

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar

**A „designer drog” metiléndioxi-pirovaleron (MDPV) hatása a fejlődő idegrendszerre a terhesség harmadik trimeszterével analóg egérmodellen**

**Készítette:** Lepesi Nikolett

Biológus MSc II. évf.



**Témavezető:** Dr. Ádám Ágota, tudományos munkatárs

SE Anatómiai, Szövet-és Fejlődéstani Intézet

**Belső konzulens:** Dr. Kabai Péter, egyetemi docens

Budapest

2014

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	2
Rövidítések jegyzéke .....	3
1. Bevezetés .....	4
1.1. A "designer drogok" fogalma és jelentősége .....	4
1.2. Szintetikus cathinonok .....	4
1.3. Az agyi jutalmazási rendszer és az addikció .....	6
1.4. A designer drogok (kiemelten az MDPV) viselkedési hatásai - humán vizsgálatok és állatkísérletes modellek.....	7
1.5. A pszichoaktív szerek hatása a fejlődő idegrendszerre .....	8
1.6. Az apoptózis szerepe az idegrendszer fejlődésében .....	9
2. Célkitűzések .....	10
3. Anyag és módszer.....	12
3.1. Kísérleti állatok és drogkezelés.....	12
3.2. Anti Casp 3 immunhisztokémia .....	12
3.3. A jelölt sejtek vizualizálása és az eredmények kvantifikálása .....	13
4. Eredmények.....	15
4.1. Neonatalis (7 napos) egerek .....	15
4.2. Felnőtt egerek.....	20
5. Következtetések.....	20
6. Megbeszélés .....	21
Összefoglaló .....	24
Summary.....	25
Irodalomjegyzék.....	26
Köszönetnyilvánítás .....	32

## Rövidítések jegyzéke

Ac – nucleus accumbens

aca - anterior commissure

AcS- nucl accumbens shell

Casp 3- kaszpáz 3

CPu - caudate putamen

EMCDDA -European Monitoring Centre for drugs and drug addiction

MDMA- metiléndioxi-metamfetamin

MDPV-3,4-metiléndioxi-pirovaleron

PB - foszfát-puffer

Sept - septum

VL - ventriculus lateralis

## 1. Bevezetés

### 1.1. A "designer drogok" fogalma és jelentősége

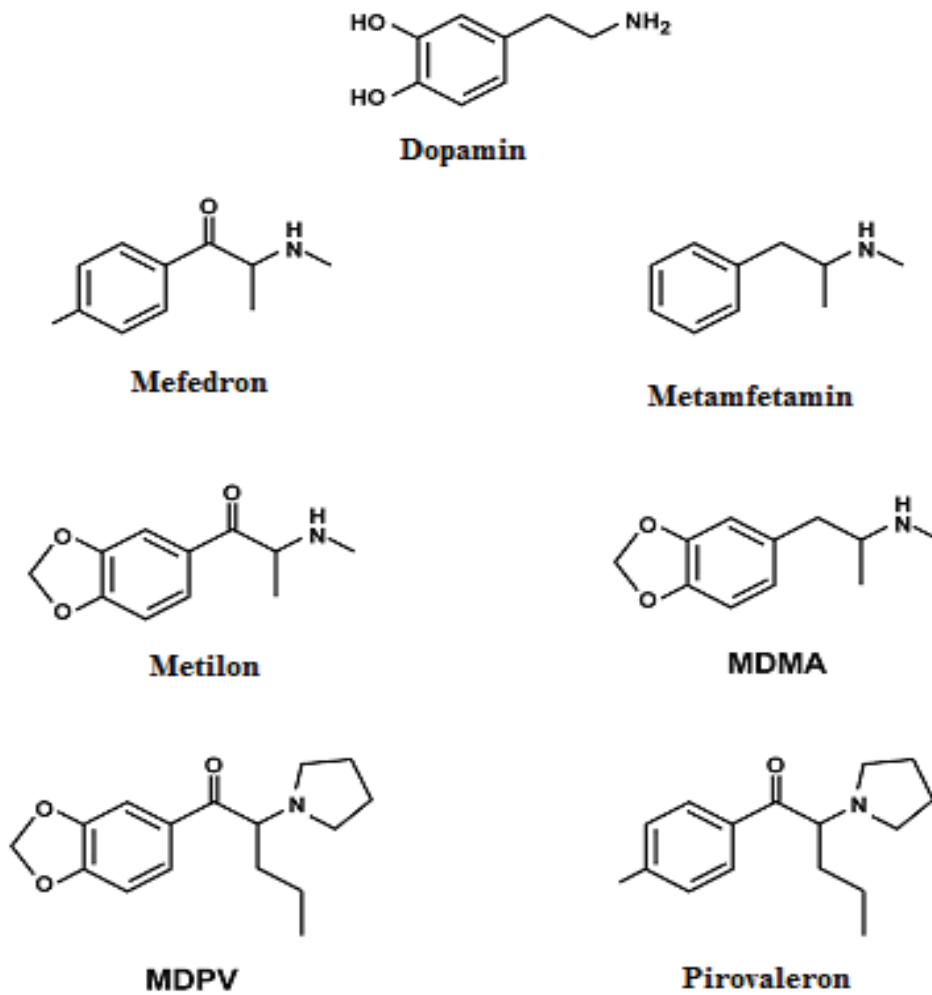
A "designer drogok" vagy "party drogok" alatt a szintetikus pszichoaktív szereknek egy olyan csoportját értjük, melyek szerkezetileg és farmakológiailag nagyon hasonlítanak valamely kábítószerként nyilvántartott vegyülethez. Ezen szerek használata, az internet adta lehetőségeknek köszönhetően, rohamosan terjed, ám elterjedtségük ellenére viselkedési hatásokról, agyi és molekuláris támadáspontjukról ez idáig csak kevés kísérletes adat áll rendelkezésünkre. A kábítószerrel való visszaélés és függőség egy összetett betegség, széles körben úgy tekintenek rá, mint egy neurológiai zavarra, aminek a faktorai lehetnek genetikai vagy környezeti tényezők (Xie, 2014).

A designer drogok népszerűségüket a gyorsan kifejtett hatásuknak és könnyű hozzáférhetőségüknek köszönhetik. Pont eme tényezők azok, melyek a fiatalabb korosztály körében is népszerűvé teszik a designer drogokat. Sok fiatal annak ellenére használja, hogy tudná milyen hatást fejt ki pontosan az adott szer. A társadalomban való ilyen fokú elterjedtségének okán egyre sürgetőbbek azok a vizsgálatok, melyek ezen szerek rövid és hosszú távú hatásait kutatják.

### 1. 2. Szintetikus cathinonok

A designer drogok legelterjedtebb csoportja az ún. "szintetikus katinonok" (1. ábra). Ezen szerek a kelet-afrikai khat cserjében (*Catha edulis*) természetes módon előforduló, az amfetaminhoz hasonló pszichoaktív hatású anyag kémiaiailag módosított vegyületei (Gunderson, 2011). Az utóbbi évek legelterjedtebb szintetikus katinonja a metilén-dioxipirovaleron (MDPV) volt, melyet a "fürdőszó" fedőnéven forgalmazott anyagok legnagyobb részében megtalálható (Spiller, 2011). Ez a szer széles körben használt az Európai Unióban (EMCDDA, 2011 és 2012), és Magyarországon is leírtak a szer által okozott súlyos mellékhatásokat, drog indukálta pszichózist (Fullajtár és Ferencz, 2012). Egy budapesti felmérés szerint, amit a Józan Babák Klub „Alternatív Terhesgondozás és Családgondozás” programjában végeztek (2011-ben), a válaszadók szinte mindegyike használt már valaha marihuánát, 59-en amfetamint, 35-en heroint, 19-en mefedront, míg 17-en MDPV-t. (forrás: Drogfókuszpont). Bár a hatásmechanizmus nem tisztázott, vannak arra utaló állatkísérletek,

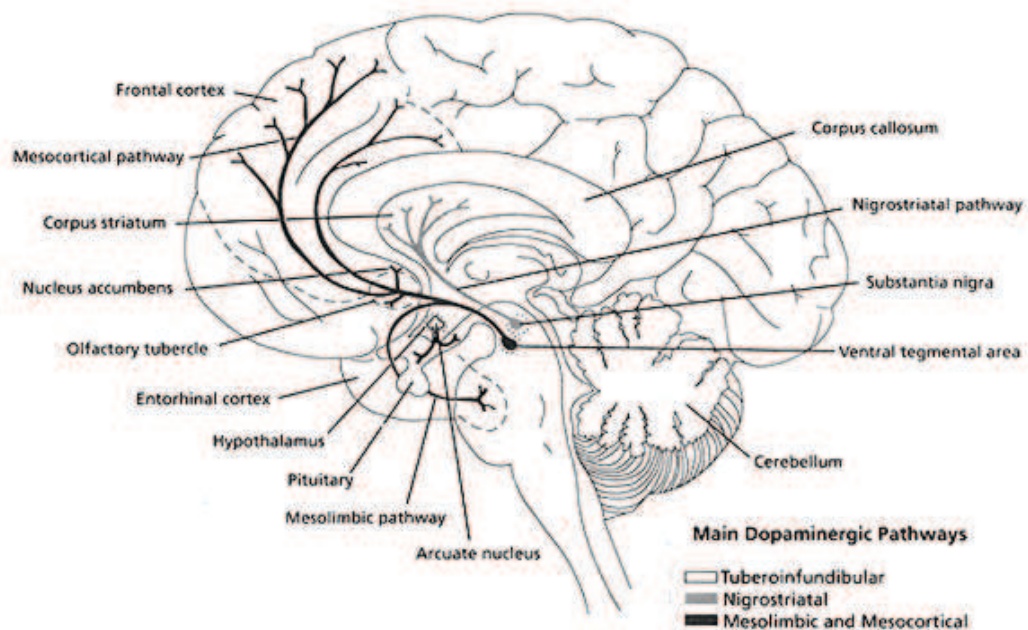
hogy egerekben és a patkányokban növeli a dopamin szintet (Fuma, 2009; Nagai, 2007). Az MDPV emberben kifejtett hatásai az amfetamin-szerű pszichostimuláns anyagokéhoz hasonlít. Annak ellenére, hogy milyen széles körben használt, molekuláris mechanizmusairól keveset tudunk.



