

Egy új pszichoaktív drog, a metiléndioxipirovaleron
(MDPV) pre- és posztinatális hatásainak vizsgálata
állatmodellben
Doktori tézisek

Dr. Gerecsei László István

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ádám Ágota, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Hrabovszky Erik, az MTA doktora, tudományos tanácsadó
Dr. Tábi Tamás, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Alpár Alán, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Réthelyi Miklós, az MTA doktora, rector emeritus
Dr. Schlett Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2019

1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedben, Európában több száz új pszichoaktív szer visszaélészerű használata terjed el, nagyban átalakítva az illegális kábítószer piacát és megnehezítve a hatóságok valamint az egészségügyi személyzet dolgát. A megjelent új pszichoaktív szerek használatának fejlődő idegrendszerre való rövid és hosszú távú hatásairól egyaránt keveset tudunk, holott terhes nők is előfordulnak fogyasztóik között.

Az új pszichoaktív szerek egyik legelterjedtebb csoportja a szintetikus katinonoké. Ezek a vegyületek a kacsereje (*Catha edulis*) hatóanyagának származékai, akut hatásaik alapján a pszichostimulánsok közé tartoznak akárcsak a jól ismert amfetamin és kokain. A szintetikus katinonok egyik legfontosabb képviselője a 3,4-metiléndioxipirovaleron (MDPV). Az MDPV használatakor fellépnek a fogyasztó által keresett eufória, növekvő teljesítőképesség, étvágytalanság és csökkent fáradékonyság mellett súlyos mellékhatások is, mint az agitáció, agresszió, psychosis és a szimpatikus idegrendszer aktivációjára utaló egyéb tünetek, mint például tachycardia, hypertónia, hyperthermia. Az MDPV váradósság alatti fogyasztásának következményeiről keveset tudunk, ugyanakkor a hasonló vegyületek (pl.: kokain) vizsgálata

alapján feltételezhetően negatív hatással van a terhesség kimenetelére, illetve a születendő gyermek pszichomotoros fejlődésére.

Hatásmechanizmusát tekintve az MDPV a preszinaptikus dopamin és noradrenalin transzporterek kompetitív inhibitora, ezáltal emeli azok szintjét a szinaptikus résben. Állatkísérletekben az MDPV növeli a lokomotor aktivitást és a sztereotíp mozgásformák gyakoriságát, kimutatható thermoregulációt befolyásoló hatása és magas addikciós potenciálja, emellett ront bizonyos kognitív funkciókat.

Régóta ismert, hogy pszichostimuláns amfetamin és metamfetamin súlyos zavarokat okoz az anyai adaptációban, továbbá az MDPV-hez hatásmechanizmus alapján jobban hasonlító kokain közvetlenül a hypothalamus megfelelő régióiba adva gátolja az anyai viselkedést, vemhesség alatt adagolva pedig csökkenti az utódvisszahordást, rontja a kölykök védelméül szolgáló fészkek építését.

Az idegrendszer funkcionális károsítása mellett strukturális változások is kimutathatóak szintetikus katinonok expozíciója után. In vitro kísérletekben, sejtszinten apoptózis, reaktív oxigén gyökök fokozott felszabadulása, autofágiás testek megjelenése látható pontos szertől és dózistól függően, ugyanakkor az MDPV nem okozza a striatalis dopaminerg végződések károsodását és mikrogliózist sem. A kisszámú

állatkísérletben pedig az entorhinalis és perirhinalis kéregben lehetett neurodegenerációt kimutatni.

A fentiekből látszik, hogy az MDPV prenatális expozíciójának anyai adaptációra való következményei gyakorlatilag nem ismertek, ahogyan az sem, hogy az MDPV pontosan milyen hatással van a fejlődő idegrendszerre: okozhatja-e annak strukturális vagy funkcionális károsodását. Jelen dolgozatban e kérdésekre keressük a választ.

2. Célkitűzések

A dolgozatban a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1) Milyen hatással van az MDPV prenatális adagolása az utód egerek fejlődésére és viselkedésére?

Milyen hatással van az MDPV a vemhesség és a szülés kimenetelére, valamint az utódok testi fejlődésére?

Milyen hatással van az MDPV a megszületett utódok lokomotoros aktivitására és motoros koordinációjára?

2) Hatással van-e az MDPV az anyai adaptációra és az utódgondozásra?

