

Génexpressziós vizsgálatok az ecstasy és az
antidepresszánsok interakciójának molekuláris
szintű követésére

Doktori tézis

Petschner Péter

Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Semmelweis Egyetem



Témavezetők: Bagdy György, DSc., egyetemi tanár
Tóthfalusi László, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Zelles Tibor, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Gacsályi István, Ph.D., osztályvezető

A szigorlati bizottság elnöke:

Takács-Novák Krisztina, DSc., egyetemi tanár

A szigorlati bizottság tagjai:

Miklya Ildikó, Ph.D., egyetemi docens

Wittner Lucia, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest
2016

BEVEZETÉS

Az ecstasy nevű kábítószer hatóanyaga, a 3,4-metiléndioxi-metamfetamin (MDMA), egy gyűrűszubsztituált amfetaminszármazék, mely központi idegrendszerbe való bejutását követően kötődik a szerotonin- (5-HT), dopamin- (DA) és noradrenalin (NA) transzporterekhez (SERT, DAT, NAT). A kötődést követően az MDMA transzportfehérjéken keresztüli sejtekbe való bejutását az említett monoaminok felszabadulása kíséri. A felszabaduló 5-HT, DA és NA a felelős az ecstasy akut, „pozitív” hatásaiért, mint pl. az eufória, a fáradhatatlanság vagy a fokozott szociabilitást jelentő entaktogén hatás. Ugyanakkor ezekkel a hatásokkal párhuzamosan az MDMA olyan folyamatokat is beindít, melyek akutan károsíthatják a neuronokat, így hipertermiát okoz, szabadgyökképződést indukál és károsítja az agyi autoregulációt, vagyis az idegsejtek megnövekedett glükóz és oxigénigényét vasoconstrictio követi. Hosszútávon az MDMA a szerotonerg markerek olyan csökkenését okozza, melyet a szerotonerg rendszer szelektív károsodásaként értelmezünk. Csökken a triptofán-hidroxiláz vagy a SERT szintje azokon a

területeken, így pl. a frontális kéregben, ahova a raphe-magvakból kiinduló 5-HT tartalmú idegsejtek projiciálnak. A szerotonerg rendszert érintő változásokkal párhuzamosan funkcionális károsodások is fellépnek, így az ecstasy használókban fokozott depressziós hajlam, a motoros- és kognitív funkciók csökkenése figyelhető meg. Bár a szerotonerg rendszert érintő változások az elmúlt években állatkísérleteken keresztül részben körvonalazódtak, a nem specifikus károsító útvonalak felvetik a lehetőségét más mechanizmusoknak is, melyek az MDMA okozta krónikus funkcionális változások mögött megbújhatnak.

A venlafaxin (VLX) egy terápiásan hatékonyan mutatkozó, jelenleg is forgalomban lévő antidepresszáns vegyület, amely a SERT és NAT gátlásán keresztül szintén emeli a 5-HT és NA szintjét a szinaptikus résben, bár jóval kisebb mértékben, mint az MDMA. Az antidepresszánsok legnagyobb része akutan ugyancsak kötődik valamelyik monoamintranszporterhez. A monoaminkoncentrációk akut növekedése azonban nem lehet kizárólag felelős terápiás hatásaikért, mivel 1) az antidepresszáns hatás csak hetekkel később jelentkezik, 2) a betegek 30-40%-a nem reagál a jelenlegi

antidepresszáns kezelésekre, 3) a farmakológiai terápiák kombinációja pszichoterápiával hatékonyabbnak mutatkozott a kizárólag gyógyszerekre támaszkodó kezeléseknél. Ezért számos elmélet született, melyek igyekeztek megmagyarázni e különbségeket. Az egyik ilyen elmélet a háttérben a 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} és az α_2 autoreceptorok deszenzitizációján keresztül a monoamin szintek tartós megemelkedését feltételezte, míg egy másik, a depresszió ún. szinaptikus teóriája, szerint depresszió esetén az agyban megtalálható szinapszisok száma jelentősen csökkenhet és az antidepresszánsok a szinapszisok képződésének stimulálásán keresztül képesek helyreállítani a károsodott hálózatokat. Míg az ún. depressziós agyi kör, nevezetesen a prefrontális kéreg, a hippocampus és az amygdala változásait a depresszióban és az ezt követő antidepresszáns kezelésben egyre több tanulmány vizsgálta, más agyterületeken, pl. a frontális kéregben, történő változásokról csak kevés információ áll rendelkezésre a szakirodalomban, miközben a frontális kéreg sűrű monoaminerg beidegzésekkel rendelkezik és szerepét szintén igazolták depresszióban. Ráadásul a szinaptikus teória az antidepresszánsok más kórképekben, így pl.