1. **ábra.** Gyakran használt szintetikus cathinonok kémiai struktúrája és dopaminnal való szerkezeti hasonlósága (MDMA- metiléndioxi-metamfetamin; MDPV-3,4-metiléndioxi-pirovaleron).

### 1. 3. Az agyi jutalmazási rendszer és az addikció

Az agyi jutalmazási rendszer alapja elsősorban a mezolimbikus dopaminerg pálya, amely a középagyi area ventralis tegmentalistól a nucleus accumbensig halad (2. ábra; áttekintő cikk: Ikemoto, 2007). Néhány addiktív drog, mint az amfetamin és a kokain direkt hatást fejt ki a mesoaccumbalis pályára, a dopaminerg neuronok nucleus accumbens-beli végződésein, míg más drogok, mint pl. az opiátok, indirekt hatnak a mesolimbikus rendszerre (Gardner, 1997). A függőséget okozó drogok működésük során dopamin felszabadulást váltanak striatum területén lévő nucl. accumbens shell és core területén (Joshua, 2000). Kimutatták, hogy a pyrovaleron a neurotranszmitterek (pl: dopamin) kibocsájtását serkenti, de azok visszavételét gátolja (Meyer, 2010). Ezt támasztja alá, hogy például a mefedron vagy metilon beadását követően megemelkedik a nucleus accumbens extracelluláris terében a dopamin szint (Baumann, 2012).



**2. ábra.** Forrás: Dopamine- mechanisms of action, Ann D. Crocker (1994), az agyi jutalmazási rendszer fő pályái.

#### 1. 4. A designer drogok (kiemelten az MDPV) viselkedési hatásai - humán vizsgálatok és állatkísérletes modellek

A designer drogok, kifejezetten arra lettek tervezve, hogy az illegális drogokhoz hasonló hatást fejtsenek ki, de szerkezetük eltérő legyen. A szerkezetbeli kisebb különbségek lehetőséget adnak a törvények által kiszabott korlátok kikerülésére. Viselkedésbeli hatásaik között szerepelhetnek depressziós, stimuláló, hallucinogén hatások.

A szakdolgozatomban az MDPV hatását vizsgáltam. Az MDPV egy sárgásfehér por, melyet belélegezhetnek, injektálhatnak vagy lenyelhetik kapszula formájában. Az MDPV a pirovaleron metilén-dioxi analógja (Meltzer, 2006; Tidjane Corera, 2001; Vaugeois, 1993), amit még a krónikus fáradtság ellen fejlesztettek ki, de túlzott használata függőséget váltott ki. Stimulásként viselkedik; az általa kiváltott akut tünetek közé tartozik a pulzus szám emelkedése, gyors szívverés, éberség, eufória. A tünetek körülbelül 3-4 órán át tartanak, amit hipertenzió (Borek, 2012) és mérsékelt éberség követ. A vegyület 80%-ban változatlan formában távozik a szervezetből, a fennmaradó hányad pedig izoenzimek segítségével metabolizálódik (Meyer, 2010). Nagy dózisu használat kiválthat egyfajta pánikrohamot jellemző a dezorganizált viselkedést, agitációt és keringés-összeomlást okozhat, alvásmegvonás is felléphet, ami pszichózisos megbetegedésekhez vezethet.

Több kísérleti vizsgálatot végeztek a designer drogokkal kapcsolatban, amikben laboratóriumi állatokkal dolgoztak. Kilenc hetes patkányokon végzett vizsgálat azt az eredményt hozta, hogy a drog által kiváltott viselkedés nem arányosan nő a bevitt mennyiséggel (Huang, 2012). Egy korábbi tanulmányban, melyben egereknek szájon át jutatták be az MDPV-t, mozgáskoordinációs zavart figyeltek meg (Fuwa, 2007). Későbbi években született tanulmány arról, hogy az MDPV növeli a patkányok (Huang, 2012) és az egerek (Gatch et al, 2013) lokomotoros aktivitását. Az MDPV egerekben nagyobb mértékben váltott ki kondicionált helypreferenciát, mint az amfetamin, utalva a drog erős addiktív természetére (Karlsson et al, 2014). Mindezek az eredmények alátámasztják a szer pszichoaktív stimuláns hatását. Bár az utóbbi években egyre több tanulmány jelent meg a designer katinonok hatásainak kísérletes vizsgálatáról, még mindig nagyon kevés adat áll rendelkezésünkre ezen drogok hatásmechanizmusáról, a fejlődő agyra gyakorolt hatásokról pedig ismereteink szerint a szakirodalomban még nincs adat, így minden vizsgálat ezen a téren kiemelt jelentőséggel bír.

## 1.5. A pszichoaktív szerek hatása a fejlődő idegrendszerre

A pszichoaktív szerek erős hatással bírnak az emberi szervezetre. Használóik között fertilis nők is szerepelnek, akik terhességük ideje alatt sem feltétlen hagynak fel a drogfogyasztással. Az egyik leggyakrabban használt drog a kannabisz, elterjedtségével ellentétben kevés adat áll rendelkezésünkre a fogyasztókról, valószínűleg a jelentettekhez képest nagyobb a használók száma. Jelenlegi adatok szerint a kannabisz használata, mind a terhesség ideje alatt, mind pedig a szoptatás során károsan hathat a gyermek növekedésére és idegrendszerének fejlődésére (Jaques, 2014).

Egy másik tanulmányban, melyben metamfetamint használó anyákat vizsgáltak, megállapították, hogy lényegesen csökken a terhesség ideje a szert használók között. A metamfetamin használat melletti dohányzás az anya részéről tovább súlyosbította a csecsemők méhen belüli növekedését. A drognak kitett csecsemők 4 %-a igényelt orvosi beavatkozást az elvonási tünetek miatt. Előzetes eredmények arra utalnak, hogy a metamfetamin használatával együtt jár a növekedés korlátozódása az időre született csecsemőknél (Thompson, 2009).

Ismertek olyan anyák, akik amfetamint használtak terhességük ideje alatt és a gyermekük megszületése után. A kevés adat ellenére, több tanulmányban is arra a következtetésre jutottak a kutatók, hogy a gyermek fejlődésében és későbbi viselkedésében szerepet játszik az anya amfetamin fogyasztása (Oei, 2012).

Mindezek a kutatások rávilágítanak a drog okozta károk súlyosságára. Szakdolgozatommal szeretném bővíteni e témakör ismereteit és ezzel hozzájárulni a gyermekek fejlődésében bekövetkező károsodások megelőzéséhez.



## 1.6. Az apoptózis szerepe az idegrendszer fejlődésében

Apoptózis vagy programozott sejthalál a szervezeten belül lezajló folyamat, mely eredményeként a sejt elpusztul. Anélkül nem lenne egyedfejlődés, a felnőtt szervezetben pedig felborulna a belső homeosztázis (Grossmann, 2002). A programozott sejthalálnak szerepe van a potenciálisan veszélyes sejtek eltávolításában és a megfelelő sejtszám fenntartásában. Az apoptózis során a következő hibák léphetnek fel: a szükségesnél alacsonyabb szintű sejtelhalás, melynek következménye például tumor képződés, vagy ezzel ellentétes, mikor nagyobb mértékű az apoptózis, ennek eredménye lehet disgenesia.

Apoptózis folyamata:

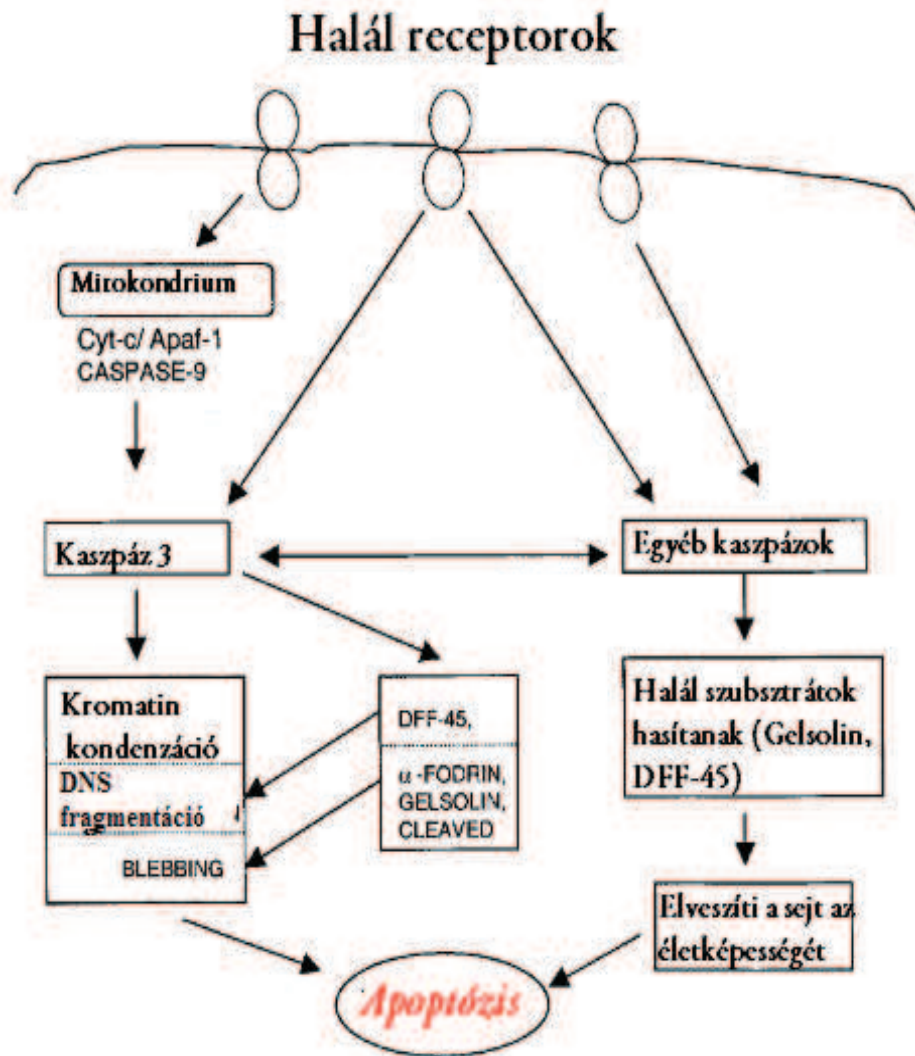
1. sejtekből származó proapoptotikus jelek vagy belső proapoptotikus jelek, DNS hibák
2. kaspázok (speciális proteázok) és ezáltal az apoptotikus gének aktiválása
3. lehetséges eredmények: strukturális és funkcionális fehérjék lebomlása, kromatin marginalizálódása, DNS fragmentáció

