

A dizájner drog metiléndioxi-pirovaleron hatása a fejlődő idegrendszerre kísérletes állatmodellben

Gerecsei László István oh. ■ Ádám Ágota dr.

Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Budapest

Bevezetés: A szintetikus kationok családjába tartozó „dizájner drog”, a metiléndioxi-pirovaleron gyakran használt pszichoaktív szer. *Célkitűzés:* A szerzők arra a kérdésre kerestek választ, hogyan hat a metiléndioxi-pirovaleron a vemhesség 8. és 14. napja között adva az utódegek központi idegrendszerének fejlődésére és a viselkedésükre. *Módszer:* Nőstény egereket a vemhesség ezen időszakában 1×10 mg/ttkg metiléndioxi-pirovaleron-oldattal kezeltek subcutan, a kontrollcsoport fiziológiás sóoldatot kapott. Mérték az anyaállatok utódgondozási hajlandóságát, lokomotoros aktivitását és motoros koordinációját. Az utódokon a postnatalis 7. és 21. napon ugyanezeket a tesztek végezték el. *Eredmények:* Az anyaállatok utódgondozási hajlandósága csökkent. A lokomotoros aktivitási tesztben nem volt különbség a krónikusan kezelt állatok és a kontrollcsoport között. A motoros koordinációs teszt eredményei alapján a krónikusan kezelt állatok motoros koordinációja rosszabb volt. A metiléndioxi-pirovaleronnal krónikusan kezelt utódoknál a lokomotoros aktivitás csökkent. *Következtetések:* Az eredmények arra utalnak, hogy a metiléndioxi-pirovaleron hátrányosan befolyásolja a központi idegrendszer neuronjainak integritását. Orv. Hetil., 2015, 156(30), 1221–1225.

Kulcsszavak: dizájner drog, 3,4-metiléndioxi-pirovaleron, viselkedés, terhesség, teratogenitás

Effects of the designer drug methylenedioxyprovalerone on the developing brain in experimental animal model

Introduction: The designer drug methylenedioxyprovalerone is a frequently used psychoactive drug of abuse. *Aim:* The aim of this study was to determine the effect of methylenedioxyprovalerone, administered from the 8th to the 14th day of the gestation, on the development of central nervous system and on the behaviour of offspring mice. *Method:* Pregnant mice were treated during this period either with subcutaneous injection of 1×10 mg/kg body weight methylenedioxyprovalerone or vehicle (saline). Maternal behaviour (pup retrieval test), locomotor activity (open field test) and motor coordination (grip strength test) of dams were evaluated. Locomotor activity at the 7th and 21st postnatal day (open field test) and motor coordination at the 21st postnatal day (grip strength test) were examined. *Results:* Reduced maternal behaviour among treated animals was observed. There was no difference in the results of the open field test between treated and control groups. Decrease of locomotor activity was observed in the pups of the methylenedioxyprovalerone treated dams. *Conclusions:* The results suggest that cathinones (in particular methylenedioxyprovalerone) may adversely affect neural integrity of the developing central nervous system.

Keywords: designer drug, 3,4-methylenedioxyprovalerone, behaviour, pregnancy, teratogens

Gerecsei, L. I., Ádám, Á. [Effects of the designer drug methylenedioxyprovalerone on the developing brain in experimental animal model]. Orv. Hetil., 2015, 156(30), 1221–1225.

A Dr. Fehér János Alapítvány 2015. évi pályázatán díjat nyert dolgozat.

(Beérkezett: 2015. április 23.; elfogadva: 2015. május 28.)