stroke-ban való használatának lehetőségét is felvetik, ahol a kortikális területek szintén szerepet játszhatnak. A fluoxetin, egy szelektív szerotonin visszavétel gátló (SSRI) klinikai vizsgálatban is hatékonynak mutatkozott a stroke-ot követő motoros regenerációban, míg egy kisebb vizsgálatban a VLX egészséges emberekben javította a motoros funkciókat. Nem világos azonban, hogy milyen molekuláris szintű változások állnak a kiterjesztett hatásmechanizmusú, a 5-HT és a NA visszavételét is gátló VLX terápiás hatásai mögött, mivel ezeket a változásokat terápiásan releváns, krónikus adagolást követően nem vizsgálták a frontális kéreg területén.

A két vegyület, az MDMA és a VLX, a fentiek alapján mind akutan, a monoaminerg szintek befolyásolásán keresztül, mind krónikusan befolyásolhatja egymás hatását. A funkcionális változások, így a motoros- és kognitív funkciók károsodása, a megnövekedett depressziós hajlam az MDMA felhasználókban, míg a motoros- és kognitív javulás és az antidepresszáns hatások krónikus VLX adagolást követően, felvetik a kölcsönhatások lehetőségét. Ráadásul egy korábbi kísérlet során a

megelőző MDMA adagolás csökkentette az SSRI fluoxetin hatásait. Ugyanakkor akut MDMA adagolást követő krónikus VLX kezelés hatásait tudomásunk szerint nem vizsgálták korábban.

CÉLKITŰZÉS

1. Egyszeri MDMA adagolást követően 3 héttel meg kívántuk határozni azokat a molekuláris mechanizmusokat, melyek szerepet játszhatnak a funkcionális károsodások kialakulásában vagy az esetleges regenerációban a frontális kéreg területén.
2. Krónikus, 3 hetes VLX kezelést követően fel kívántuk deríteni, mely jelátviteli útvonalak állhatnak az antidepresszáns terápia hatásainak hátterében a frontális kéreg területén.
3. Meg kívántuk vizsgálni továbbá, hogy egyszeri MDMA kezelést követő krónikus, 3 hetes VLX adagolás képes-e befolyásolni az MDMA által kiváltott hatásokat, illetve képes-e a korábbi MDMA hatást gyakorolni a VLX-indukálta változásokra a frontális kéreg területén.

MÓDSZEREK

Kísérleteinkben 42, kb. nyolc hetes Dark Agouti patkányt használtunk. E patkányok rendelkeznek egy olyan enzimpolimorfizmussal, amely miatt esetükben az MDMA metabolizmusa lassabb, így jól reprezentálják azt a humán populációt, amelyik különösen érzékeny az MDMA neurotoxikus hatásai iránt. Az állatok két csoportra osztva kaptak sóoldat (SAL) injekciót vagy MDMA-t (15 mg/kg) intraperitoneálisan. Ezt követően a két csoportot tovább osztottuk és a két alcsoport közül az egyiket VLX (40 mg/kg, minipumpán keresztül) kezelésnek vetettük alá, míg a kontroll csoport álműtött és sóoldatot tartalmazó minipumpát (SHAM) kapott állatokból állt. Így négy kezelési csoport alakult ki: kontroll állatok (SAL/SHAM), csak MDMA-t kapott állatok (MDMA/SHAM), csak VLX-t kapott állatok (SAL/VLX) és kombinált kezelést kapott állatok (MDMA/VLX).

Három hét elteltével az állatokat dekapitáltuk, a frontális kérgi régiót eltávolítottuk, és TRIZOL módszerrel kinyertük e területek RNS tartalmát. Az RNS-t tartalmazó mintákat minőségi ellenőrzésnek vetettük

alá, és kezelési csoportonként a nyolc legjobb minőségi paraméterrel rendelkező mintát kettesével pooloztuk.

Ezt követően a kezelési csoportonként négy darab pool teljes genomot tartalmazó expressziós microarray vizsgálatra (Illumina RatRef-12 v1 chip) került, amely összesen 22 523 különböző transzkriptet vizsgált.

