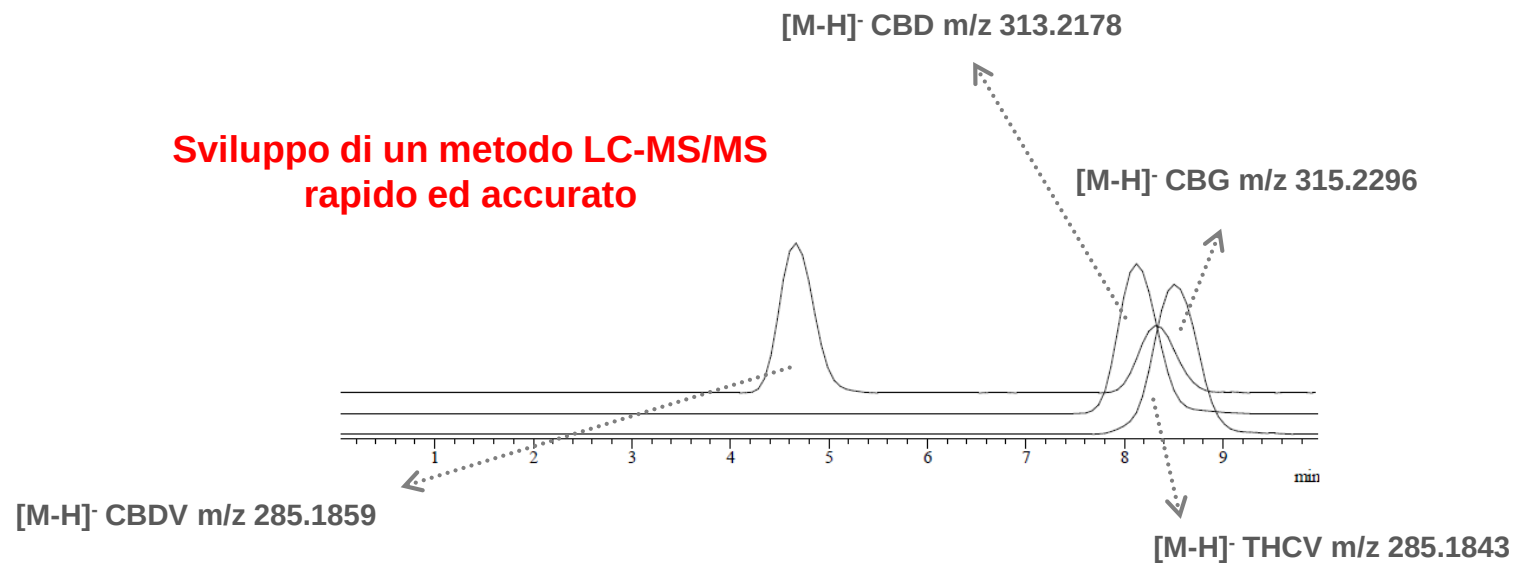
[§]Endocannabinoid Research Group (ERG), Pozzuoli (NA), Italy



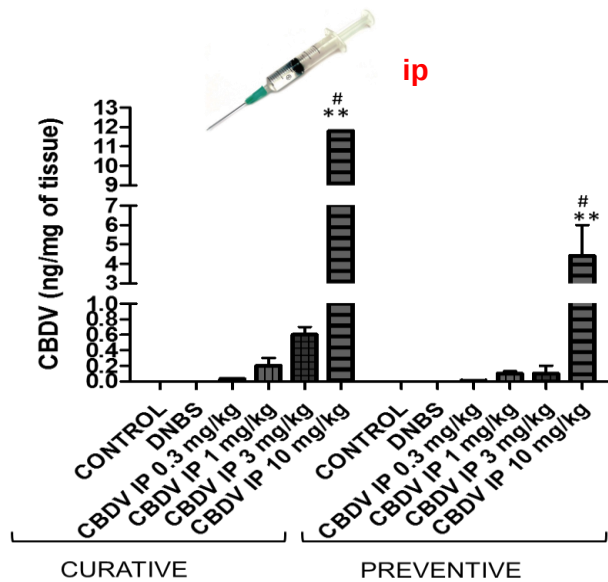
Il cannabidiolo (CBD) è attualmente in commercio insieme al THC, per il trattamento del dolore neuropatico e la spasticità nella sclerosi multipla e, da solo, per indicazioni orfane e in via sperimentale come anti-convulsivo in forme rare di epilessia pediatrica intrattabile. La cannabidivarina (CBDV) e il Δ^9 -tetraidrocanabivarina (Δ^9 -THCV) sono impiegati, rispettivamente, in trial clinici per l'epilessia e il diabete di tipo 2 mentre il cannabigerolo (CBG) ha dimostrato risultati positivi in modelli animali nei disordini infiammatori dell'intestino e contro il cancro al colon e alla prostata.

SCOPO: Sviluppare un metodo rapido tramite spettrometria di massa accoppiata a cromatografia liquida (LC-MS/MS) per la quantificazione di CBD, CBDV, CBG e THCV in estratti di tessuti periferici murini. Tale metodologia è stata applicata in un modello murino di colite sperimentale per quantificare i livelli di CBDV nel colon, immediatamente dopo il trattamento con CBDV.