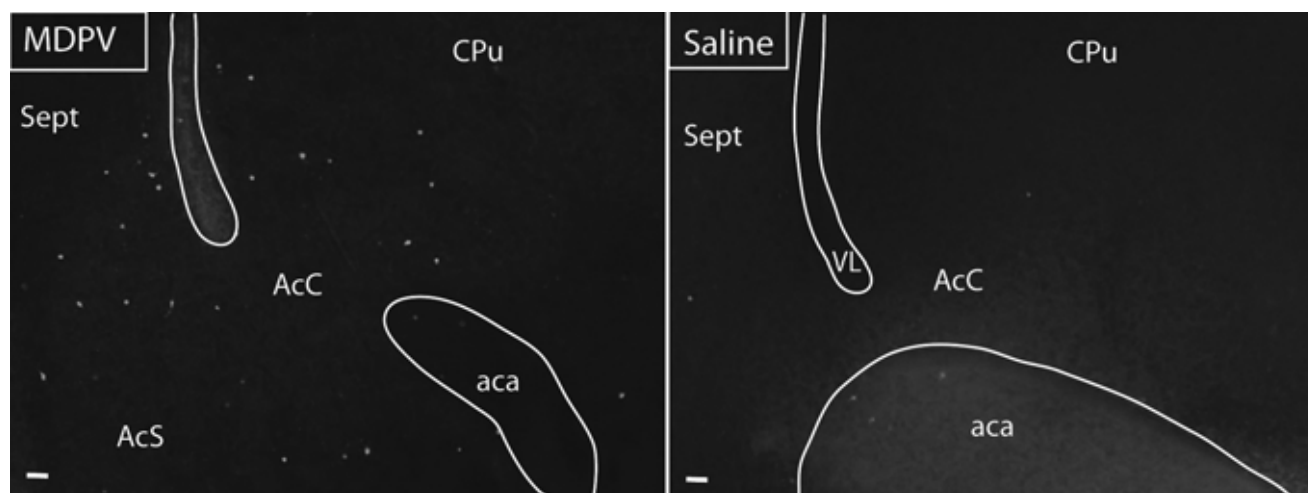
2010 óta a Magyarországon lefoglalt drogok között az úgynevezett „dizájner drogok” aránya folyamatosan emelkedik. A Nemzeti Drog Fókuszpont éves jelentése szerint 2013-ban a droglefoglalások 49%-a csak ilyen típusú szert tartalmazott [1]. A dizájner drogok olyan ismert és illegális pszichoaktív szerek strukturális és funkcionális analógjai, amelyek utánozzák az eredeti szer farmakológiai hatását, azonban törvényi korlátozás alatt nem állnak és/vagy az általánosan használt eljárásokkal nehezen detektálhatóak [2]. Hatásuk az anyavegyülettől függően lehet kannabisszerű, stimuláns, hallucinogén vagy pszichedelikus. Terjedésükhöz nagyban hozzájárul az internet, a viszonylag alacsony ár és a használó azon hite, hogy az alkalmazott szer legális [3]. Számos internetes oldalon „növényvédő szerként” vagy „fürdőszóként” árú sítják ezeket a vegyületeket. A növekvő elterjedtség ellenére e szerek krónikus hatásai, főleg azok, amelyek a fejlődő szervezetre irányulnak, kevésbé ismertek, pedig terhes nők is előfordulhatnak fogyasztók között. A budapesti székhelyű Józan Babák Klub alternatív terhesgondozó szervezet felmérése szerint az utóbbi években a rendszeresen szerhasználó kismamák körében a vényköteles gyógyszerek és az alkohol mellett a *dizájner drogok* használata a leggyakoribb, jelentősen megelőzve a magzatra napjainkra már jóval ismertebb hatással bíró opiátokat, kokaint és amfetamint. Ezen új szerek kísérletes vizsgálata rendkívül időszzerű és nagy jelentőséggel bír.

E „fürdőszó” egyik legelterjedtebb összetevője a 3,4-metilén-dioxi-pirovaleron (MDPV) [4]. Az MDPV a szintetikus katinonok egyike; e vegyületcsoport tagjai kémiaiilag a főleg Afrikában és az Arab-félszigeten honos *kát* növény (*Catha edulis*) hatóanyagából, a katinon-

ból származtathatók [5]. Az MDPV emberre gyakorolt akut hatásai közé tartozik a tachycardia, vérnyomás-emelkedés, izzadás, eufória, megnövekedett éberség, ingerlékenység és szociabilitás, valamint csökkent étvágy és alvásigény. Ezekért a hatásokért az MDPV központi idegrendszerben kifejtett noradrenalin- és dopaminviszszavétel-gátló hatása felelős, de – ellentétben az egyébként igen hasonló amfetammal – az MDPV nem indukál monoamin-felszabadulást a szinapszisban [6]. Az elsődleges pszichológiai hatások 3–4 órán át tartanak. A használat módjai igen változatosak: általában *per os*, de előfordul inhalációs, rectalis, illetve intravénás bevitel is [6].

