

Kliničko-bolnički centar, Kragujevac
Interna klinika

Originalni naučni rad
Original study
UDK 612.82.084:615.21-099
DOI: 10.2298/MPNS0806222S

AKUTNI EFEKAT 3,4-METILEN-DIOKSIMETAMFETAMINA NA OKSIDATIVNI STRES U MOZGU PACOVA

THE ACUTE EFFECTS OF 3,4-METHYLENEDIOXYMETHAMPHETAMINE ON OXIDATIVE STRESS IN RAT BRAIN

Ivan SIMIĆ i Živorad MALIČEVIĆ

Sažetak - Smatra se da oksidativni stres i slobodni radikali imaju značajnu ulogu kod brojnih akutnih i hroničnih neurotoksičnih procesa. Cilj ovog rada bio je da se procene akutni efekti popularne psihoaktivne droge 3,4-metilendioksimetamfetamina (ekstazi) na parametre oksidativnog stresa (indeks lipidne peroksidacije, superoksidni radikal, superoksid-dismutaza i glutation) u frontalnom korteksu, strijatumu i hipokampusu mozga pacova soja *Wistar*. Akutna peroralna administracija pojedinačne doze od 5, 10, 20 i 40 mg/kg ekstazija rezultirala je povećanjem indeksa lipidne peroksidacije, superoksidnog radikala i superoksid-dismutaze a smanjenjem koncentracije glutationa. Rezultati dobijeni u ovom radu sugerišu mogućnost da oksidativni stres ima glavnu ulogu u neurotoksičnosti uzrokovanoj ekstazijem, dok bi varijacije u pogledu dozne zavisnosti ovih biohemijskih promena mogle da ukazuju na različite mehanizme dejstva ove droge u pojedinim moždanim strukturama.

Ključne reči: 3,4-Metilendioksimetamfetamin; Slobodni radikali; Oksidativni stres; Neurotoksični znaci; *Wistar* pacovi

Uvod

Od svih organa, centralni nervni sistem je najpogodniji za stvaranje a i najosetljiviji na dejstvo slobodnih radikala [1]. Ovoj konstataciji, i pored još uvek nedovoljno proučenih filogenetskih varijacija [2], idu u prilog sledeće činjenice: neuronska membrana je posebno bogata holesterolom, polinezasićenim masnim kiselinama, fosfolipidima a sa druge strane, mozak je siromašan antioksidansima glutation-peroksidazom i superoksid-dismutazom (SOD). Iz oštećenih neurona se lako i nekontrolisano oslobađaju kateholamini (posebno dopamin) koji podležu procesima autooksidacije i daljem stvaranju slobodnih radikala.

Danas postoji obilje dokaza, kako eksperimentalnih tako i kliničkih, da 3,4-metilendioksimetamfetamin (MDMA, ekstazi) i ostali amfetaminski derivati deluju pretežno povećavajući neto oslobađanje monoaminskih neurotransmitera (serotonina, noradrenalina i dopamina) iz njihovih aksonskih terminala [3]. MDMA, verovatno, ne deluje na direktno oslobađanje serotonina, već vezujući se i blokirajući transportere uključene u njegovo sinaptičko preuzimanje [4]. Slično, ali slabije, je i dejstvo na preuzimanje dopamina [5]. Preovlađujuće je mišljenje da je masivno oslobađanje serotonina iz njegovih nervnih terminala, pod dejstvom MDMA, glavni uzrok ne samo psihoaktivnih dejstava ove droge već i biohemijskih oštećenja nervnih ćelija. Ovo oštećenje je pre svega uzrokovano oksidativnim stresom i dejstvom slobodnih radikala nakon ekscitativnog oslobađanja monoaminskih neurotransmitera koji sami mogu da oksidišu [6]. Brojnim eksperimentima na životinjskim modelima [7], dokazan je redukovan sadržaj serotonina u mozgu, smanjen broj serotoninergičkih neurona i serotonin-transpotujućih

molekula i brojni degenerisani serotoninergički aksonski terminali, kod životinja tretiranih sa MDMA.