Az apoptózis folyamatának főszereplői a kaspázok. Proteolitikus enzimek, aktív centrumukban cisztein van, aszparagin sav mellett hasítják a célfehérjéiket. Szubsztrátjaik az aminosavakat felismerő peptid kötőzsebekbe illeszkednek (Thornberry, 1998). Alapállapotban zimogén, vagyis aktív formához képest kis aktivitással rendelkező formában vannak jelen a szervezetben (prokaspázok) (Walken, 1994). Aktiválódásuk specifikus helyeken proteolitikus hasítás révén megy végbe. A szignálútban betöltött szerepük alapján megkülönböztetünk a szignálkaskád elején lévő indító (iniciátor; pl: kaspáz 8,9) és a jelút végén résztvevő végrehajtó (effektor) kaspázokat, mint például a kaspáz 3 (Strasser, 2000, Ferri, 2001). Az iniciátor kaspázok hasítják az effektor kaspázokat és azok így válnak aktív enzimmé (3. ábra). Az effektor kaspázok már kifejezetten az apoptózisra jellemző specifikus célmolekulák hasításában vesznek részt. Pro-enzimként túlnyomórészt a citoplazmában található meg (Earnshaw, 1999).

Számos pszichoaktív szer esetében leírtak apoptotikus károsodást az agyban, így a kannabisznál (Tomiyama és Funada, 2014), az alkoholnál (Saito et al, 2010) és a metamfetaminnál is (Xu et al, 2005).

Kutatásunkban az MDPV potenciális apoptotikus hatását vizsgáltuk, melyhez a kaspáz 3 (Casp 3) jelenlétének kimutatását használtunk, mint apoptózist jelző markert.

# Kaspáz 3 szerepe az apoptózisban



3.ábra. Kaspáz 3 szerepe az apoptózisban

## 2. Célkitűzések

Kutatásunkban az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. A designer drogok csoportjába tartozó MDPV-nek van-e hatása az agyban végbemenő apoptotikus folyamatokra az emberi terhesség 3. trimeszterével analóg állatmodellen?
2. Ugyanez a hatás megfigyelhető-e a már kifejlődött, érett idegrendszeren?

Kérdéseink megválaszolásához 7 napos, ill. felnőtt egereket kezeltünk MDPV-vel, majd kaszpáz 3 jelenlétének kimutatásával detektáltuk az apoptózist szenvedő sejteket az agy bizonyos területein. A kapott eredményeket statisztikai próbával támasztottuk alá.

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1. Kísérleti állatok és drogkezelés

Kutatásunkat az Egészségügyi Engedélyezési és Közigazgatási Hivatal Kábítószerügyi Főosztályának engedélyével (27924/2011/KÁB) végezzük.

A vizsgálathoz összesen 40 db 7 napos B57BL/6J egeret használtunk fel. Az egereket az anyaállattal tartottuk, almonként külön ketrecben. Születés után a 7. napon az egy almon belüli állatokat két kezelési csoportra osztottuk. Az egerek egy része i.p. 10 mg/ttkg MDPV (LGC Standards, Teddington, Middlesex, UK; Medinspect Kft-n, keresztül (Fót)) kezelést kapott (fiziológiás sóoldatban oldva), míg a kontroll állatokat csak fiziológiás sóoldattal kezeltük. Az alkalmazott dózist irodalmi adatok alapján (Fantegrossi és mtsai, 2013), valamint saját viselkedési megfigyeléseink alapján választottuk ki (ez a dózis nyilvánvaló viselkedési választ váltott ki, de nem bizonyult még az állat számára toxikusnak). A drog beinjektálása után a kölyök egyedeket visszahelyeztük az anyjuk mellé. Az állatokat nyugalomban hagytuk 20 órán át.

A kifejlett idegrendszerre gyakorolt hatás vizsgálatához 9 db felnőtt hím egeret használtunk. A kísérlet további lépéseiben ugyanúgy jártunk el, mint a 7 napos egerek esetében.

#### 3.2. Anti Casp 3 immunhisztokémia

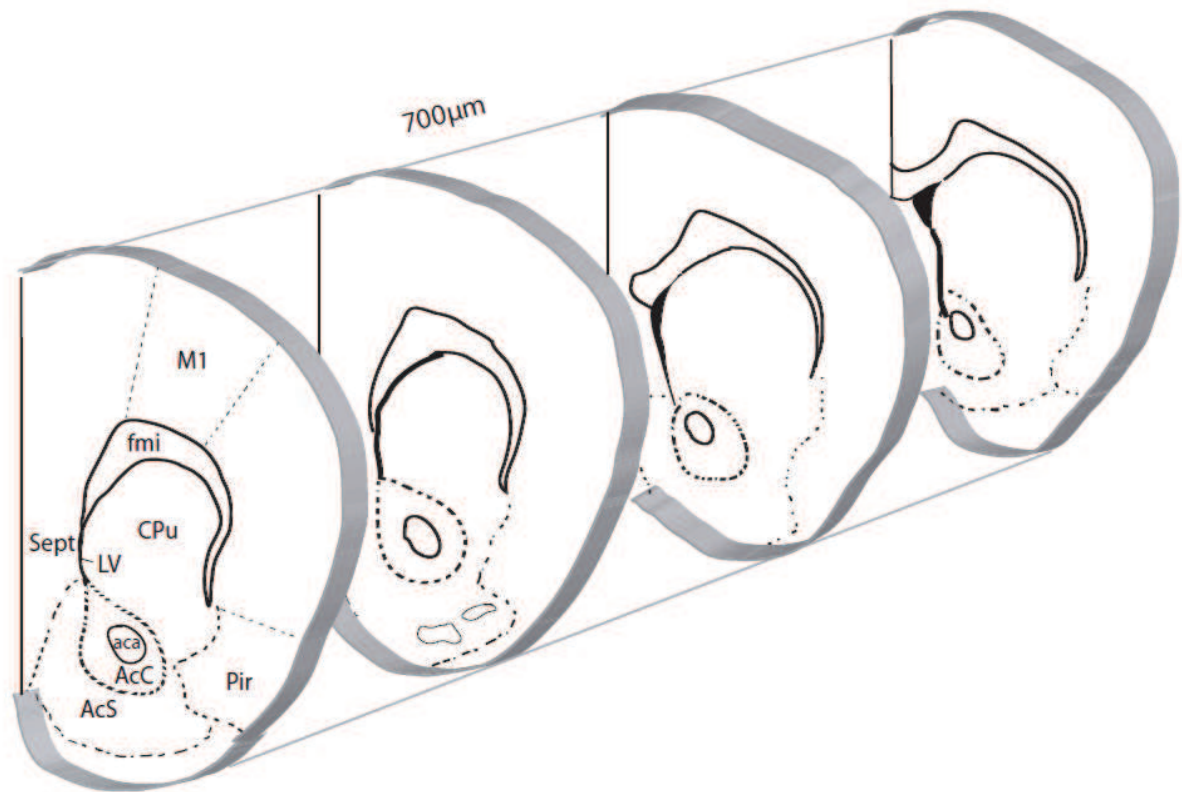
A kezelés után 20 óra elteltével az állatokat ketamin:xylazin 2:1 arányú keverékével történt mélyaltatás után transzkardiálisan perfundáltuk 4% paraformaldehidet tartalmazó 0,1M foszfát-puffer (PB) oldattal, majd az agyakat eltávolítottuk. Két napig tartó 4%-os paraformaldehiddel történő utófixálás után az agyakat 25% szacharózt tartalmazó oldatba helyeztük, hogy megelőzzük a fagyasztásból eredő szöveti károsodást, majd lesüllyedés után fagyasztó mikrotóm segítségével 70 $\mu$ m vastag coronalis irányú metszeteket készítettünk. Az immunhisztokémiai reakcióhoz szabadon úszó metszeteket használtunk, melyeket először 0,1 M PB-ben, folyamatos rázás közben átmostuk (3 x 20 percig). Az antitest penetrációjának elősegítésére pepszin oldatot használtunk (0,1 mg/ml pepszin, 1N HCL-t tartalmazó 0,1 M PB oldatban) (37°C-on, 10 percen keresztül), majd sorozatos PB-ben való átmosások után 30 percre 5 % normál kecskeszérumot tartalmazó oldatba helyeztük, hogy az aspecifikus reakciókat minimalizáljuk. Primer ellenanyagként nyúlban termeltetett anti-Casp 3

ellenanyagot használunk (*Sigma-Aldrich*, 1:1000, 1 % normál kecskeszérumot tartalmazó 0,1M PB-ben), mellyel a metszeteket 48 órán át, 4°C-on inkubáltuk. Szekunder antitestként Alexa 488-cal konjugált anti-nyúl IgG-t (*MolecularProbes*, 1:250, 0,1 M PB-ben, szobahőmérsékleten 3,5 órán át) használtunk. A reakció után a metszeteket tárgylemezre húztuk és PB:glicerin 1:1 arányú keverékével fedtük le.