Jelen kutatásunkban az MDPV fejlődő idegrendszerre gyakorolt hatásait kívántuk tanulmányozni egérmodellel.

Korábbi kutatásaink igazolták, hogy már egyetlen adag MDPV is képes apoptózist kiváltani 7 napos egerek bizonyos agyterületein [7]. Ismert, hogy egérben a postnatalis 4–10. nap megfeleltethető a humán terhesség 3. trimeszterének az idegrendszer fejlődése szempontjából, és ebben az időszakban az idegsejtek száma jelentősen növekszik [8]. A C57BI/6J törzshöz tartozó egereknek 10 mg/ttkg MDPV-t adagoltunk intraperitonealisan fiziológiás sóoldatban oldva (a kontrollállatok csak vehiculumot kaptak) a postnatalis 7. napon. Ezt követően, 24 óra elteltével, az állatokat szöveti fixálás céljából túlaltattuk, majd 4%-os puffertelt paraformaldehidoldattal transcardialisan perfundáltuk. Az eltávolított agykból fagyasztott metszeteket készítettünk, majd kaszpáz-3 elleni antisavóval immunhisztokémiai festést végeztünk. A kaszpáz-3 fehérje kulcsszerepet játszik az apoptózis végső szakaszában, egyike az úgynevezett ef-



1. ábra

Anti-kaspáz-3 immunhisztokémia frontális irányú agyi metszeten a nucleus accumbens core (AcC) és schell (AcS) régióiban intraperitonealis MDPV (bal oldalon) vagy fiziológiás sóoldat (jobb oldalon) adagolását követően 7 napos egérben. Látható a kaszpáz-3-pozitív sejtek jelentősen nagyobb száma az MDPV-vel kezelt állatok nucleus accumbensében, amely alapján valószínűsíthető, hogy az MDPV-kezelés következtében ezen az agyterületen apoptózis következett be

aca = comissura anterior, CPU = caudate-putamen; Sept = septum; VL = oldalkamra. Lépték: 50 μ m

(Forrás: *Ádám, Á., Gerecsei, L. I., Lepesi, et al., Neurotoxicology, 2014 [7] – az Elsevier kiadó engedélyével*)

fektor kaszpázoknak, amelyek a sejt fehérjéinek proteolízisére képesek [9]. Eredményeink azt mutatták, hogy a kezelt állatokban szignifikánsan több apoptotikus sejt található a nucleus accumbensben (1. ábra), a retrosplenialis areában, a hippocampus CA1 régiójában és a piriiform kéregben [7], vagyis a hatás olyan limbikus agyi területekre összpontosul, amelyek ismert szerepet játszanak az érzelmi válaszokban, a motivációban, a tanulásban és az addikcióban. Kisebb mértékű apoptózis az egész (motoros funkciót képviselő) striatum területén is megfigyelhető volt.

Mindezek alapján felmerült a kérdés, hogy hogyan hat a vemhesség alatt adagolt MDPV az utódegerék viselkedésére, illetve hogyan hat magukra az anyaállatokra. Jelen dolgozat ezen kérdéssel foglalkozó vizsgálatunk eddigi eredményeit mutatja be.

Módszer

Kezelés

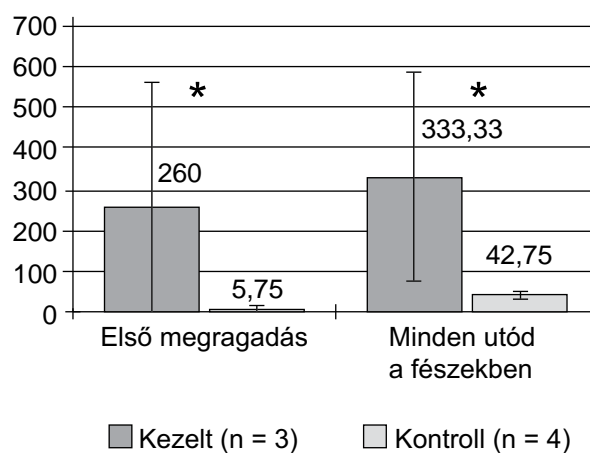
Kutatásunk során 20 darab C57BL/6J törzsbeli nőstény vemhes egeret használtunk fel, amelyek krónikus kezelés során naponta 1×10 mg/ttkg MDPV-oldatot kaptak subcutan injekcióban a vemhesség 8. és 14. napja között. Ez az időszak az agyfejlődés szempontjából a humán terhesség első trimesztere második felének feleltethető meg (a terhesség 8–12. hete). Azért választottuk ezt a periódust, mert ebben az időszakban alakulnak ki a striatum dopaminerg neuronjai. A kontrollállatok fiziológiás sóoldatot (vehiculum) kaptak ugyanilyen módon és ideig.