Ha igen, van-e eltérés két, az anyai adaptációban részt vevő neuropeptid a TIP39 és az amylin mRNS expressziójának szintjében a releváns agyterületeken?

3) Van-e az MDPV-nek neurotoxikus hatása felnőtt, ill. fejlődő agyban?

Ha igen, ez milyen agyterületeket és milyen súlyossággal érint?

3. Módszerek

3.1. Kísérleti állatok és kezelésük

Az MDPV prenatális hatásait vizsgáló kísérleteinkhez összesen 40 db C57Bl/6J törzsbe tartozó nőstény egeret használtunk, melyek életkor a pároztatáskor 16 és 22 hét közé esett. Tartásuk a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet és Fejlődéstani Intézetének állatházában, standard állatházi körülmények között történt.

Az állatok naponta egyszer 10 mg/ttkg MDPV-t kaptak szubkután, a vemhesség 8. és 14. napja között, mely időszak alatt jelennek meg az embrióban a mezolimikus rendszer dopaminerg sejtjei. A kontroll állatok fiziológiás sóoldatot kaptak.

Az agyban potenciálisan fellépő programozott sejthalál vizsgálatához a fenti egértörzsbe tartozó 7 napos fiatal egyedeknek vagy felnőtteknek egyszer 10 mg/ttkg MDPV-t (kontroll esetén fiziológiás sóoldatot) adtunk intraperitoneálisan. Fiatal egér esetén ez az életszakasz megfeleltethető a humán harmadik trimeszternek, amikor az agysejtek számbeli növekedése a legnagyobb.

3.2. Lokomotor aktivitás

A lokomotor aktivitást open field vagy aréna teszttel mértük, mely során egy 30*30*30 cm-es, oldalain zárt arénát 3

cm-es oldalú négyzetekre osztottunk, majd 10 percen át manuálisan mértük, hogy hányszor keresztezi az állat az arénát osztó vonalakat. A tesztet anyaállatokon (7 nappal a szülés után), illetve 7 és 21 napos utódaikon végeztük el.

Hét napos egerek vizsgálatára ún. stabilográfiás mérést is alkalmaztunk, mely eszköz az állat súlypontjának elmozdulását érzékeli. A berendezéshez tartozó program egy görbét készít, amely megmutatja, hogy a vizsgálati idő alatt az állat súlypontja milyen útvonalon mozgott. Az elkészült regisztrátumon a platform szektorokra van felosztva, így a teljes megtett útvonal mellett a bejárt terület is látható.

3.3. Motoros koordináció

A motoros koordináció megítélésére ún. grip strength avagy kapaszkodási tesztet végeztünk, mely során az aréna falai között egy stabil 3,5 mm átmérőjű és 25 cm hosszú, vízszintes fém rudat feszítünk ki, majd mérjük, hogy rúd közepére helyezett állat hány másodpercig képes mellső végtagjaival a rúdon kapaszkodni anélkül, hogy leesne. A tesztet az anyaállatokon és 21 napos utódaikon végeztük.

3.4. Anyai viselkedés

Az anyaállatokkal a vemhesség 7. napján (a kezelések előtt), a 11. napján (a kezelések alatt) és a 18. napján (a kezelés vége után) nest building, avagy fészeképítési tesztet végeztünk.

A ketrec tetejére fészekanyagot tettünk, melynek szálait lehúzza az állat búvóhelyet épít magának. Az elkészült fészkek minőségét egy 5 pontos skálán értékeltük.

A szülés utáni 7. napon az anyaállatokkal pup retrieval avagy utódvisszahordási tesztet végeztettünk. Először kivettük az anyaállatot saját ketrecéből, majd az egy csoportban lévő utódokat a ketrec legtávolabbi sarkába tettük. Ezután visszahelyeztük az anyát eredeti pozíciójába. Megmértük, hogy mennyi idő telik el a visszahelyezéstől az első utód megragadásáig, illetve az utolsó utód visszaviteléig.

