

**DIE NEUROTOXIZITÄT VON ECSTASY -
UNTERSUCHUNGEN ZUM MÖGLICHEN
PATHOMECHANISMUS**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Hilke Andresen

aus Husum

Hamburg 2003

Meinen Eltern gewidmet

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Paul Messinger

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Achim Schmoldt

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2003

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Rechtsmedizin der Universität Hamburg (Direktor Prof. Dr. med. Klaus Püschel) in der Zeit von September 1999 bis November 2002 angefertigt.

DANKSAGUNGEN

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Achim Schmoldt, Institut für Rechtsmedizin der Universität Hamburg, möchte ich für die Überlassung des Themas und die intensive Unterstützung herzlich danken.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Paul Messinger, Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Hamburg, danke ich ganz besonders für die Vertretung der Arbeit im Fachbereich Chemie.

Meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Rechtsmedizin danke ich sehr für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Abteilung für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie des UKE, möchte ich für die Bereitstellung der Thrombozyten-Konzentrate herzlich danken.

Für die schnelle Bestimmung der Thrombozytenzahlen einen ganz besonderen Dank an die Mitarbeiterinnen des Institutes für Klinische Chemie, Zentrum für Klinisch-Theoretische Medizin I des UKE.

Für die zeitweilige Nutzungsmöglichkeit des β -Counters bzw. des Mikroplatten-Photometers bedanke ich mich im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Pharmakologie, bzw. der Klinik für Neurochirurgie, Labor für Hirntumorbiologie, UKE.