Akut drogkezelés esetén az anyaállatok 1×10 mg/ttkg MDPV-t (a kontrollállatok vehiculumot) kaptak subcutan, majd 10–30 perc múlva végeztük a viselkedési teszteket.

A kutatást az Egészségügyi Engedélyeztetési és Közigazgatási Hivatal (ez év március 1-jétől Egészségügyi Nyilvántartási és Képzési Központ) Kábítószerügyi Főosztályának engedélyével (27924/2011/KÁB) végeztük. A kísérlethez használt MDPV-t a gyártótól (LGC Standards, Teddington, Middlesex, UK), a főti székhelyű Medinspect Kft. közreműködésével szereztük be.

Viselkedési tesztek

Fészekbe hordási teszt (úgynevezett *pup retrieval test*). Az anyaállatokon végzett vizsgálat, amellyel az utódegerék hajlandóság mértékére következtethetünk [10]. A teszt arra alapul, hogy az anyaállat utódai számára kijelöl egy fészket, és ha a fészkekből az utódokat a ketrec egy másik pontjára helyezük át, akkor az anyaállat visszaviszi oda azokat. Mértük, hogy az anyaállat hány másodperc után kezd hozzá a fészkekből eltávolított utódok begyűjtéséhez, illetve hány másodperc elteltével végez az utolsó utód fészekbe vitelével.



2. ábra

A vemhesség alatt krónikusan MDPV-vel kezelt anyaállatok fészekbe hordási (pup retrieval) tesztjének eredményei. Függőleges tengely: idő (s). Mind az első utód megragadása, mind az utolsó utód fészekbe vitele több idő elteltével történt meg a vemhesség alatt MDPV-vel kezelt állatok esetén, azaz a drogkezelés csökkentette az utódegerékre való hajlandóságot

*Mann-Whitney U-teszt, $p < 0,05$

Kapaszkodási teszt (úgynevezett *grip strength test*). Az anyaállatokon, illetve 21 napos utódaikon végeztük ezt a vizsgálatot, amelynek lényege, hogy egy zárt térész (aréna) fölé vízszintesen fémrudat feszítünk ki, majd mérjük, hogy a ráhelyezett állat hány másodpercig képes a fémrudon megkapaszkodni, avagy mennyi idő után esik le. A teszt alkalmas a motoros koordináció vizsgálatára [11].

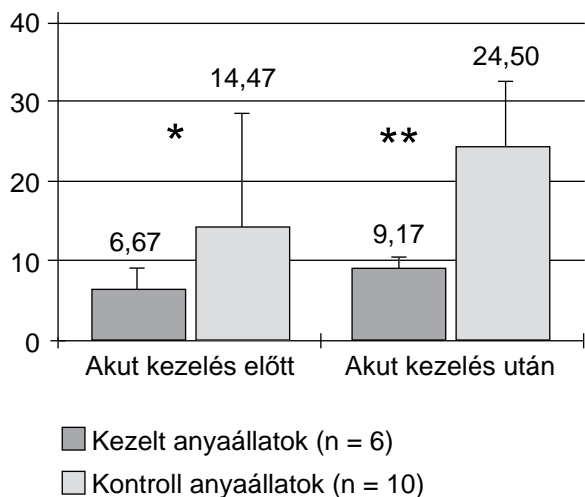
Aréna-teszt (*open-field test*). Ezt a vizsgálatot az anyaállatokon és 7, illetve 21 napos utódaikon végeztük. Ennek során a kísérleti állatot egy zárt térrészbe (aréna) helyeztük, amelynek az aljára előzetesen négyzetes rácsot rajzoltunk, majd feljegyeztük, hogy 5 perc alatt hányszor keresztezi az állat a rácsvonalakat [12].