Állatonként egy-egy párhuzamos metszetsorozaton Nissl-festést hajtottunk végre, és ezek segítségével azonosítottuk be a vizsgálni kívánt agyterületeket.

### 3.3. A jelölt sejtek vizualizálása és az eredmények kvantifikálása

A jelölt sejtek vizualizálása Olympus BX 50 fluoreszcens mikroszkóp segítségével történt. A vizsgálni kívánt agyterületekről sorozatmetszeteken, összesen 700µm vastagságban felvételeket készítettünk, majd ImageJ program segítségével a vizsgálni kívánt agyterületen az összes jelölt sejtet megszámoltuk, és a jelölt sejtek területegységre eső számát megadtuk. A mintavételi területünk kiterjedését és a pontos mintavételi területeket a 4. ábra mutatja.



**4. ábra.** A sematikus ábra a sejtszámolás során figyelembe vett agyterületeket mutatja be. Az adatokat egyedenként 5 db coronalis irányú metszetről gyűjtöttük, amelyek rostrocaudalisan összesen 700  $\mu\text{m}$  kiterjedésű területet reprezentáltak (az ábrán formai okok miatt csak 4 van ábrázolva). Az összes fluoreszcensen jelölt kaszpáz 3 pozitív sejtet megszámoltuk, amely a metszeteinken az adott agyterületre esett. Az egyes agyterületek határát a párhuzamos Nissl-festett metszetek agyatlasszal való összehasonlításával nyertük. Az általunk vizsgált agyterületek közül az ábrán látható a nucl. accumbens core (AcC) és shell (AcS) régiója, a caudate-putamen (CPu), a piriform kéreg (Pir), a septum (Sept), valamint az elsődleges motoros kéreg (M1), aca – commissura anterior, fmi – forceps minor corporis callosi, VL – ventriculus lateralis.

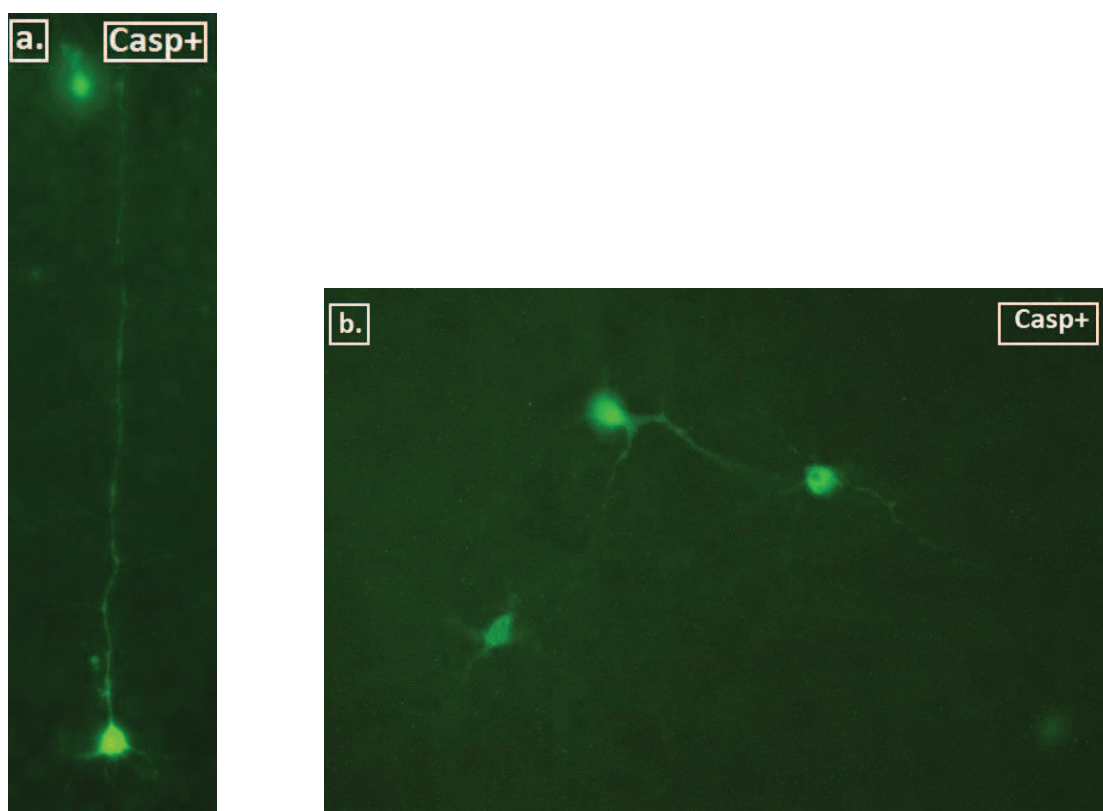
A kezelt és a kontroll csoport közti különbséget ANOVA teszt segítségével vizsgáltuk, majd Bonferroni-féle poszt hoc tesztet használtunk.

## 4. Eredmények

### 4. 1. Neonatalis (7 napos) egerek

Annak ellenére, hogy az MDPV injekció után az egerek lokomotoros aktivitása látványosan megnőtt és az anyaállat nehezen tudta őket az alom kontroll egereivel egy helyen tartani, a kezelt állatok mindegyike túlélte a kezelés utáni napot és a perfúzió napján látszólag semmiben sem különböztek a társaiktól.

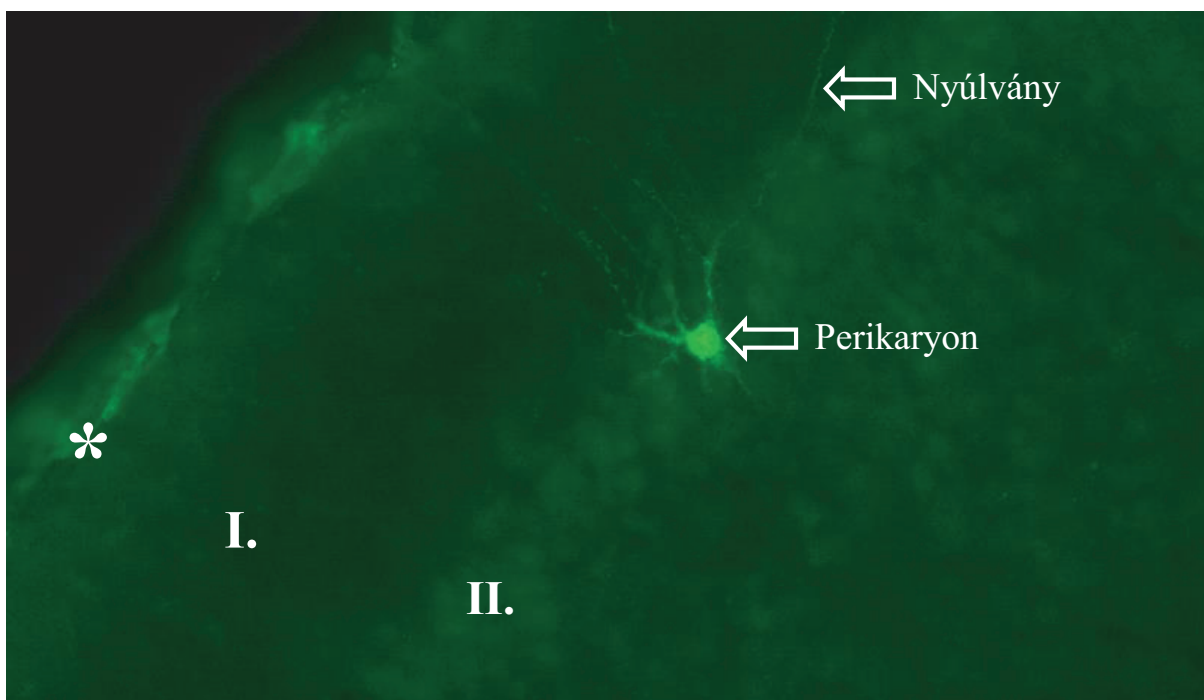
7 napos egerek esetében mind a kezelt, mind a kontroll állatokban számos pallialis és subpallialis agyterületen találtunk Casp 3-pozitív sejteket (a vizsgálatunk nem terjedt ki a telencephalonon kívüli agyterületekre). A Casp 3 jelzés kirajzolta a neuronok nyúlványait, lehetővé téve morfológiai alapon történő pontos beazonosításukat (5. és 6. ábra).



**5. ábra.** Kaszpáz 3 immunpozitív (Casp+), apoptózist szenvedő neuronok 7 napos egér agykérgében. Az 5.a ábrán egy piramisisejt, míg az 5.b ábrán több kérgi multipoláris neuron látható. A fluoreszcens jelzés kirajzolja a neuron nyúlványait; a piramisisejt apicalis dendritje a pialis felszínig követhető.