3.6. Anyai adaptáció vizsgálata in situ hibridizációval

Az anyai motivációt tekintve két neuromodulátor mRNS-ének agyi expresszióját vizsgáltuk: a tuberoinfundibuláris peptid 39-et (TIP39) a thalamus posterior intralaminális komplexében (PIL) és az amylinet hypothalamis medialis preopticus areájában (MPOA). Mindkét neuropeptid expressziója a szülés után közvetlenül nő meg és a kölykök jelenléte alatt magas marad. A PIL-ben található TIP39 pozitív neuronok bemenetet kapnak a felszálló szomatoszenzoros rendszerek felől és részben az amylinet expresszáló hypothalamicus sejteken keresztül hatnak az anyaállat kölykök felé mutatott preferenciájára, az anyai viselkedés motivációs komponensére.

A két neuropeptid vizsgálatára *in situ* hibridizációt használtunk, melyet autoradiográfiás módszerrel mutattunk ki. A kontroll és az MDPV-vel kezelt anyaállatok agyát a post partum 10. napon eltávolítottuk, majd azonnal szárazjégre helyeztük és a felhasználásig -80°C -on tároltuk. Tizenkét μm vastagságú coronalis metszeteket készítettünk kriosztát segítségével, a metszési síkok a TIP39 hibridizáció esetén a bregmától rostrocaudalisan $+0.5$ és -0.5 mm közötti szintben helyezkedtek el, amylin esetén -2.8 és -3.5 mm között. A [^{35}S] izotóppal jelölt uridin-trifoszfátot (UTP) tartalmazó antiszensz probe-ok olyan hígításban kerültek a metszetekre, hogy a percnkénti beütésszám 3×10^5 legyen. Adott állatban minden kilencedik, egymástól tehát rostrocaudalisan $108 \mu\text{m}$ távolságban lévő metszeteket hibridizáltuk. A hibridizációt RNáz A inkubáció és mosás követte, majd a megszáradt metszeteket NTB emulzióba mártottuk és 4°C -on három hétig exponáltuk autoradiográfia céljából. Előhívás és fixálás után Giemsa háttérfestés, majd fedés következett. A kvantitatív elemzés során világos látótérben vizsgáltuk agyanként azt a 3-3, sorban egymás után következő metszetet, ahol a TIP39 illetve amylin mRNS-t tartalmazó neuronok száma a legmagasabb volt. A sejtszám mellett a jelölt mRNS tartalmú neuronok relatív szemcseűrűségét is vizsgáltuk a háttér szemcsézettségéhez viszonyítva.

3.7. Az apoptotikus hatás vizsgálata immunhisztokémiával

A 7 napos vagy felnőtt egerek kezelése után 24 órával az állatokat terminális anesztéziában transzkardiálisan perfundáltuk fixáló oldattal, az agyakat eltávolítottuk. A mintákat ebben az oldatban tároltuk 4°C-on felhasználásig, majd 48 órára szacharóz oldatba tettük. Ezután fagyasztó mikrotómmal 70 µm vastagságú coronalis metszeteket készítettünk, majd minden másodikon kaszpáz 3 immunhisztokémiai festést, a közöttük kimaradókon pedig Nissl-féle festést végeztünk. A kaszpáz 3 immunhisztokémiához a szabadon úszó metszeteket mosás és pepszines feltárás után 5%-os normál kecske szérummal blokkoltunk, majd a metszeteket poliklonális, nyúlban termeltetett anti-kaspáz 3 antisavóval (1:1000) 48 órán át 4°C-on inkubáltuk. További mosások után a szekunder antiszérummal való reakció következett, melyben a metszeteket Alexa Fluor 488-cal kapcsolt anti-nyúl IgG-vel (1:250) 3 és fél órán át, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Rövid száradás és fedés után a metszeteket fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk. Hogy az apoptotikus sejtek összes sejthez viszonyított arányát is értékelni tudjuk, egyes kiválasztott metszeteken a sejtmagokat általánosan jelölő fluorokrómmal, 4,6-diamidino-2-fenilindoldihidrokloriddal (DAPI) felülfestettük. Az adott agyterületen található jelölt sejtek

számát manuálisan, az ImageJ szoftver segítségével számoltuk meg. Az adatokat agyanként 5 metszetről gyűjtöttük, melyek, a közöttük kimaradó és Nissl festett metszetekkel (melyek a kül. agyterületek határainak azonosítására szolgáltak) együttesen egy 700 μm rostrocaudalis kiterjedésű szövetblokkot reprezentáltak.