Eredmények

Az anyaállatok fészekbe hordási tesztje azt mutatta (2. ábra), hogy a vemhesség alatt krónikusan kezelt állatoknak átlagosan 260,0 másodpercig tartott az első utód megtalálása és megragadása, míg a kontrollcsoportnak ehhez szignifikánsan rövidebb idő, 5,75 másodperc kellett. Hasonlóképpen, szignifikánsan hosszabb ideig tartott az utolsó utód begyűjtése a kezelt csoportnak ($t = 333,3$ s), mint a kontrollcsoport állatainak ($t = 42,75$ s).

Az anyaállatok kapaszkodási tesztjének eredményét elemezve feltűnik, hogy a vemhesség alatt alkalmazott kezelés rontja a teljesítményt; ezen állatok átlagosan mintegy feleannyi ideig ($t = 6,67$ s) voltak képesek a kifeszített fémrudon fennmaradni, mint kontrolltársaik ($t = 14,47$ s) (3. ábra).

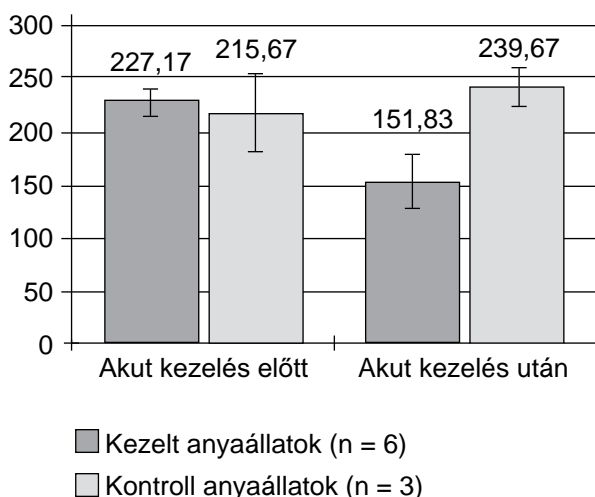
Egyszeri MDPV-dózis akut hatására mind a krónikusan kezelt, mind a kontrollcsoport tagjai jobban teljesítettek, vagyis hosszabb ideig voltak képesek a kifeszít-



3. ábra

Anyaállatok kapaszkodási (grip strength) tesztje. Független tengely: idő (s). Látható, hogy a vemhesség alatt kezelt csoport állatai kevesebb ideig képesek a fémrúdon fennmaradni, tehát motoros koordinációjuk gyengébb. 10 perccel egyszeri akut 10 mg/ttkg MDPV-kezelést követően mindkét csoport eredményei javultak

*F = 30, df = 7, p = 0,001 (ANOVA); **F = 16,4, df = 7, p = 0,005 (ANOVA)



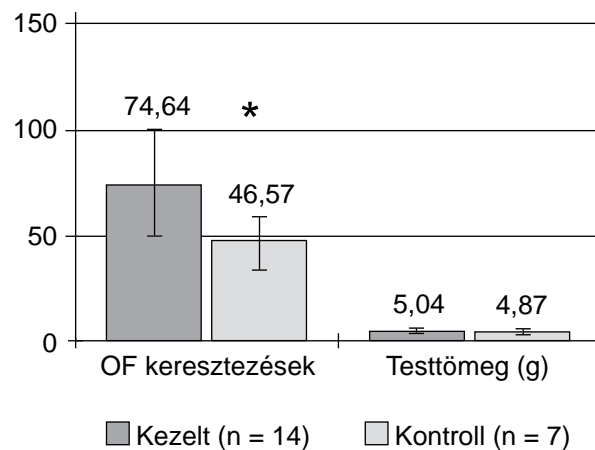
4. ábra

Anyaállatok aréna- (open-field) tesztje. Független tengely: rácsvonal-kereszteezések száma. A vemhesség alatt kezelt és a kontrollállatok eredménye között nincs kimutatható különbség. Egyszeri akut 10 mg/ttkg MDPV hatására a korábban kezelt állatok lokomotoros aktivitása csökken, míg a kontrollállatok lokomotoros aktivitása növekszik. Ez statisztikailag azonban csak trendszerűen állapítható meg

t = 2,3, n = 9, p = 0,057 (kétmintás t-próba)