Cilj ovog rada bio je da se ispita prooksidativno dejstvo ekstazija u određenim strukturama mozga pacova kroz poremećene parametre antioksidativne odbrane pri primeni različitih doza ove supstance prilikom njene akutne peroralne administracije.

Materijal i metode

Eksperimentom je obuhvaćeno 40 pacova muškog pola soja *Wistar*, starosti oko 6 nedelja, težine 200-250 g, čuvanih u kavezima u grupama od po 4, sa trodnevnom adaptacionim periodom, u dvanaestčasovnom dnevno-noćnom režimu, sa slobodnim pristupom hrani i vodi, na prosečnoj ambijentalnoj temperaturi od 22±2°C. Zaplenjene tablete ekstazija dobijene su, po odobrenju Ministra unutrašnjih poslova Republike Srbije, od MUP Srbije. Tablete su bele boje, prosečne mase 290 mg. Tablete su kvalitativno analizirane infracrvenom spektrofotometrijom, tankoslojnom i gasnom hromatografijom, upotrebom instrumenata *FTIR-8300* i *GC-17A* marke *Shimadzu*, a kvantitativno tehnikom gasne hromatografije sa FID detektorom, primenom metode inertnog standarda. Procentualni sadržaj MDMA u tabletama je 15,6%.

Životinje su podeljene u grupe od po 8 životinja na osnovu vrednosti primljenih doza MDMA u miligramima po kilogramu telesne mase (TM): 5 mg/kg TM, 10 mg/kg TM, 20 mg/kg TM, 40 mg/kg TM i kontrolnu grupu. Tablete ekstazija su usitnjene i rastvorene u destilovanoj vodi u željenim koncentracijama. Svim životinjama jednokratno je aplikovano 1 ml rastvora peroralno, putem odgovarajuće sonde. Životinje iz kontrolne grupe dobijale su po 1 ml čiste destilovane vode. Nakon žrtvovanja

Skrćenice

MDMA	- 3,4-metilendioksimetamfetamin, ekstazi
SOD	- superoksid dizmutaza
$O_2^{\cdot -}$	- superoksidni radikal
TM	- telesna masa
ILP	- indeks lipidne peroksidacije
GSH	- ukupni glutation
MAO-B	- monoaminooksidaza B

dekapitacijom osmog sata po aplikaciji ekstazija, glave su zamrznute u tečnom azotu a zatim čuvane u zamrzivaču na $-70^{\circ}C$, sve do izolacije sledećih moždanih struktura: desnog frontalnog korteksa, desnog strijatuma i desnog hipokampusa. Zatim je vršena priprema uzoraka za biohemijske analize homogenizacijom u hladnom puferizovanom saharoznom medijumu (0,25M saharoza, 10 mM K/Na pufer pH=7,0 i 1mM EDTA), homogenizerom sa teflonskim tučkom na 800 o/min [8]. Nakon centrifugiranja na 3 500 o/min tokom 15 minuta, odvojen je supernatant - uzorak (neprečišćena mitohondrijalna frakcija), koji je nakon procesa sonifikacije čuvan na $-70^{\circ}C$ do momenta daljih enzimskih analiza. Sadržaj proteina određivan je po metodi Lowry-a [9].

Biohemijske analize:

Aktivnost superoksid-dizmutaze (SOD) određivana je kao procenat inhibicije autooksidacije epinefrina (adrenalina) u baznoj sredini uzorkom neprečišćene mitohondrijalne frakcije [10].

Superoksidni radikal ($O_2^{\cdot -}$) - Redukcija nitroblu-tetrazolijuma do nitroblu-formazana koristi se kao mera stvaranja superoksidnog radikala [11].

Indeks lipidne peroksidaze (ILP) - Reakcija tiobarbiturnog reagensa i uzoraka u kojima je stimulirana lipidna peroksidacija askorbinskom kiselinom [12].