Denjenigen, die Korrektur gelesen haben, einen ganz herzlichen Dank für die wertvollen Kommentare und Anregungen.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | <u>EINLEITUNG</u> | 1 |
| 1.1 | Einführung | 1 |
| 1.2 | Historischer Überblick | 2 |
| 1.2.1 | Mögliche Inhaltstoffe/Tablettenzusammensetzungen | 4 |
| 1.3 | Wirkungsmechanismus | 5 |
| 1.3.1 | Serotoninerges System | 5 |
| 1.3.2 | Dopaminerges System | 7 |
| 1.3.3 | Pharmakokinetik | 8 |
| 1.4 | Wirkung auf den Konsumenten | 9 |
| 1.4.1 | Positiv erlebte psychotrope Akuteffekte | 9 |
| 1.4.2 | Negativ erlebte psychotrope Akuteffekte | 9 |
| 1.5 | Toxikologische Aspekte | 10 |
| 1.5.1 | Vegetative Effekte | 11 |
| 1.5.2 | Neurologische Komplikationen | 11 |
| 1.5.3 | Langzeitschäden | 11 |
| 1.6 | Neurotoxizität | 12 |
| 2 | <u>FRAGESTELLUNG</u> | 16 |
| 2.1 | Neurotoxizität – in der Literatur diskutierte Pathomechanismen | 16 |
| 2.2 | Ziel der Arbeit | 19 |
| 2.3 | Vorgehensweise | 20 |
| 3 | <u>METHODEN</u> | 22 |
| 3.1 | Vorbereitung der Thrombozyten | 22 |
| 3.1.1 | Gewinnung der Thrombozyten-Konzentrate | 22 |
| 3.1.2 | Vorbereitung der intakten Thrombozyten | 22 |
| 3.1.3 | Herstellung des Thrombozyten-Lysates | 23 |
| 3.1.4 | Bestimmung der Thrombozytenzahl | 23 |
| 3.1.5 | Proteinbestimmung | 23 |
| 3.2 | Aufnahme über den selektiven Serotonin-Transporter | 23 |
| 3.2.1 | Aufnahme von Serotonin | 23 |
| 3.2.1.1 | Vorbereitungen | 23 |
| 3.2.1.2 | Durchführung | 24 |
| 3.2.1.3 | Bestimmung der unspezifischen Bindung | 25 |
| 3.2.1.4 | Zeitverlauf des 5-HT-Transportes | 25 |
| 3.2.1.5 | Bestimmung kinetischer Konstanten | 26 |
| 3.2.2 | Aufnahme von Dopamin | 26 |
| 3.2.2.1 | Vorbereitungen | 26 |
| 3.2.2.2 | Durchführung | 26 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.2.3 Unspezifische Bindung | 27 |
| 3.2.2.4 Zeitverlauf des Dopamin-Transportes | 27 |
| 3.2.2.5 Bestimmung kinetischer Konstanten | 27 |
| 3.2.3 Aufnahme von MDMA | 27 |
| 3.2.3.1 Vorbereitungen | 27 |
| 3.2.3.2 Durchführung | 28 |
| 3.2.3.3 Unspezifische Bindung | 28 |
| 3.2.3.4 Zeitverlauf des MDMA-Transportes | 28 |
| 3.2.3.5 Bestimmung der kinetischen Konstanten | 28 |
| 3.3 Hemmung der Aufnahme in die Thrombozyten | 29 |
| 3.3.1 Hemmung der Serotonin-Aufnahme | 29 |
| 3.3.2 Hemmung der Dopamin-Aufnahme | 30 |
| 3.4 Aufnahme über den Vesikel-Transporter | 30 |
| 3.4.1 Vorbereitung | 30 |
| 3.4.1.1 Bestimmung der Reserpin-Konzentration mittels HPLC | 31 |
| 3.4.2 Aufnahme von Serotonin in die Vesikel | 31 |
| 3.4.2.1 Hemmung der 5-HT Aufnahme in die Speichervesikel | 32 |
| 3.4.3 Aufnahme von Dopamin in die Vesikel | 32 |
| 3.4.4 Aufnahme von MDMA in die Vesikel | 32 |
| 3.5 Bestimmung der MAO-B-Aktivität | 32 |
| 3.5.1 Vorbereitung | 33 |
| 3.5.2 Durchführung | 33 |
| 3.5.2.1 Kinetik | 33 |
| 3.5.2.2 Zeitverlauf | 34 |
| 3.5.2.3 Hemmung | 34 |
| 3.5.2.4 Reversibilität | 34 |
| 3.6 Bestimmung des nativen Serotoningehaltes in Thrombozyten | 35 |
| 3.6.1 HPLC-Ausrüstung | 35 |
| 3.6.2 Chromatographische Bedingungen | 35 |
| 3.6.3 Eichkurve | 35 |
| 3.6.4 Durchführung | 35 |
| 3.7 Untersuchung der Membran-Integrität | 36 |
| 3.7.1 Durchführung | 36 |
| 3.8 Bestimmung von H₂O₂ | 37 |
| 3.8.1 Vorbereitung | 37 |
| 3.8.1.1 Bestimmung der H ₂ O ₂ -Konzentration der Stammlösung | 38 |
| 3.8.2 Durchführung | 38 |
| | |
| 4 MATERIAL | 39 |
| <hr/> | |
| 4.1 Chemikalien | 39 |
| 4.1.1 Reagenzien | 39 |
| 4.1.2 Lösungsmittel | 40 |
| 4.1.3 Fertig-Tests | 40 |
| 4.2 Humanes Untersuchungsmaterial | 40 |
| 4.3 Geräte | 40 |