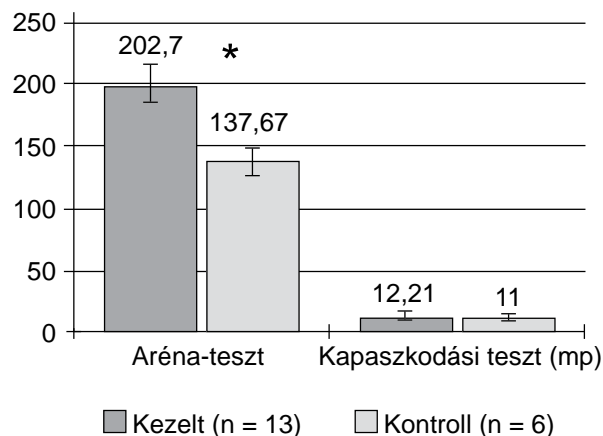
tett fémrúdon kapaszkodni a kapaszkodási teszt során (3. ábra).

Az anyaállatokban elvégzett aréna-teszt tanúsága szerint, a vemhesség alatt kezelt és a kontrollcsoport tagjainak eredménye között nincs különbség, azonban a már előbb említett egyszeri akut MDPV-kezelés eltérően hat a két csoportra. Míg a kezelt csoport tagjainak motoros aktivitása csökkent, addig a kontrollcsoport eredménye



5. ábra

7 napos egerek aréna-tesztjének eredményei. Független tengely: rácsvonal-kereszteezések száma, illetve testtömeg (g). A kezelt állatok aréna-tesztjének eredménye szerint a lokomotoros aktivitásuk szignifikánsan magasabb a kontrollállatokénál (*p = 0,014; Mann-Whitney U-teszt). A testtömegben nincs jelentős különbség



6. ábra

21 napos utódok aréna- és kapaszkodási tesztjeinek eredményei. Független tengely: rácsvonal-kereszteezések száma, illetve idő (s). Hasonlóan a 7 napos utódokhoz, a terhesség alatt krónikusan kezelt anyák utódainak lokomotoros aktivitása nagyobb; ezek többször keresztezték az aréna rácsosását (*p = 0,014; Mann-Whitney U-teszt). A kapaszkodási teszt eredményében azonban nem volt jelentős eltérés a csoportok között

éppen ellentétes irányú változást mutatott (4. ábra). Ez azonban statisztikailag legfeljebb trendszerűen állapítható meg.

Az utódokat vizsgálva megfigyeltük, hogy 7 napos korban azok az állatok, amelyek anyja vemhesség alatt MDPV-t kapott, az aréna-teszt során nagyobb aktivitást mutattak, mint a kontrollanyák utódai. A mért testtömegben nem volt különbség a csoportok között (5. ábra).

Két héttel később, 21 napon is elvégeztük az utódegekkel az aréna-tesztet, és – hasonlóan a 7 napos korban vizsgáltakhoz – azt láttuk, hogy a vemhesség alatt krónikusan kezelt anyák utódai nagyobb aktivitást mutatnak a teszt során, mint a kontrollállatok utódai (6. ábra). Ebben az életkorban már a kapaszkodási teszt

is elvégezhető, azonban ebben nem találtunk eltérést a két csoport eredményei között.

Megbeszélés

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a vemhesség alatt krónikusan adagolt MDPV csökkenti az anyaállatok utódgondozási hajlandóságát. Ugyancsak az anyaállatokban figyeltük meg azt is, hogy bár a mozgási aktivitás nem módosul krónikus MDPV-kezelés hatására, a későbbi egyszeri kezelésre adott akut választ a korábbi krónikus kezelés módosíthatja. Az aréna-teszt során azonban azt is észleltük, hogy akut MDPV hatására gyakoribbá váltak az embernél is ismert úgynevezett sztereotíp viselkedésmódok: ez egerek esetén rágcsalást, kényszeresnek tűnő mosakodást, a fej különböző irányokba való biccentését jelenti. A sztereotipikus mozgások csökkenthetik a helyváltoztatás mértékét, ami az aréna-teszteknél nem kívánt befolyásoló tényezőként (mintegy zajként) léphet fel. Az MDPV krónikus adagolása csökkenti az anyaállatok motoros koordinációs képességét, ezt a kezelt csoportban 'rosszabb' kapaszkodási teszteredmények alapján mondhatjuk ki. Ez összhangban van korábbi eredményeinkkel, amelyek a striatumnak az MDPV hatására kialakuló károsodását mutatták [7].