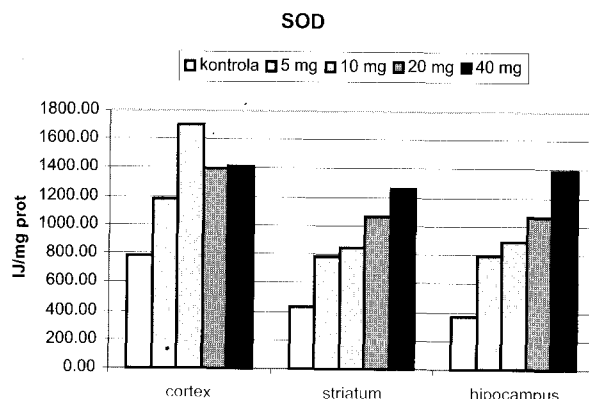
Ukupni glutation (GSH) - Preko stvaranja 5-tio-2-nitrobenzoične kiseline proporcionalne koncentraciji ukupnog glutationa [13].

Vrednosti praćenih biohemijskih parametara obrađene su metodama deskriptivne statistike i predstavljene kao srednja vrednost i standardna devijacija. Za statističku obradu podataka korišćen je Studentov t-test za male nezavisne uzorke, kao i ANOVA.

Rezultati

Superoksid-dizmutaza: vrednosti superoksid dizmutaze u frontalnom korteksu su visoko statistički značajno ($p < 0,01$) povećane u odnosu na kontrolu u svim grupama koje su tretirane ekstazijem. Identična je situacija i u strijatumu i hipokampusu (Grafikon 1).

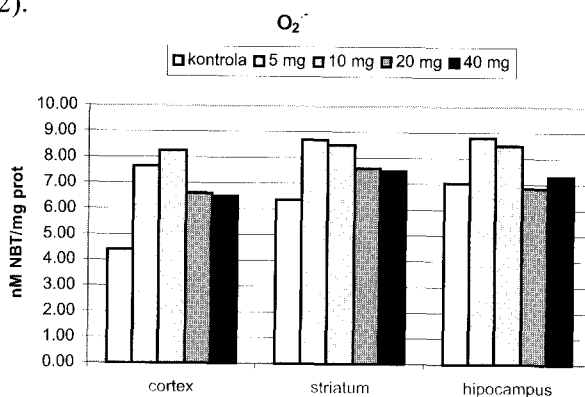
Superoksidni radikal: povećanje nivoa superoksidnog anjona ($O_2^{\cdot -}$) u frontalnom korteksu primetno je u svim eksperimentalnim grupama. Slično je i u strijatumu (osim grupe 40 mg/kg koja ne pokazuje razliku u odnosu na kontrolnu grupu), dok na nivou hipokampusa nije primećen značajan skok



Grafikon 1. Uticaj MDMA na SOD u korteksu, strijatumu i hipokampusu

Graph 1. Effect of MDMA on SOD in cortex, striatum and hippocampus

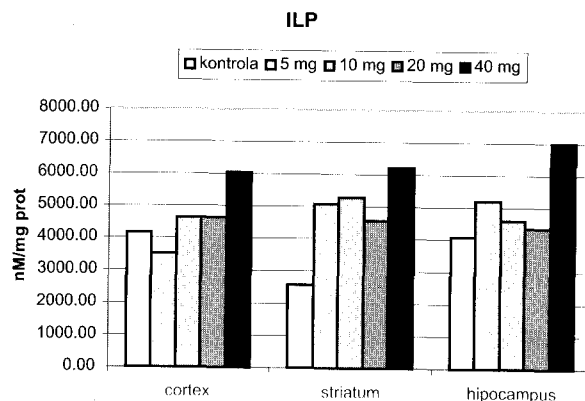
superoksidnog radikala u bilo kojoj grupi (Grafikon 2).