4. Eredmények

4.1. MDPV kezelés hatása a szülés kimenetelére

Az MDPV-vel kezelt anyák utódait illetően szignifikánsan rosszabb túlélést figyeltünk meg a kontrollesoporthoz képest. Előbbiek esetén előfordult vetélés, korszülés, halva születés és kannibalizmus, valamint a hetedik életnapon szignifikánsan kevesebb élő utódot találhattunk. Ugyanekkor az utódok testtömegét illetően a két csoport között nem volt eltérés.

4.2. Lokomotoros aktivitás

MDPV-vel kezelt anyák 7 és 21 napos utódai egyaránt szignifikánsan magasabb lokomotor aktivitást mutattak open field tesztben, előbbiek mozgását stabilográfia segítségével vizsgálva láttuk, hogy a megnőtt aktivitás inkább a bejárt terület nagyobb méretében, semmint a megtett út hosszában mutatható ki.

4.3. Motoros koordináció

A grip strength tesztben a születési utáni 21. napon mérve nem találtunk jelentős különbséget a kontroll és az MDPV-vel krónikusan kezelt anyaállatok utódai között.

Hét nappal a születés után mérve a kezelt anyaállatok jelentősen rosszabbul teljesítettek a tesztben.

4.4. Anyai adaptáció mérése viselkedési tesztekkel

A nest building tesztben az MDPV-vel kezelt anyaállatok mind a kezelés alatt, mind az után vizsgálva szignifikánsan rosszabb minőségű fészket építettek utódaik számára, mint a kontroll állatok.

Az utód visszahordási tesztben láttuk, hogy az MDPV kezelt anyák esetén az első utód megragadása nem történik később, mint kontroll állatokat vizsgálva, az összes utód fészekbe hordása azonban szignifikánsan hosszabb ideig tart a vemhesség alatt drognak kitett állatoknak. Így tehát az egy utódra jutó átlagos visszahordási idő is hosszabb az MDPV-vel kezelt állatok esetén.

4.5. Az anyai adaptáció vizsgálata in situ hibridizációval

Nem találtunk szignifikáns különbséget a kezelési csoportok között sem a PIL-ben található jelölődött sejtek átlagos számában, sem az ott található jelölődött sejtek TIP39 mRNS denzitásában.

Ehhez hasonlóan, szintén nem találtunk különbséget a kezelési csoportok között sem az amylin mRNS-t expresszáló sejtek átlagos számában, sem pedig a az egyes sejtek átlagos amylin mRNS denzitásában.

4.6. Az MDPV apoptotikus hatása

Hét napos kisegérben, 24 órával egyszeri MDPV beadása után kaszpáz 3 immunorekatív (Casp3+) sejteket a telencephalon számos régiójában sikerült megfigyelni. A Casp3+ sejtek morfológiája több esetben az adott terület egy ismert sejtípusára volt jellemző, amely bizonyos szintű anatómiai alapú identifikációt is lehetővé tett. Eszerint a különböző kérgi területeken piramis- vagy csillagsejt, a striatumban pedig medium spiny neuronnak megfelelő sejtalakok jelölődtek. Az MDPV kezelt csoportban a Casp3+ sejtek számbeli növekedését láttuk a hippocampus CA1 régiójában, a gyrus cinguliban, a retrosplenialis és a piriform kéregben. A legnagyobb növekedést a Casp3+ sejtek számában azonban a nucleus accumbens mutatta. A fenti régiókban a Casp3+ sejtek aránya az összes sejt között szignifikánsan nagyobb az MDPV-vel kezelt állatok esetén, legnagyobb a nucleus accumbensben (8,89%).

Felnőtt állatok hasonló kezelésekor azonban nem látható emelkedett apoptózis egyik vizsgált agyterületen sem.

5. Következtetések

5.1. Prenatális MDPV expozíció hatása a vemhesség kimenetelére

Tíz mg/ttkg MDPV prenatális adagolása csökkent az almonkénti születésszámot, gyakoribbá válnak a szülés körüli komplikációk, összességében jelentős számú utód elvesztésével jár. A szülés utáni 7. napon a kezelt utódok testsúlya nem különbözik a kontrollokétól, (látszólag) tehát rendben fejlődnek.