Az utódegenerok esetében megállapítottuk, hogy mind a postnatalis 7., mind a 21. napon mérve, az MDPV-vel kezelt állatok utódai nagyobb motoros aktivitást mutattak, mint a kontrollállatok utódai. Ennek egyik oka lehet a csökkent anyai törődés, ugyanis a fészekbe hordási tesztek eredményei alapján valószínűsíthető, hogy ezeknek a kisegereknek többet kell tenniük az anyai gondoskodásért, élelemért, mint a kontrollállatok utódainak. Egy másik lehetséges, de egyelőre bizonyításra szoruló magyarázat azt feltételezi, hogy az anyaállatok krónikus drogepozíciója hatására az utódok *in utero* olyan agyi változásokat szenvednek el, amelyek a motoros és/vagy motivációs rendszert tartósan károsítják. Az utóbbi eshetőség – éppen a humán analógiák miatt – elég aggasztó ahhoz, hogy a téma további kísérletes vizsgálatát az eddigi és továbbfejlesztett vizsgálati módszerek segítségével megalapozza.

Anyagi támogatás: Jelen kutatás az OTKA PD-105251-es számú pályázatának támogatásával valósult meg.

Szerzői munkamegosztás: A szerzők a munka összes fázisában egyenlő arányban vettek részt. A cikk végleges változatát mindkét szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Irodalom

- [1] 2014 National Report (2013 data) to the EMCDDA by the Reitox National Focal Point. [2014-es éves jelentés (2013-as adatok) az EMCDDA számára. Készítette: Nemzeti Drog Fókuszpont.] www.drogfokuszpont.hu [Hungarian]
- [2] Wohlfarth, A., Weinmann, W.: Bioanalysis of new designer drugs. *Bioanalysis*, 2010, 2(5), 965–979.
- [3] Szily, E., Bitter, I.: Designer drugs in psychiatric practice – A review of the literature and the recent situation in Hungary. *Neuropsychopharmacol. Hung.*, 2013, 15(4), 223–231.
- [4] Spiller, H. A., Ryan, M. L., Weston, R. G., et al.: Clinical experience with and analytical confirmation of “bath salts” and „legal highs” (synthetic cathinones) in the United States. *Clin. Toxicol. (Phila.)*, 2011, 49(6), 499–505.
- [5] Coppola, M., Mondola, R.: Synthetic cathinones: Chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as “bath salts” or “plant food”. *Toxicol. Lett.*, 2012, 211(2), 144–149.
- [6] Miotto, K., Striebel, J., Cho, A. K., et al.: Clinical and pharmacological aspects of bath salt use: a review of the literature and case reports. *Drug Alcohol Depend.*, 2013, 132(1–2), 1–12.
- [7] Ádám, Á., Gerecsei, L. I., Lepesi, N., et al.: Apoptotic effects of the ‘designer drug’ methylenedioxypropylvalerone (MDPV) on the neonatal mouse brain. *Neurotoxicology*, 2014, 44, 231–236.
- [8] Bayer, S. A., Altman, J., Russo, R. J., et al.: Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*, 1993, 14(1), 83–144.
- [9] Porter, A. G., Jänicke, R. U.: Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.*, 1999, 6(2), 99–104.
- [10] Porter, R. H.: Communication in rodents: adults to infants. In: Elwood, R. W. (ed.): *Parental behaviour of rodents*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1983.
- [11] Crabbe, J. C., Cotnam, C. J., Cameron, A. J., et al.: Strain differences in three measures of ethanol intoxication in mice: the screen, dowel and grip strength tests. *Genes Brain Behav.*, 2003, 2(4), 201–213.
- [12] Walsh, R. N., Cummins, R. A.: The open-field test: a critical review. *Psychol. Bull.*, 1976, 83(3), 482–504.

(Ádám Ágota dr.,
Budapest, Tűzoltó u. 58., 1094
e-mail: agota@ana.sote.hu)