A nyers adatokat az R statisztikai programhoz elérhető csomagokkal háttérkorrigáltuk és normalizáltuk. Ezt követően a PUMA programcsomaggal meghatároztuk a szignifikánsan változott géneket, ami során a szignifikancia értéket a többszörös tesztelésnek megfelelően csökkentettük. Útvonal szintű feldúsulási analízist (GSEA) végeztünk, melynek segítségével a szignifikánsan megváltozott biológiai útvonalakat azonosítottuk, míg az interakciós hatás felderítésére ANOVA elemzést végeztünk.

EREDMÉNYEK

Az MDMA kezelt csoportban a feldúsult útvonalakat biológiai folyamatokhoz kötve, azt találtuk, hogy egyszeri MDMA kezelés 3 héttel korábban szignifikánsan csökkentette a proteinszintézis és

lokalizáció, transzmembrán- és nukleocitoplazmatikus transzport, a kromatinfenntartás és a mitokondriális oxidoreduktáz aktivitáshoz köthető génszetteket, miközben emelte a dendrit- és szinapszisfejlődéshez köthető génszettek expresszióját a frontális kéreg területén. A gének szintjén talált változások támogatták a fenti eredményeket: downregulálódott többek között néhány riboszomális fehérje génje és upregulálódott a NMDA2B típusú glutamáttranszporter, valamint a kalcium/kalmodulin dependens kinázok expressziója.

A VLX esetén négy fő útvonalhoz voltak köthetőek a szignifikánsan feldúsult génszettek. A neurotranszmitter felszabaduláshoz köthető génszettek, a szinaptikus plaszticitáshoz és -organizációhoz és az inzulinerg jelátvitelben szerepet játszó génszettek upregulálódtak, míg a mitokondriális antioxidáns aktivitással kapcsolatos génszettek downregulálódtak. A gének szintjén upregulálódtak az inzulinerg- (Dpp4) és glutamáterg- (Grin2b, Gria) jelátvitelhez kapcsolódó gének valamint a kalcium/kalmodulin dependens kinázok expressziója, miközben a mitokondriális aktivitáshoz köthető gének downregulálódtak. Ugyanakkor a galaninerg rendszer génjei nem mutattak változást.

A kettős kezelt csoportot a csak VLX-nal kezelt csoporthoz viszonyítva csökkent az expressziója a bioszintetikus folyamatokhoz és a mitokondriális antioxidáns aktivitáshoz köthető génszetteknek, és upregulálódtak a Stat3 jelátvitelhez tartozó génszettek. A kombinációs kezelést a csak MDMA kezelést kapott csoporthoz viszonyítva csökkent expressziót találtunk a riboszomális kis- és nagy alegységekhez, valamint a translációhoz köthető génszettekben, ugyanakkor néhány antidepresszáns hatású gén (Rgs9, Ca2) az egyedi gének szintjén upregulálódott.

A kombinációs kezelést a kontrollcsoporthoz viszonyítva emelkedett expressziót mutattak a neurotranszmitter felszabaduláshoz, szinaptikus plaszticitáshoz, az inzulin- és glutamát- jelátvitelhez kapcsolható szettek és downregulálódtak a mitokondriális funkciókhoz illetve a translációhoz és egyéb bioszintetikus folyamatokhoz köthető génszettek, melyek additív hatásokra utaltak a kettőskezelt csoportban.

Az ANOVA elemzés csak a TATA-box kötő fehérje génjénél mutatott interakciós hatást, megerősítve, hogy a két vegyület hatásai additívak.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az MDMA a bioszintetikus folyamatok és a mitokondriális antioxidáns aktivitás csökkent expresszióján keresztül lehet felelős a kialakuló funkcionális károsodásokért, míg 3 héttel az adagolást követően a dendritfák fejlődése a háttérben zajló regenerációra utal a frontális kéreg területén.
2. A 3 hetes krónikus VLX kezelést követően a neurotranszmitter felszabadulással kapcsolatos génszettek a terápiás hatások mögött adaptív mechanizmusokat feltételeznek, míg a szinapszisokhoz köthető génszettek upregulációja a szinaptikus teóriát támasztja alá, melyek háttérében az inzulinerg jelátviteli útvonalat, mint eddig ismeretlen hatásmechanizmust azonosítottunk. A VLX gátolta a mitokondriális antioxidáns aktivitást és nem befolyásolta a galanin rendszer génjeinek expresszióját.
3. A kombinációs kezelés túlnyomórészt additív hatásokra enged következtetni a TATA-box kötő fehérje kivételével, mely szerepet játszhat a

mitokondriális és transzlációs folyamatok szabályzásában. A 3 héttel korábbi MDMA adagolás nem tudta befolyásolni a krónikus VLX kezelés molekuláris hatásait és a VLX sem volt képes kompenzálni az MDMA által kiváltott változásokat. Ugyanakkor az antidepresszáns feltehetően a terápiás hatásaiban is szerepet játszó, széleskörű upregulációt képes volt kiváltani, így felmerül használatának lehetősége kortikális kórképek esetén korábbi MDMA függőkben is.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények jegyzéke:

1. Petschner P, Vas S, Ádori Cs, Andó DR, Balogh B, Gyöngyösi N, Kirilly E, Kátai Z, Kovács G, Bagdy Gy (2010) **Az ecstasy által kiváltott neuronkárosodás és regeneráció funkcionális következményei.** *Addictologia Hungarica*, **9**(2):103-124.
2. Pázmány P, Petschner P, Ádori Cs, Kirilly E, Andó DR, Balogh B, Gyöngyösi N, Bagdy Gy

- (2013) **Az ecstasy hatása a kognitív funkciókra.** *Neuropsychopharmacol Hung*, **15**(4):214-222.
3. Petschner P, Tamási V, Ádori C, Kirilly E, Andó RD, Tóthfalusi L, Bagdy Gy (2013) **Gene expression analysis indicates CB1 receptor upregulation in the hippocampus and neurotoxic effects in the frontal cortex 3 weeks after single-dose MDMA administration in Dark Agouti rats.** *BMC Genomics*, **14**(1).
 4. Tamási V, Petschner P, Ádori C, Kirilly E, Andó RD, Tóthfalusi L, Juhász G, Bagdy Gy (2014) **Transcriptional Evidence for the Role of Chronic Venlafaxine Treatment in Neurotrophic Signaling and Neuroplasticity Including also Glutamatergic- and Insulin-Mediated Neuronal Processes.** *PloS One*, **9**(11).
 5. Petschner P, Bagdy Gy, Tóthfalusi L (2015) **A kis „n”, nagy „P” probléma a neuropszichofarmakológiában, avagy hogyan kontrolláljuk a hamis felfedezések arányát.** *Neuropsychopharmacol Hung*, **17**(1):23-30.
 6. Petschner P, Juhász G, Tamási V, Ádori C, Tóthfalusi L, Hökfelt T, Bagdy Gy (2016)

Chronic venlafaxine treatment fails to alter the levels of galanin system transcripts in normal rats. *Neuropeptides, in press.*
<http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2016.01.010>

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények jegyzéke:

1. Horváth B, Vas S, Kátai Z, Kostyalik D, Molnár E, Petschner P, Gyertyán I, Bagdy Gy (2011) **Effect of acute escitalopram treatment on the quantitative EEG of rat in active wake and REM sleep.** *Neuropsychopharmacol Hung*, **13**(Suppl. 2):26-27.
2. Vas S, Kátai Z, Kostyalik D, Pap D, Molnár E, Petschner P, Kalmár L, Bagdy Gy (2013) **Differential adaptation of REM sleep latency, intermediate stage and theta power effects of escitalopram after chronic treatment.** *J Neural Transm (Vienna)*, **120**(1):169-176.
3. Vas S, Juhász G, Kostyalik D, Laufer R, Magyar K, Petschner P, Szökő É, Tábi T, Tekes K, Tóthfalusi L, Török T, Bagdy Gy (2014) **A**

Semmelweis Egyetem Gyógyszerhatástani Intézetében folyó központi idegrendszeri kutatások. *Gyógyszerészet*, 68:(Suppl. 1) p. S50.

4. Kovács D, Gonda X, Petschner P, Édes A, Eszlári N, Bagdy Gy, Juhasz G (2014) **Antidepressant treatment response is modulated by genetic and environmental factors and their interactions.** *Ann Gen Psychiatry*, **13**.
5. Kostyalik D, Kátai Z, Vas S, Pap D, Petschner P, Molnár E, Gyertyán I, Kalmár L, Tóthfalusi L, Bagdy Gy (2014) **Chronic escitalopram treatment caused dissociative adaptation in serotonin (5-HT) 2C receptor antagonist-induced effects in REM sleep, wake and theta wave activity.** *Exp Brain Res*, **232**(3):935-946.
6. Juhász G, Gonda X, Hullám G, Eszlári N, Kovács D, Lazáry J, Pap D, Petschner P, Elliott R, Deakin JF, Anderson IM, Antal P, Lesch KP, Bagdy Gy (2015) **Variability in the Effect of 5-HTTLPR on Depression in a Large European Population: The Role of Age, Symptom Profile, Type and Intensity of Life Stressors.** *PloS One*, **10**(3).