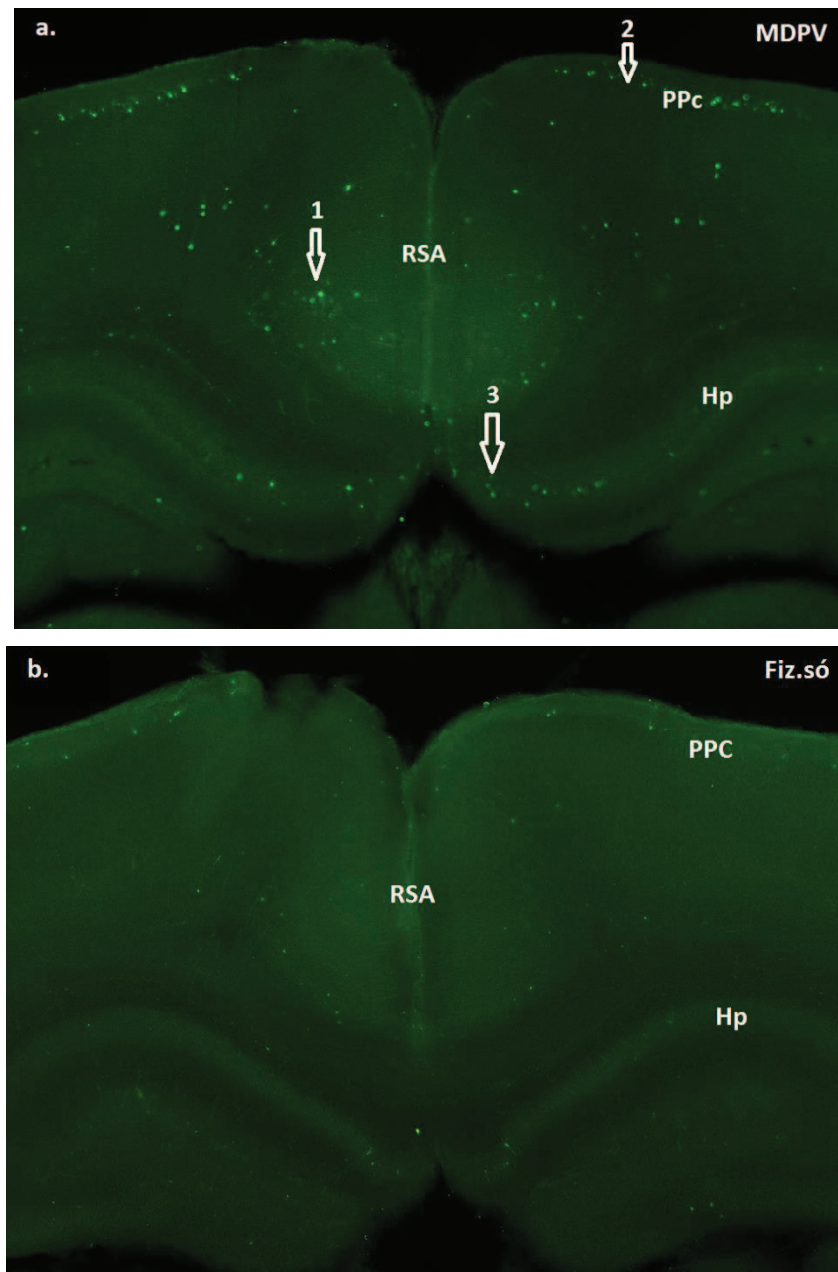
Általánosságban elmondható, hogy az észlelt Casp 3 immunreaktív sejtek érett neuronális morfológiával rendelkeztek.

Míg a kontroll egerekben a jelölt sejtek elszórtan helyezkedtek el és nem mutattak területi dúsulást, az MDPV-vel kezelt állatokban egyes agyterületeken kifejezett dúsulást tapasztaltunk. A Casp 3 immunpozitív neuronok szembetűnő dúsulását tapasztaltuk a retrosplenialis area és a hippocampus CA1 régiójában (de a gyrus dentatus területén nem) (7. ábra), és más limbikus kérgi területeken (pl. piriform kéreg), míg más kérgi területeken (pl. a motoros kéregben) ez a dúsulás nem volt tapasztalható. Érdekes módon a jelölt sejtek egy jelentős része a neocortex II. rétegében “sorakozott fel” (6. és 7.a ábra). A Casp 3-immunreaktív sejtek kiemelkedően nagy számban fordultak elő a jutalmazásos tanulásban szerepet játszó caudate-putamen, ill. az addikcióban kulcsszerepet betöltő nucleus accumbens területén (8.a. ábra), ahol a Casp 3-pozitív sejtek olyan tömegben fordultak elő, hogy mintegy körülrajzolták a mag területét, míg a környező területeken (septum) egyáltalán nem, vagy csak elhanyagolható mennyiségben jelentek meg apoptózist szenvedő sejtek (8.b. ábra).

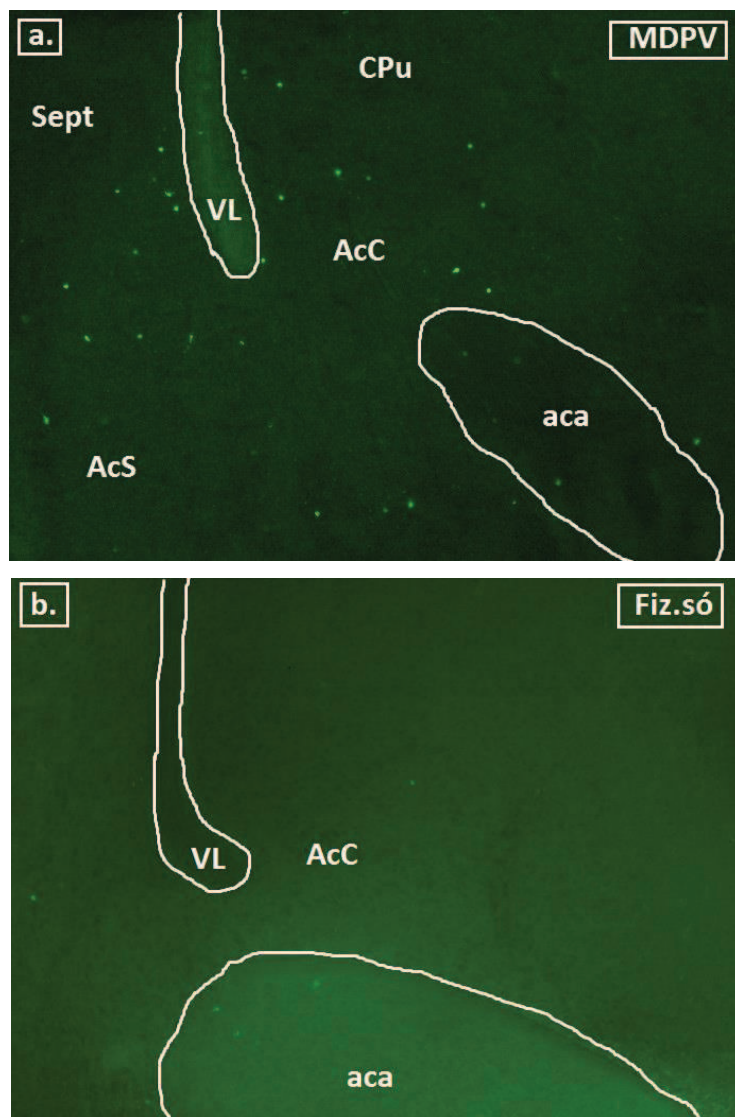


**6.ábra.** Kaszpáz 3 immunpozitív multipoláris neuron a piriform kéreg II. rétegében. Jelölések: \* : pia mater , I: str. moleculare, II: str. granulosum externum.



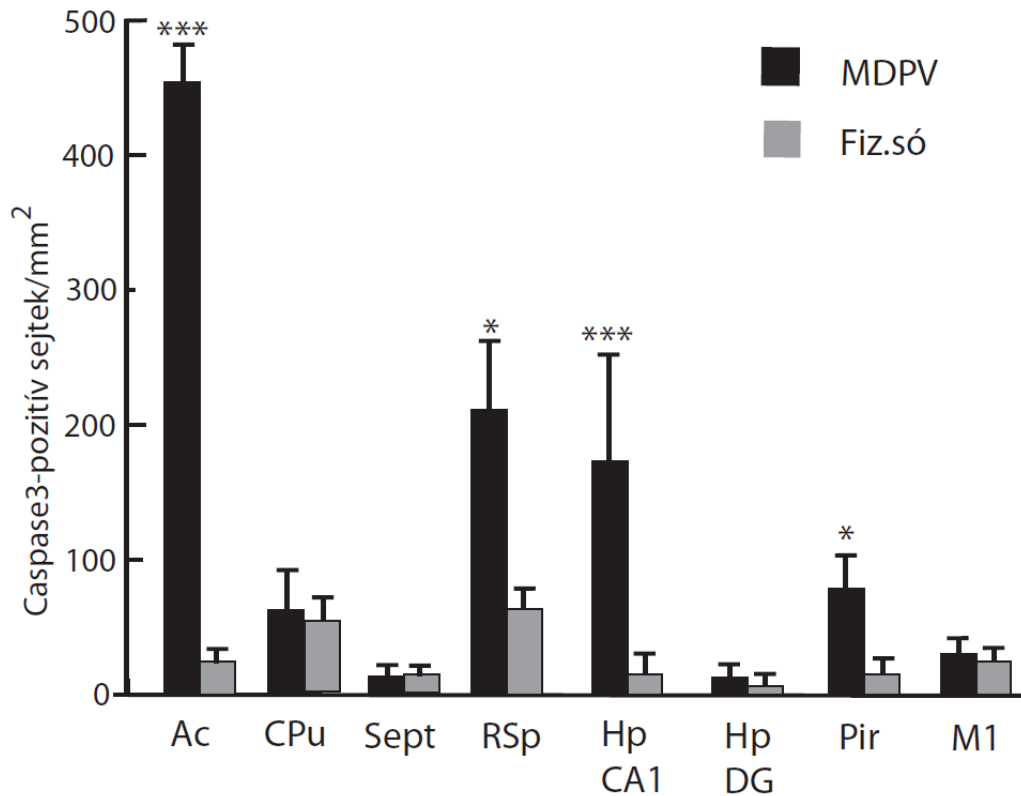


**7. ábra.** Kaszpáz 3 immunpozitív neuronok 7 napos egerekből készült agymetszeteken i.p. MDPV-vel (7.a) ill. fiziológias sóoldattal (7.b) történt kezelés után. Az apoptózist elszenvedő sejtek zöld színben fluoreszkálnak. A droggal kezelt állatban megfigyelhető a kaszpáz 3 pozitív sejtek dúsulása a posterioparietális kéreg (PPC, 2. nyíl), a retrosplenialis area (RSA, 1. nyíl) és a hippocampus (Hp, 3. nyíl) területén. A fiziológias sóoldattal kezelt egyedeknél (7.b. ábra) is tapasztalható apoptózis, de nem olyan kiemelkedő számban, mint a droggal kezelt egyedeknél. Lépték: 100  $\mu$ m.