| | | |
|------------|------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3.1 | Verbrauchsmaterial | 40 |
| 4.3.2 | Laborgeräte | 40 |
| 5 | ERGEBNISSE | 42 |
| 5.1 | Serotoninerge Neuronen | 42 |
| 5.1.1 | Der selektive Serotonin-Transporter | 42 |
| 5.1.2 | Der Transporter für biogene Amine | 42 |
| 5.2 | Methodenauswahl | 43 |
| 5.2.1 | Thrombozyten als Modell | 43 |
| 5.2.2 | Gewinnung der Thrombozyten | 44 |
| 5.2.3 | Waschen der Thrombozyten | 45 |
| 5.3 | Serotoningehalt der verwendeten Thrombozyten | 45 |
| 5.3.1 | Optimierung der HPLC-Methode | 45 |
| 5.3.1.1 | Präzipitation der Thrombozyten | 48 |
| 5.3.2 | Der native 5-HT-Gehalt in humanen Thrombozyten | 48 |
| 5.4 | Der selektive Serotonin-Transporter | 49 |
| 5.4.1 | Auswahl der Methode und Bestimmung der Reaktionsparameter | 49 |
| 5.4.2 | Serotonin-Aufnahme | 51 |
| 5.4.2.1 | Unspezifische Bindung | 51 |
| 5.4.2.2 | Zeitverlauf | 53 |
| 5.4.2.3 | Weitere Parameter | 54 |
| 5.4.3 | Kinetik | 56 |
| 5.4.4 | Hemmung der 5-HT-Aufnahme | 57 |
| 5.4.5 | Dopamin-Aufnahme in die Thrombozyten | 62 |
| 5.4.5.1 | Unspezifische Bindung | 62 |
| 5.4.5.2 | Zeitverlauf der Dopamin-Aufnahme in die Thrombozyten | 63 |
| 5.4.5.3 | Kinetik | 64 |
| 5.4.5.4 | Hemmung der Dopamin-Aufnahme | 65 |
| 5.5 | Der Vesikel-Transporter | 67 |
| 5.5.1 | Serotonin-Aufnahme in die Vesikel | 67 |
| 5.5.1.1 | Herstellung der Reserpin-Lösungen | 68 |
| 5.5.1.2 | Durchführung | 70 |
| 5.5.1.3 | Einfluss von Inhibitoren | 72 |
| 5.5.2 | Dopamin-Aufnahme in die Speichervesikel | 76 |
| 5.6 | MDMA-Aufnahme in die Thrombozyten | 77 |
| 5.6.1 | Aufnahme von MDMA über den Serotonintransporter | 78 |
| 5.6.1.1 | Unspezifische Bindung | 78 |
| 5.6.1.2 | Zeitverlauf | 79 |
| 5.6.1.3 | MDMA-Transport-Kinetik | 80 |
| 5.6.2 | MDMA-Aufnahme in die Vesikel | 83 |
| 5.7 | Monoaminoxidase-B-Aktivität | 84 |
| 5.7.1 | Entwicklung einer Methode und Optimierung der Reaktionsparameter | 85 |
| 5.7.2 | Kinetische Konstanten der MAO-B in den Thrombozyten | 89 |
| 5.7.3 | Hemmung der MAO-B-Aktivität | 91 |
| 5.7.4 | Reversibilität der Hemmung | 94 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.8 Integrität der Thrombozyten-Membran | 95 |
| 5.8.1 Auswahl einer geeigneten Methode | 96 |
| 5.8.2 Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität | 96 |
| 5.9 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies | 100 |
| 5.9.1 Auswahl einer geeigneten Methode | 101 |
| 5.9.2 Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen | 102 |
| 5.9.3 Durchführung | 107 |
| 5.9.4 Ergebnisse | 108 |
| 5.10 Standardabweichungen | 109 |
| | |
| 6 DISKUSSION | 112 |
| <hr/> | |
| 6.1 Thrombozyten als Modell | 112 |
| 6.2 Aufnahme von Serotonin über den selektiven Serotonin-Transporter | 115 |
| 6.2.1 Messung der 5-HT-Konzentration | 118 |
| 6.3 MDMA-Aufnahme in die Thrombozyten | 119 |
| 6.4 Inhibition des SERT durch Ecstasy | 124 |
| 6.5 Hemmung des Vesikel-Transporters durch Ecstasy | 128 |
| 6.6 Aufnahme von Dopamin in die Thrombozyten | 130 |
| 6.7 Kalkulation und Interpretation der Kinetik-Ergebnisse | 132 |
| 6.8 Einfluss von Ecstasy auf die Monoaminoxidase-B | 142 |
| 6.8.1 Kalkulation und Interpretation der MAO-B-Ergebnisse | 145 |
| 6.9 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies | 146 |
| 6.10 Das Problem der Stereoselektivität | 150 |
| 6.11 Diskussion der Hypothese | 151 |
| 6.11.1 Überprüfung der Hypothese | 152 |
| 6.12 Ausblick | 158 |
| | |
| 7 ZUSAMMENFASSUNG | 159 |
| <hr/> | |
| 7.1 Zusammenfassung | 159 |
| 7.2 Summary | 162 |
| | |
| 8 LITERATURVERZEICHNIS | 165 |
| <hr/> | |
| Abkürzungen | 187 |
| Gefahrstoffe | 188 |
| Lebenslauf | 189 |
| Erklärung | 190 |