Sviluppo di un metodo LC-MS/MS rapido ed accurato

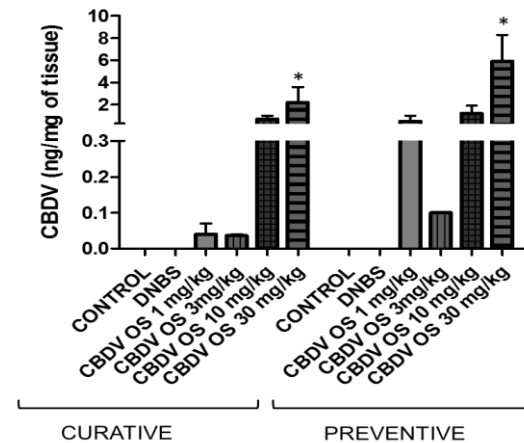


Compound	Retention Time (min)	Transition Ions (m/z)	Molecular Formula	DBE
CBDV	4.6	285>217	C ₁₄ H ₁₈ O ₂	6
		285>173	C ₁₂ H ₁₄ O	6
CBD	8.3	313>245	C ₁₆ H ₂₂ O ₂	6
		313>173	C ₁₂ H ₁₄ O	6
THCV	8.5	285>217	C ₁₄ H ₁₈ O ₂	6
		285>163	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	5
CBG	8.8	315>191	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	5
		315>179	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	4



Modello sperimentale di colite
murina indotta da DNBS trattato
con CBDV via intraperitoneale o
orale

Validazione



orale

Progetti in corso e Prospettive future



GW Coordinated Cannabinoid Research in Naples (CoCRiN, Oct 2016-Jan 2018). Project CoCRiN 4.

PI Fabiana Piscitelli

Quantification of phytocannabinoids and endocannabinoids in tissues from GW academic collaborations by LC-MS-IT-TOF and assessment of the effect of phytocannabinoids on biochemical markers relevant to multiple disease states in tissues from GW academic collaborators.

GW Pilot Project (Jan 2016-June 2017)

PI Fabiana Piscitelli

Pro-adipogenic effect of phytocannabinoids in congenital generalized lipodystrophies.

Aug 2017-Dec 2018

Pro-adipogenic effect of cannabigerol (CBG) in a mouse model of congenital generalized lipodystrophy resistant to high-fat diet induced obesity.



Bando interno ICB “Progetto di ricerca inter-sede e inter-gruppo disciplinare intersezione dell’Istituto di Chimica Biomolecolare-CNR” (Oct. 2016-Apr. 2018)

PI Fabiana Piscitelli, Marianna Carbone, Antonella Manca, Dominique Melck, Debora Paris, Stefania Petrosino, Laura Siracusa, Annabella Tramice

AMICA - **A**nalisi del **M**icrobioma orale durante il **C**iclo ormonale e le sue **A**lterazioni nella menopausa



**GC-MS
Polaris-
GCQ
Thermo**



**HPLC/PDA/MS
Qtof
Waters**

**LC-MS
Single Quadrupole
Shimadzu**

Mass Spectrometry Facility @ ICB

**Responsabile servizio:
Dott.ssa Adele Cutignano**

**LC-MS/MS
IT-TOF
Shimadzu**

<http://web.na.icb.cnr.it/it/index.php/servizi-esterni?id=50>

UHPLC/HRMS

**Q-Exactive
(Orbitrap)
Thermo**



**UPLC-MS
QqQ
Sciex**



2nd Pharma School

CNR, ICB, Pozzuoli (NA)

3-4 Aprile 2017

formazione pratica sulle applicazioni della spettrometria di massa **in ambito farmaceutico**

nei laboratori dell' **Istituto Chimica Biomolecolare del CNR**

Endocannabinoidi e cannabinoidi non psicoattivi

Estrazione e purificazione

Analisi LC-MS-IT-TOF: caratterizzazione e analisi quantitativa

Max numero di partecipanti alle sessioni pratiche: 5

PROGRAMMA E ISCRIZIONI AL SITO:

www.spettrometriadi massa.it



DOCENTI

Sharon Bingham	GW Pharmaceuticals
Adele Cutignano	ICB-CNR
Vincenzo Di Marzo	ICB-CNR
Gianluca Giorgi	Università di Siena
Fabiana Piscitelli	ICB-CNR
Davide Vecchietti	Shimadzu
Roberta Verde	ICB-CNR

SEGRETERIA SCIENTIFICA

dr.ssa Fabiana Piscitelli
Istituto Chimica Biomolecolare CNR
Via Campi Flegrei 34 - 80078 Pozzuoli (NA)
Tel: 081-867-5309 e-mail: fpiscitelli@icb.cnr.it



Direttore Dott.ssa Barbara Nicolaus

Amministrazione ICB

**Antonella Aiello, Antonio
Buonomo, Maria Rita Canfora,
Davide Cannavina, Daniela Matto,
Tito Carozza, Angela Fiengo**

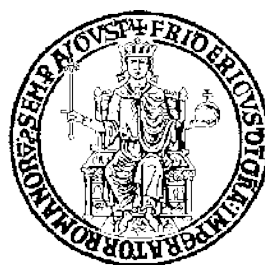
Endocannabinoid Research Group-ICB

Vincenzo Di Marzo, Luciano De Petrocellis, Tiziana Bisogno, Alessia Ligresti, Stefania Petrosino, Roberta Verde, Marco Allarà, Fabio Arturo Iannotti, Aniello Schiano Moriello, Cristoforo Silvestri, Enrico D'Aniello, Lugia Cristino, Roberta Imperatore, Letizia Palomba.

Servizi di Interesse Comune di Istituto **PREDIR**
(**P**ubbliche **REL**azioni con il territorio,
DISseminazione dei **RIS**ultati e formazione)

Giuseppina Andreotti

Pietro Amodeo



Prof. Angelo A. Izzo



Prof. Sabatino Maione

**Grazie per la
vostra
attenzione!**