**8. ábra.** Kaszpáz 3 immunpozitív neuronok 7 napos egerek nucl. accumbens-ében i.p. MDPV-vel (8.a) ill. fiziológias sóoldattal (8.b) történt kezelés után. Az MDPV-vel kezelt agyban (8.a ábra) a kaszpáz 3 immunreaktív sejtek száma nagy mértékben megnövekedett, a nucleus core (AcC) és a shell (AcS) régióiban egyaránt, mintegy körülrajzolva a mag területét. A kontroll egyedeknél (8.b ábra) szembetűnően kevesebb sejt szenvedett el apoptózist, az MDPV-vel kezelthez képest. Rövidítések: aca - commissura anterior, AcC - nucl. accumbens core, AcS nucl accumbens shell, CPU – caudate-putamen, Sept - septum, VL – ventriculus lateralis.

Az eredmények kvantifikálása során kapott eredményeinket a 9. ábra foglalja össze. Az Ac, a hippocampus CA1 régiója és a piriform kéreg területén szignifikánsan több apoptózist szenvedő sejt volt, mint a kontroll csoportban ( $p < 0,01$ ) (9.ábra).



**9.ábra.** Kaszpáz 3 immunpozitív sejtek területegységre eső agyi eloszlását bemutató hisztogram. Területegységekre leosztva, képfeldolgozó szoftvert használva megszámláltuk a fluoreszkáló sejteket (lásd Anyagok és Módszerek). A kezelt és kontroll csoportok közötti változók átlagértékének különbségét ANOVA teszttel vizsgáltuk, majd Bonferroni-féle poszt hoc tesztet használtunk. Az oszlopok az átlag értékeket mutatják, a felettük lévő csillagok pedig a szignifikancia-szintet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).  $N = 7$  (MDPV csoport) és  $N = 6$  (kontroll csoport). A legszembetűnőbb különbség a kontroll és a kezelt csoportoknál a nucl. accumbens (Ac) területén található. Rövidítések: Ac - nucl. accumbens, CPu - caudate-putamen, Hp – hippocampus, DG – gyrus dentatus, M1 – elsődleges motoros kéreg, Pir - piriform kéreg, RSp - retrosplenialis area, Sept – septum.

## 4. 2. Felnőtt egerek

Az MDPV-vel kezelt felnőtt állatok látványos viselkedési választ mutattak: a ketrecen belül szinte megállás nélkül futottak körbe-körbe, mindig azonos irányba, sztereotip mozgásmintázatot mutatva. Ez a hatás az injekció után kb. 20 perccel alakult ki és több órán át tartott, végül az állat kimerülten elaludt.

A nyilvánvalóan erős viselkedési válasz ellenére a felnőtt egerekben nem találtunk jelentős mennyiségű Casp 3-pozitív sejtet, ezen sejtek csak szórványosan (metszetenként 1-2) fordultak elő mind a kezelt, mind a kontroll csoport egyedei között, így ezen eredmények kvantifikálása nem volt lehetséges.

## 5. Következtetések

Eredményeink alapján a következő megállapításokra jutottunk:

1. Az MDPV-nek hatása van a fejlődő idegrendszerre. A kezelést követően számos agyterületen megnövekedett az apoptózist szenvedő sejtek száma. Ez a növekedés különösen szembetűnő volt a jutalmazási rendszerrel és az addikcióval kapcsolatos agyterületeken.
2. Érett idegrendszeren ez a hatás nem volt megfigyelhető.

## 6. Megbeszélés

Jelen szakdolgozat a designer drogok, azon belül is az MDPV, hatását vizsgálta a fejlődő idegrendszeren.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy az MDPV az általunk alkalmazott dózisban 7 napos egérre neurotoxikus hatást fejt ki, amelyre az apoptózis mértékének növekedése utalt. Ez a hatás nem volt megfigyelhető, ha felnőtt állaton alkalmaztuk ugyanazt a dózist. Az apoptózis mértékében bekövetkező változások kifejezetten a limbikus palliális és subpalliális régiókra lokalizálódtak, melyeknek szerepük van a motivációban és az addikció kialakulásában. Egy lehetséges magyarázat a limbikus régiók szelektív érintettségére a terület “túlingerlése” (overexcitation) a droghatás következtében, mely dopaminerg vagy szerotonerg mechanizmuson át valósulhat meg (Baumann et al, 2013b; Simmler et al, 2013). Ez esetben a szelektív hatás az adott agyterület aktivációjának következményeképpen jöhet létre. Egy másik hipotézis lehet az eredményeink magyarázatára, hogy az általunk megfigyelt apoptózist szenvedett neuronok egyéni túlérzékenység miatt (pl. megnövekedett sűrűségben tartalmaznak egyes receptorokat) degenerációt szenvednek. Ez utóbbi esetben az apoptotikus hatás kifejtéséhez funkcionális aktiváció nem szükséges. Izolált csiga ganglion sejteken kimutatták, hogy maga a katinon (melyet a khat cserjéből ki lehet nyerni) a kokainnal egyetemben direkt hatást gyakorol a kalcium csatornákra, míg a dopaminerg aktiváció önmagában nem fejt ki hasonló hatást (Vislobokov et al, 1993). Ez alapján az MDPV direkt neurotoxikus hatása sem zárható ki. Pszichoaktív anyagok által kiváltott kaspáz 3 aktivációval járó apoptózisban a membránhoz kapcsolt receptorok szerepét a cannabinoid receptorok esetében nemrégiben bizonyították (Tomiya és Funada, 2014). Egyszeri nagy dózisú amfetamin injekció egerek striatumában apoptózist váltott ki, szelektív neuron károsodásra utalva (Zhu et al, 2006). Mindazonáltal, ezek az eredmények nem utalnak direkt összefüggésre a metamfetamin apoptózist okozó hatása és az ismert viselkedési hatások között. Egy lehetséges mechanizmust Poeggler és munkatársai írtak le patkányok striatumában, d-amfetamin kezelést követően (Poeggler et al, 2007), ahol megnövekedett NMDA receptor érzékenység okozta excitotoxikus sejtkárosodást találtak, melyet kinurénsav-szint hirtelen csökkenése kísért. Az ő észleletük szerint a striatumban a kinurénsav lenne az összekötő molekula a dopamin receptor stimulációjára létrejövő NMDA-függő neurotoxikus hatás létrejöttében. Ezzel szemben, kisagyból származó sejt kultúrán végzett kutatások alapján arra következtettek, hogy az amfetamin sejtkárosító hatásában az excitotoxicitás nem játszik szerepet, bár a megfigyelt

sejtpusztulás kaszpáz 3 aktivációján át ment végbe (Jiménez et al, 2004). A subventriculáris zónából izolált neurális progenitor sejtekben a dopaminerg rendszerre ható drogok, mint a metamfetamin, apoptotikus és nekrotikus sejtpusztuláshoz vezettek (Bento et al, 2011).

Más megközelítés szerint, a megnövekedett apoptózis oka a neurogenesis mértékének droghatásra kiváltott növekedésére adott válasz, melynek célja az újonnan keletkezett neuronok eltávolítása (Tulloch et al, 2011).

Míg a korábban említett vizsgálatokat (Zhu et al, 2006; Tulloch et al, 2011) felnőtt egereken végezték, mi nem találtunk felnőtt állatokon MDPV által indukált apoptotikus hatást az általunk alkalmazott dózisban. Vizsgálatunkban az egerek életkora az agy fejlődése szempontjából a humán terhesség harmadik trimeszterének feleltethető meg. Ezt a kísérleti modellrendszert már számos vizsgálatban használták a pszichoaktív szerek neurotoxikus hatásának vizsgálatára (Dzietko et al, 2010; Saito et al, 2010; Susick et al, 2014). Mivel az MDPV apoptózist okozó hatása a fejlődő agyra korlátozódott, valószínűbb, hogy aktiváció-független neurotoxikus hatásról lehet szó. Bár kísérletünkben a fejlődő agyterületek kifejezetten érzékenynek bizonyultak a droghatásra, az általunk megfigyelt, apoptózist szenvedő neuronok érett morfológiával rendelkeztek. Piramissejtek, kérgi nem piramidális neuronok és a caudate-putamen jellegzetes közepes méretű, tüskés neuronjai (medium spiny neuron) morfológiájuk alapján egyaránt azonosíthatóak voltak az apoptózist elszenvedő sejtek között. Ezzel szemben nem találtunk projekciós neuronok és lokális interneuronok szelektív érintettségére utaló jelet.