5.2. Prenatális MDPV expozíció hatása az utódok viselkedésére

Az in utero drognak kitett állatok már 7 napos korukban magasabb spontán aktivitással rendelkeznek kontroll társaiknál. Az open field teszt és a stabilográfiás vizsgálat eredménye is abba az irányba mutat, hogy az állatok nagyobb területet járnak be adott idő alatt, ezzel ellentétben az összes megtett út (stabilográfiával mérve) nem növekedett statisztikailag szignifikáns mértékben. Utóbbiba alig számítható bele a dopaminerg aktivációból fakadó sztereotíp viselkedésformák. Eszerint a prenatálisan MDPV-vel kezelt utódok megnőtt motilitása inkább egyfajta nagy frekvenciájú, szabálytalan, több irányba végzett mozgásnak tekinthető, semmint folyamatos, célirányos sétálásnak.

Grip strength teszt alapján láttuk, hogy prenatális MDPV expozíció nem rontja a motoros koordinációt fiatal állatokban, de 7 nappal a szülés után a kezelt anyaállatok rosszabb eredményt érnek el. A drog krónikus adagolásának ilyen hatása in utero expozíciókor tehát nem látszik érvényesülni.

5.3. Vemhesség alatti MDPV expozíció hatása az anyai adaptációra

Az utód visszahordási teszt eredménye alapján az anyaállatok vemhesség alatti krónikus MDPV kezelése leginkább az összes utód fészekbe hordásának latenciáját növelte, de az egyes utódok visszahordásának ideje szintén szignifikáns növekedést mutatott. Az anyaállatok open field eredményeiben, nem volt különbség, így kijelenthetjük, hogy a lassabb utód visszahordás nem a megváltozott aktivitás következménye, hanem az anyai motiváció specifikus zavara miatt lép fel. A vemhesség alatt épített fészkek minősége az MDPV kezelés hatására szignifikánsan romlott, ez pedig arra utal, hogy az anyai viselkedés zavara a kölykök jelenlététől (és azok viselkedésétől) függetlenül is fennáll.

A TIP39 és az amylin mRNS mérésével egy, a mezolimbikus dopaminerg rendszertől független, de az anyai motivációra ható funkcionális egység lehetséges eltérését vizsgáltuk. Miután sem az amylin, sem a TIP39 mRNS in situ

hibridizáció nem mutatott különbséget sem az expresszázó sejtek számában, sem az expresszió mértékében, így kizárhatjuk, hogy a kölykökből származó szomatoszenzoros információk e rendszeren keresztüli elégtelen feldolgozása lenne a csökkent anyai motiváció oka.

5.4. Az MDPV apoptotikus hatása

Eredményeink arra utalnak, hogy MDPV egyszeri adagolása akutan képes apoptózist indukálni 7 napos fiatal egerben, ugyanez azonban felnőttben nem történik meg. A változások olyan pallialis vagy szubpallialis agyi régiókat érintettek, melyek szerepet játszanak az emóciók és a motiváció létrejöttében (nucleus accumbens, hippocampus CA1, retrosplenialis és piriform kéreg). Az apoptosist szenvedő sejtek száma az összes sejtszámhoz képest a nucleus accumbensben a legnagyobb.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

Ádám Á, **Gerecsei LI**, Lepesi N, Csillag A. (2014) Apoptotic effects of the 'designer drug' methylenedioxypropylamphetamine (MDPV) on the neonatal mouse brain. *Neurotoxicology*, 44: 231-236. **IF=3,379**

Gerecsei LI, Csillag A, Zachar G, Gévai L, Simon L, Dobolyi Á, Ádám Á. (2018) Gestational Exposure to the Synthetic Cathinone Methylenedioxypropylamphetamine Results in Reduced Maternal Care and Behavioral Alterations in Mouse Pups. *Front Neurosci*, 12: 27. **IF=3,566**

6.2. Egyéb publikációk

Gerecsei LI, Ádám Á. (2015) A dizájn drog metiléndioxi-propylamphetamine hatása a fejlődő idegrendszerre kísérletes állatmodellben. *Orv Hetil*, 156: 1221-1225. **IF=0,291**

Gerecsei LI, Balázsa T, Echevarría D, Ádám Á, Zachar G, Csillag A. (2019) Selective neuronal death following exposure to methylenedioxypropylamphetamine (MDPV) is accompanied by an

inhibition of NMDA receptor NR2B subunit expression. *Acta Neurobiol Exp*, 79:19-27. (közlés alatt) **IF=1,500**