Grafikon 2. Uticaj MDMA na $O_2^{\cdot -}$ u korteksu, strijatumu i hipokampusu

Graph 2. Effect of MDMA on $O_2^{\cdot -}$ in cortex, striatum and hippocampus

Indeks lipidne peroksidacije: promene vrednosti indeksa lipidne peroksidacije u frontalnom korteksu pokazuju statistički značajan porast tek pri maksimalnoj dozi MDMA od 40 mg/kg. Na nivou strijatuma došlo je do povećanja ILP u svim eksperimentalnim grupama a u hipokampusu vrednosti ILP su

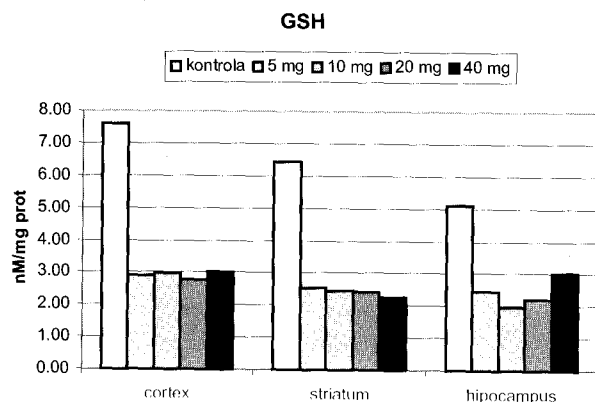


Grafikon 3. Uticaj MDMA na ILP u korteksu, strijatumu i hipokampusu

Graph 3. Effect of MDMA on ILP in cortex, striatum and hippocampus

statistički značajno povećane samo u grupama 5 mg/kg ($p < 0,05$) i 40 mg/kg ($p < 0,01$) (Grafikon 3).

Ukupni glutation: vrednosti ukupnog glutationa (GSH) u frontalnom korteksu su visoko statistički značajno smanjene u odnosu na kontrolu kod svih grupa koje su primale ekstazi. Isti rezultati su i na nivou strijatuma dok je u hipokampusu samo u grupi 40 mg/kg ova razlika na nižem nivou statističke značajnosti (Grafikon 4).



Grafikon 4. Uticaj MDMA na GSH u korteksu, strijatumu i hipokampusu

Graph 4. Effect of MDMA on GSH in cortex, striatum and hippocampus

Diskusija

MDMA uzrokuje selektivno i dugotrajno iscrpljivanje serotoninskih depoa u njegovim nervnim terminalima kod glodara [14]. Dokazi za MDMA-indukovano oštećenje serotoninergičkih neurona su zasnovani na biohemijskim i imunohemijskim nalazima kao što su smanjenje aktivnosti triptofan hidroksilaze [15] i redukcija imunoobeleženih 5-HT nervnih terminala [16]. Iako tačan patofiziološki mehanizam ovog oštećenja nije poznat, dokazi podržavaju učešće dopamin-zavisnog procesa. MDMA, kako je pokazano, oslobađa dopamin *in vitro* [17] i *in vivo* [18] iz moždanih regiona poput strijatuma. Po jednom modelu [19], ovako oslobođeni ekstracelularni dopamin biva delimično transportovan u iscrpljene serotoninske nervne terminale gde podleže procesima intenzivne deaminacije pos-