Az MDPV hatása feltehetőleg a dopamin transzporter és a norepinefrin transzporter gátlásán keresztül valósul meg, míg a szerotonin visszavételre nincs befolyással (Baumann et al, 2013b). Más pszichoaktív kationokkal (mint pl. a mefedron) szemben az MDPV nem szubsztrátja egy transzporternek sem; pszichoaktív hatását valószínűleg dopaminerg aktiváción keresztül váltja ki. Erre utalnak a különféle viselkedés-vizsgálatokban kapott eredmények is. Az MDPV dóziszfüggően addikciót vált ki, amennyiben a kísérleti állatok a drogot folyamatosan adagolják maguknak (Watterson et al, 2012). Megnöveli a motoros aktivitást, sztereotip viselkedéseket vált ki, gyorsítja a szívverést, emeli a vérnyomást és a testhőmérsékletet (Baumann et al., 2013a; Fantegrossi et al., 2013; Marusich et al., 2012). Számos agyterület, melyekben a jelen kísérletben apoptózist elszenvedő sejteket találtunk, szerepet játszik ezekben a viselkedési válaszokban.

Az eredményeinkből arra következtetünk, hogy a szintetikus kationok a fejlődő agy számos területén károsodást okozhatnak. További terveinkben szerepel az általunk megfigyelt apoptózist szenvedő sejtek neurokémiai karakterizációja, a neurotoxikus hatásra érzékeny időintervallum pontos meghatározása, valamint a dózis-hatás görbe felállítása.

A szintetikus katinonok elterjedtsége továbbra is jelentős. Fontos tehát, hogy a tudományos világ minél gyorsabban reagáljon. Több kutatást végezzen ebben a témában és az MDPV szerkezetben lezajló molekuláris mechanizmusát még részletesebben megismerje. Szakdolgozatomban szereplő adatok és eredmények lehetőséget nyújtanak, hogy ezt a célt el tudjuk érni és alapot szolgáltatassunk a későbbi kutatásoknak.

## Összefoglaló

Az általunk vizsgált MDPV (methylenedioxy-pyrovalerone) a katinonok családjába tartozó ún. „partidrog”; a fiatalok körében széles körben használt, olcsó, az illegális piacon könnyen hozzáférhető pszichoaktív szer. Kiterjedt használata ellenére hatásmechanizmusáról ez idáig csak kevés adat áll rendelkezésre; a fejlődő agyra gyakorolt esetleges negatív hatásai pedig egyáltalán nem ismertek. Kutatásunkban egy olyan egér modellrendszert alkalmaztunk, amely az agy fejlettségi állapotának szempontjából a humán terhesség harmadik trimeszterének megfeleltethető. Vizsgáltuk, hogy a fejlődés ezen fázisában mely agyterületeken figyelhető meg MDPV kezelést követően esetleges apoptotikus hatás. A születést követő hetedik napon C57BL/6J egereket intraperitoneálisan 10mg/ttkg MDPV-vel kezeltünk, míg a kontroll állatok csak fiziológiás sóoldatot kaptak. A kezelés után 24-40 óra elteltével az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk és az apoptózist szenvedő sejtek kimutatására az agyakon szövettani feldolgozást követően anti-kaspáz 3 immunhisztokémiai reakciót hajtottunk végre. A kaspáz-immunreaktív sejteket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk; a jelölt neuronokat tartalmazó agyterületeket Nissl technikával festett párhuzamos metszetek segítségével azonosítottuk, majd megadtuk a területegységre vonatkoztatott pozitív sejtek számát. Kiemelkedően sok kaspáz-immunreaktív sejtet észleltünk a piriform és szenzomotoros kérgi területeken, a gyrus cinguliban és a caudate-putamen-ben. A kísérlet folyamán megállapíthattuk, hogy az agy ezen fejlettségében a nucleus accumbens területe különösen érzékeny az MDPV hatására; a kaspáz-immunreaktív sejtek mintegy kirajzolták a nucleus accumbens területét. Ezzel szemben, vizsgálatunkat felnőtt egereken megismételve nem tapasztaltunk apoptotikus hatást. Kísérletünk alapján megállapítható, hogy az MDPV a fejlődő agyban kifejezett apoptózist okoz, és ez a hatás kifejezett idegrendszeren már nem figyelhető meg.



## Summary

The designer drug of cathinone family, methylenedioxy-pyrovalerone (MDPV), has been on the market for some time as one cheap and frequently used psychoactive drug of abuse. However, its mechanism of action, particularly its potential detrimental effect on the developing brain, is largely unknown, despite the fact that pregnant females may occur among the users. The objective of our study was to identify the brain areas sensitive for the possible apoptotic effect of the widely abused MDPV on the developing brain. To this end, we used a mouse model which can be compared with the developing human fetus of third trimester, considering the developmental stage of the brain. Litters of 7-day-old C57BL/6J mice were treated either with i.p. injection of 10 mg/kg b.wt. MDPV or vehicle (saline), and sacrificed after various time periods (20-48 h). The dose was chosen according to our behavioral observations on adult mice. The brains were then processed for anti-caspase 3 (Casp) immunohistochemistry and the apoptotic cells were identified and counted in different brain regions. We found prominent increase in the number of apoptotic cells in several areas of the brain: piriform and sensorimotor cortices, cingulate gyrus and in the caudate-putamen. The neurons of the nucleus accumbens appeared to be especially sensitive for MDPV at that stage of the development: the Casp-immunoreactive cells outlined the core and shell regions of the accumbens. However, when we repeated the experiment with adult mice, we did not observe the same effect on the brain; the MDPV did not seem to cause apoptotic changes on the mature nervous system.

## Irodalomjegyzék

- Baumann MH, Partilla JS, Lehner KR (2013a) Psychoactive "bath salts": not so soothing. *Eur J Pharmacol* 698: 1-5.
- Baumann MH, Partilla JS, Lehner KR, Thorndike EB, Hoffman AF, Holy M, Rothman RB, Goldberg SR, Lupica CR, Sitte HH, Brandt SD, Tella SR, Cozzi NV, Schindler CW (2013b) Powerful cocaine-like actions of 3,4-methylenedioxypropylamphetamine (MDPV), a principal constituent of psychoactive 'bath salts' products. *Neuropsychopharmacology* 38: 552-62.
- Baumann MH, Ayestas Jr MA, Partilla JS, Sink JR, Shulgin AT, Daley PF, Brandt SD, Rothman RB, Ruoho AE, Cozzi NV (2012) The designer methcathinone analogs, mephedrone and methylone, are substrates for monoamine transporters in brain tissue. *Neuropsychopharmacology* 37, 1192–1203.
- Bento AR, Baptista S, Malva JO, Silva AP, Agasse F (2011) Methamphetamine exerts toxic effects on subventricular zone stem/progenitor cells and inhibits neuronal differentiation. *Rejuvenation Research* 14: 205-214.
- Borek HA, Holstege CP (2012) Hyperthermia and multiorgan failure after abuse of “bath salts” containing 3,4-methylenedioxypropylamphetamine. *Ann Emerg Med* 60, 103–105.
- Cameron KN, Kolanos R, Solis E Jr, Glennon RA, De Felice LJ (2013) Bath salts components mephedrone and methylenedioxypropylamphetamine (MDPV) act synergistically at the human dopamine transporter. *Br J Pharmacol* 168(7): 1750-7.
- Crocker A (1994) Dopamine- mechanisms of action, *Experimental and clinical pharmacology* 17:17-21.
- Dzietko M, Sifringer M, Klaus J, Endesfelder S, Brait D, Hansen HH, Bendix I, Felderhoff-Mueser U (2010) Neurotoxic effects of MDMA (ecstasy) on the developing rodent brain. *Dev Neurosci* 32:197-207.

- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68:383-424.
- EMCDDA, (2011 és 2012) European Monitoring Centre for drugs and drug addiction, <http://www.emcdda.europa.eu/stats12>
- Fantegrossi WE, Gannon BM, Zimmerman SM, Rice KC (2013) In vivo effects of abused 'bath salt' constituent 3,4-methylenedioxypropylone (MDPV) in mice: drug discrimination, thermoregulation, and locomotor activity. *Neuropsychopharmacology* 38(4):563-73.
- Ferri KF, Kroemer G (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3(11): E255-63.
- Fullajtár M, Ferencz C (2012) Designer drug induced psychosis. *Neuropsychopharmacol Hung* 14(2): 137-140.
- Fuma T, Kodama T, Honda Y, Tanaka T, Kubo Y, Ohashi N (2009) Influence of methylene dioxypropylone on central nervous system using microdialysis method. *Chem BioIntegrated Management* 5: 62–72.
- Fuwa T, Fukumori N, Tanaka T, Kubo Y, Ogata A, Uehara S (2007). Microdialysis study of drug effects on central nervous system - changes of dopamine levels in mice striatum after oral administration of methylenedioxypropylone. *Ann Rep Tokyo Metr Inst PH* 58: 287–292.
- Gardner EL (1997) Brain reward mechanisms. In: Lowinson JH, Ruiz P, Millman RB, Langrod JG, editors. Substance abuse: a comprehensive textbook, 3rd end. Batimore' Williams & Wilkins, p.51-85.
- Gatch MB, Taylor CM, Forster MJ (2013) Locomotor stimulant and discriminative stimulus effects of 'bath salt' cathinones. *Behav Pharmacol* 24(5-6):437-47.
- Grossmann J (2002) Molecular mechanisms of “detachment-induced apoptosis - Anoikis”. *Apoptosis* (7): 247-260.