redstvom monoaminoksidaze-B (MAO-B). Kao rezultat ove deaminacije nastaju velike količine vodonik-peroksida, hidroksil-radikala, ali i hinona, jedinjenja koja su visoko redoks aktivna ulaskom u redoks ciklus sa svojim semihinonskim radikalima, vodeći formiranju novih količina slobodnih radikala. Po drugom modelu [20], MDMA sam ušavši u serotoninski aksonski terminal dovodi do oksidacije triptofan-hidroksilaze (koja katališe sintezu serotonina) i to delom samostalno a delom putem svojih, takođe vrlo reaktivnih, metabolita. Na ovaj način se znatno smanjuje sinteza novih količina serotonina, dok se već postojeći iz aksonskih terminala ekscisivno oslobađa. Puno je dokaza da je u ovaj proces uključen oksidativni stres tj. stvaranje slobodnih radikala uzrokovano ekstatizijem. Pretretman antioksidansima značajno redukuje oštećenje serotoninskih aksonskih terminala [21]. MDMA u *in vivo* studijama dovodi do stvaranja hidroksil-radikala u strijatumu i hipokampusu [22]. Ostaje nejasno u kojoj meri ekstazi produkuje slobodne radikale *per se*, a u kojoj meri su za to zaslužni potencijalno oksidativni metaboliti dopamina i serotonina [23], hipertenzija [24], hipertenzija [25] i prokonvulzivno dejstvo ekstatizija [26].

U svakom slučaju i rezultati našeg istraživanja idu u prilog tezi o neurotoksičnosti ekstatizija preko dominantnog, iako nespecifičnog, uticaja na oksidativni stres i produkciju slobodnih radikala.

Zaključak

Na oglednom modelu akutne primene ekstatizija kod pacova, u ispitivanim moždanim strukturama dolazi do narušavanja antioksidativne odbrane, stvaranja slobodnih radikala i uzrokovanja oksidoreduktivnog stresa. Indeks lipidne peroksidacije, u principu, pokazao je doznazavisani porast u navedenim moždanim strukturama. Sa druge strane porast koncentracije superoksidnog radikala, generalno, obrnuto je proporcionalan primenjenoj dozi ekstatizija. Što se parametara antioksidantne odbrane tiče, primetan je izrazit porast nivoa superoksid-dismutaze, dok glutation pokazuje tendenciju ka brzom iscrpljenju intracelularnih depoa.

Literatura

1. Jesberger JA. Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int J Neurosci* 1991;57:1-17.
2. Beleslin BB, Jovanović DZ. Resistivity of leech Retzius nerve cells to long-lasting oxidant. In: Teelkem A, Krof J, eds. *Cellular molecular and clinical aspects*. New York: Plenum Press; 1997:983-6.
3. Huether G, Zhou D, Ruther E. Causes and consequences of the loss of serotonergic presynapses elicited by the consumption of MDMA and its congeners. *J Neural Transm* 1997; 104:771-94.
4. Iravani MM, Asari D, Patel J, et al. Direct effects of MDMA on serotonin or dopamine release and uptake in the caudate putamen, nucleus accumbens, substantia nigra pars reticulata, and the dorsal raphe nucleus slices. *Synapse* 2000;36:275-85.
5. Liechti ME, Vollenweider FX. Acute psychological and physiological effects of MDMA after haloperidol pre-treatment in healthy humans. *Eur Neuropsychopharmacol* 2000;10:289-95.

6. Gudelsky G, Yamamoto B. MDMA increases the extracellular concentration of 2,3-dihydrobenzoic acid in the striatum: evidence for increased hydroxyl radical formation. Soc Neurosci Abstr 1994;20:343.
7. Ricaurte GA, Yuan J, McCann UD. MDMA-induced serotonin neurotoxicity: studies in animals. Neuropsychobiology 2000;42:5-10.
8. Gurd JW, Jones LR, Mahler HR, Moore W.J. Isolation and partial characterization of rat brain synaptic membrane. J Neurochem 1974;22:281-90.
9. Lowry OH, Passoneau JV. A flexible system of enzymatic analysis. New York: Academic Press; 1974.
10. Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autooxidation. Anal Biochem 1978;90:81-9.
11. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, ed. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton: CRC Press Inc; 1985:123-32.
12. Villacara A, Kumami K, Yamamoto T, Mršulja BB, Spatz M. Ischemic modification of cerebrocortical membranes: 5-hydroxytryptamine receptors, fluidity and inducible in vitro lipid peroxidation. J Neurochem 1989;53(2):595-601.
13. Anderson ME. Tissue glutathione. The DTNB-GSSG reductase recycling assay for glutathione (GSH + " GSSG). In: Greenwald RA, ed. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton: CRC Press; 1986:317-23.
14. Ricaurte G, Bryan G, Strauss G, et al. Halucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals. Science 1985;229:986-8.
15. Schmidt CJ, Taylor VL. Depression of rat brain tryptophan hydroxylase activity following the acute administration of MDMA. J Pharmacol Exp Ther 1987;240:1-7.
16. O'Hearn E, Bataglia G, De Souza EB, et al. MDA and MDMA cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity. J Neurosci 1988;8:2778-803.
17. Johnson MP, Hoffman AJ, Nichols DE. Effects of enantiomers of MDA, MDMA and related analogues of serotonin and dopamine release from superfused rat brain slices. Eur J Pharmacol 1986;132:269-76.
18. Yamamoto BK, Spanos LJ. The acute effects of MDMA on dopamine release in awake-behaving rat. Eur J Pharmacol 1988;148:195-203.
19. Sprague JE, Everman SL, Nichols DE. An integrated hypothesis for the serotonergic loss induced by MDMA. Neurotoxicology 1998;19:427-41.
20. Colado MI, Green AR. The spin trap reagent-phenyl-N-terbutyl nitron prevents ecstasy-induced neurodegeneration of 5-HT neurons. Eur J Pharmacol 1995;280:343-6.
21. Gudelsky GA. Effect of ascorbate and cysteine on the MDMA-induced depletion of brain serotonin. J Neural Transm 1996;103:139-40.
22. Gudelsky GA, Yamamoto BK. MDMA increases the extracellular concentration of 2,3-dihydrobenzoic acid in the striatum: evidence for increased hydroxyl radical formation. Soc Neurosci Abstr 1994;20:1026.
23. Sprague J, Nichols DE. The monoamine oxidase-B inhibitor l-deprenyl protects against MDMA induced lipid peroxidation and long-term serotonergic deficits. J Pharmacol Exp Ther 1995;273:667-73.
24. Flanagan WS, Moseley LP, Buettner RG. Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. FEBS Letters 1998;431:285-6.
25. Lerman LO, Nath KA, Rodriguez-Porcel M, et al. Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. Hypertension 2001;37:541-6.
26. Murakami K, Kondo T, Kawase M, et al. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. J Neurosci 1998;18:205-13.

Summary

Introduction

Oxidative stress and oxygen free radicals are thought to play an important role in acute effects of a number of neurotoxic processes. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy), a ring substituted amphetamine derivative, has attracted a great deal of media attention in recent years due to its widespread abuse as recreational drug by the young generation. The aim of the present study was to evaluate the acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on oxidative stress parameters (index of lipid peroxidation - ILP, superoxide radicals O_2^- , superoxide dismutase - SOD and glutathione - GSH) in frontal cortex, striatum and hippocampus in Wistar rats.

Materials and methods

The study included 40 male Wistar rats (200-250 g), housed 4 per cage having free access to food and water. MDMA was

dissolved in distilled water and administered orally at 5, 10, 20 or 40 mg/kg. 8 hours following MDMA, the rats were killed by decapitation, their brains were rapidly removed and the brain structures were dissected out on ice and analyzed biochemically.

Results

Acute peroral administration of a single dose (5, 10, 20 and 40 mg/kg) resulted in increase of ILP, O_2^- , SOD and decrease of GSH.

Conclusion

The results obtained in the present study suggest that oxidative stress plays a crucial role in MDMA-induced neurotoxicity and that the mechanism of MDMA neurotoxicity may vary between brain regions.

Key words: 3,4-Methylenedioxymethamphetamine; Free Radicals; Oxidative Stress; Neurotoxicity Syndromes; Rats, Wistar

Rad je primljen 23. III 2006.

Prihvaćen za štampu 4. IV 2006.

BIBLID.0025-8105:(2008):LXI:5-6:222-225.