- Gunderson EW, Kirkpatrick MG, Willing LM, Holstege CP (2013) Substituted cathinone products: a new trend in "bath salts" and other designer stimulant drug use. *Addict Med* 7(3):153-62.
- Huang PK (2012) Contrasting effects of d-methamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxypropylamphetamine, and 4-methylmethcathinone on wheel activity in rats. *Drug and Alcohol Dependence* 126: 168–175.
- Huang PK, Aarde SM, Angrish D, Houseknecht KL, Dickerson TJ, Taffe MA (2012). Contrasting effects of d-methamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxypropylamphetamine, and 4-methylmethcathinone on wheel activity in rats. *Drug Alcohol Depend* 126: 168–175.
- Ikemoto S. (2007) Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 56(1): 27-78.
- Jaques S C, Kingsbury A, Henschke P, Chomchai C., Clews S., Falconer J., M E Abdel-Latif, J M Feller and J L Oei, (2014) Cannabis, the pregnant woman and her child: weeding out the myths. *Journal of Perinatology* doi:10.1038/jp.2013.180
- Jiménez A, Jordà EG, Verdaguer E, Pubill D, Sureda FX, Canudas AM, Escubedo E, Camarasa J, Camins A, Pallàs M (2004) Neurotoxicity of amphetamine derivatives is mediated by caspase pathway activation in rat cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 196: 223-34.
- Karlsson L, Andersson M, Kronstrand R, Kugelberg FC (2014) Mephedrone, Methyone and 3,4-Methylenedioxypropylamphetamine (MDPV) Induce Conditioned Place Preference in Mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2014 Apr 16. doi: 10.1111/bcpt.12253.
- Marusich JA, Grant KR, Blough BE, Wiley JL (2012) Effects of synthetic cathinones contained in "bath salts" on motor behavior and a functional observational battery in mice. *Neurotoxicology* 33: 1305-13.

- Meltzer PC, Butler D, Deschamps JR, Madras BK (2006) 1-(4-Methylphenyl)-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one (Pyrovalerone) analogues: a promising class of monoamine uptake inhibitors. *J Med Chem* 49: 1420–1432.
- Meyer, M.R., Du, P., Schuster, F., Maurer, HH (2010) Studies on the metabolism of the  $\alpha$ -pyrrolidinophenone designer drug methylenedioxy-pyrovalerone (MDPV) in rat and human urine and human liver microsomes using GC-MS and LC-high-resolution MS and its detectability in urine by GC-MS. *J Mass Spectrom* 45:1426-42.
- Murray BL (2012) Death following recreational use of designer drug “bath salts” containing 3,4-methylenedioxy-pyrovalerone (MDPV). *J Med Toxicol* 8:69–75.
- Nagai F, Nonaka R, Satoh Hisashi Kamimura K. (2007) The effects of non-medically used psychoactive drugs on monoamine neurotransmission in rat brain. *Eur J Pharmacol* 559(2–3): 132–137.
- Oei JL, Kingsbury A, Dhawan A, Burns L, Feller JM, Clews S, Falconer J, Abdel-Latif ME (2012) Amphetamines, the pregnant woman and her children: a review. *J Perinatol*. 32(10): 737-47.
- Poeggeler B, Rassoulpour A, Wu HQ, Guidetti P, Roberts RC, Schwarcz R (2007) Dopamine receptor activation reveals a novel, kynurenate-sensitive component of striatal N-methyl-D-aspartate neurotoxicity. *Neuroscience* 148: 188-97.
- Saito M, Chakraborty G, Hegde M, Ohsie J, Paik SM, Vadasz C, Saito M (2010) Involvement of ceramide in ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the neonatal mouse brain. *J Neurochem* 115: 168-77.
- Simmler LD, Buser TA, Donzelli M, Schramm Y, Dieu LH, Huwyler J, Chaboz S, Hoener MC, Liechti ME (2013) Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *Br J Pharmacol* 168: 458-70.
- Spiller HA, Ryan ML, Weston RG, Jansen J (2011) Clinical experience with and analytical confirmation of “bathsalts” and “legal highs” (synthetic cathinones) in the United States. *Clin Toxicol (Phila)*, 49(6):499-505.

- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69:217-45.
- Susick LL, Lowing JL, Provenzano AM, Hildebrandt CC, Conti AC (2014) Postnatal Ethanol Exposure Simplifies the Dendritic Morphology of Medium Spiny Neurons Independently of Adenylyl Cyclase 1 and 8 Activity in Mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2014 Mar 21. doi: 10.1111/acer.12383.
- Thompson BL, Levitt P, Stanwood GD (2009) Prenatal exposure to drugs: effects on brain development and implications for policy and education, *Nature Reviews Neuroscience* 10, 303-312.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281(5381): 1312-6.
- Tidjane Corera A, Do-Rego JC, Costentin J, Bonnet JJ (2001) Differential sensitivity to NaCl for inhibitors and substrates that recognize mutually exclusive binding sites on the neuronal transporter of dopamine in rat striatal membranes. *Neurosci Res* 39: 319–325.
- Tomiyama K, Funada M (2014) Cytotoxicity of synthetic cannabinoids on primary neuronal cells of the forebrain: the involvement of cannabinoid CB1 receptors and apoptotic cell death. *Toxicol Appl Pharmacol* 274: 17-23.
- Tulloch IK, Afanador L, Zhu J, Angulo JA (2011) Methamphetamine induces striatal cell death followed by the generation of new cells and a second round of cell death in mice. *Curr Neuropharmacol* 9: 79-83.
- Vaugeois JM, Bonnet JJ, Duterte-Boucher D, Costentin J (1993) In vivo occupancy of the striatal dopamine uptake complex by various inhibitors does not predict their effects on locomotion. *Eur J Pharmacol* 230: 195–201.
- Vislobokov AI, Mantsev VV, Kuzmin AV (1993) Cocaine, amphetamine and cathinone, but not nomifensine and pargyline increase calcium inward current in internally perfused neurons. *Life Sci* 52: PL261-5.

- Watterson LR, Kufahl PR, Nemirovsky NE, Sewalia K, Grabenauer M, Thomas BF, Marusich JA, Wegner S, Olive MF (2014) Potent rewarding and reinforcing effects of the synthetic cathinone 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV). *Addict Biol* 19: 165-74.
- Xie XQ (2014) Chemo genomics knowledge based poly pharmacology analyses of drug abuse related G-protein coupled receptors and their ligands. *Front Pharmacol* 5:3. doi: 10.3389/fphar.2014.00003.
- Xu W, Zhu JP, Angulo JA (2005) Induction of striatal pre- and postsynaptic damage by methamphetamine requires the dopamine receptors. *Synapse* 58(2):110-21.
- Zhu JPQ, Xu W, Angulo JA (2006) Methamphetamine-induced cell death: Selective vulnerability in neuronal subpopulations of the striatum in mice. *Neuroscience* 140: (2):607–622.

## **Köszönetnyilvánítás**

Elsősorban témavezetőmnek Dr. Ádám Ágotának szeretném megköszönni azt a türelmet és odafigyelést, amit rám fordított. Mindig nyitott és segítőkész volt az irányomban, ami nélkül ez a tanulmány nem jöhetett volna létre. Szakmai tudásával folyamatosan inspirált, hogy még mélyebben vessem bele magam a neurobiológia tudományába. Nehéz pillanatokban is lelket öntött belém és nem engedte, hogy bármi eltérítsen. Hálásan köszönöm!

Prof. Csillag András inspiráló szavai és folytonos pozitív hozzáállása is nagyban megkönnyítette a munkámat és folyamatosan ébren tartotta az érdeklődésemet. Ezúton is köszönöm neki.

Hálás vagyok Gerecsei László orvostanhallgatónak, hogy szakmai és gyakorlati tudása gördülékenyebbé tette a közös munkánkat.

A tanulmány a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet-és Fejlődéstani Intézetében készült. Az intézet dolgozóinak is hálával tartozom, gyakorlati ismereteikkel megkönnyítették a laborban végzett munkámat.



**HuVetA - SZIA**  
**ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\***

Név: .....

Elérhetőség (e-mail cím):.....

A feltöltendő mű címe:.....

.....

A mű megjelenési adatai:.....

Az átadott fájlok száma: .....

---

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA és a SZIA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA és a SZIA egynél több (csak a HuVetA és a SZIA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy a átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrészt mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (**egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel**):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban/SZIA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- a Szent István Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a SZIE Állatorvos-tudományi Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

---

\* Jelen nyilatkozat az 5/2011. számú, *A Szent István Egyetemen folytatott tudományos*

*publikációs tevékenységgel kapcsolatos adatbázis kialakításáról és alkalmazásáról*  
című rektori utasításhoz kapcsolódik, illetve annak alapján készült.

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA/SZIA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban/SZIA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 201... év .....hó .....nap

---

aláírás  
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

---

*A HuVetA Magyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

*A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvos-tudományi Kar és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

*A SZIA Szent István Archívum a Szent István Egyetemen keletkezett tudományos dolgozatok tára.*



## SEMMEIWEIS EGYETEM

### Általános Orvostudományi Kar

#### Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Budapest, IX. Tüzoltó u. 58.

Igazgató: Dr. Csillag András egyetemi tanár

Levélcím: 1450 Budapest, Pf. 95

Tel.: 459-1500/3600, Fax.: 215-5158

<http://www.ana.sote.hu>

Igazolom, hogy a "A „designer drog” metiléndioxi-pirovaleron (MDPV) hatása a fejlődő idegrendszerre a terhesség harmadik trimeszterével analóg egérmodellen" c. szakdolgozatban leírt kutatás Lepesi Nikolett munkája, melynek bírálatra való benyújtásához, valamint nyilvános védésre bocsjátásához ezúton hozzájárulok.

Tisztelettel:

Dr. Ádám Ágota

tudományos munkatárs

SE Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Budapest, 2014. április 25.