1 Einleitung

1.1 Einführung

Unter der Bezeichnung „Ecstasy“ wird eine Gruppe von in Struktur und Wirkungsspektrum ähnlichen Substanzen zusammengefasst. Es handelt sich hierbei um Stoffe, die ein Amphetamin-Grundgerüst mit einem 3,4-Methylenedioxy-Substituenten besitzen: 3,4-Methylenedioxyamphetamin (MDA), 3,4-Methylenedioxyethylamphetamin (MDEA) und N-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (MDMA) (Abbildung 1). Sie sind alle optisch aktiv; auf die Stereochemie wird in Kapitel 6.10 näher eingegangen.

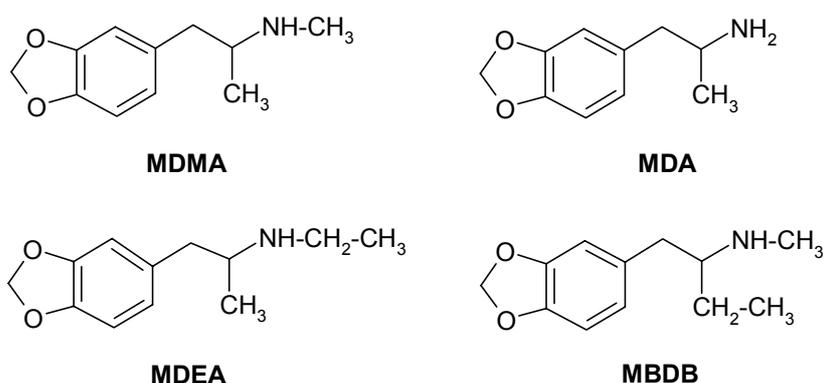


Abbildung 1 Strukturformeln der Ecstasy-Substanzen

Sie weisen somit strukturelle Ähnlichkeiten sowohl zum Amphetamin als auch zum Mescaline auf (siehe Abbildung 2). Dies spiegelt sich auch in ihrer Wirkung wider, die eine Kombination aus einem Stimulans (Amphetamin) und einem Halluzinogen (Mescaline) darstellt.

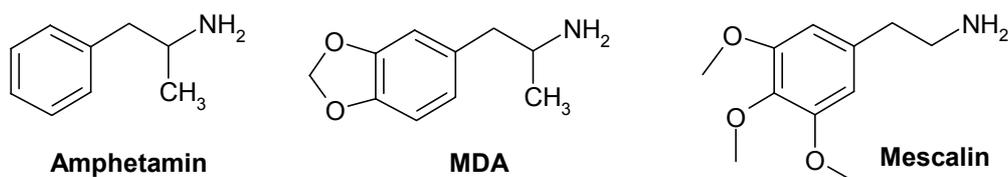


Abbildung 2 Strukturelle Verwandtschaft zu anderen Rauschdrogen

In der Literatur wird Ecstasy sehr häufig als Synonym für MDMA gebraucht, das als erster Vertreter dieser Gruppe synthetisiert wurde. MDMA gilt als Leitsubstanz. Mit ihm wurden bereits die meisten Untersuchungen durchgeführt. Es wird oft als Hauptwirkstoff des Ecstasy bezeichnet. Fälschlicherweise werden in manchen Literaturstellen Amphetamin oder Methamphetamin ebenfalls als Ecstasy bezeichnet. In dieser Arbeit wird „Ecstasy“ als Oberbegriff für alle vier Substanzen verwendet.

Weitere gebräuchliche Synonyme oder Szenenamen für die verschiedenen Inhaltsstoffe sind zum Beispiel: MDMA („Ecstasy“, „Adam“), MDA („Love-Drug“, „hug drug“), MDEA („E“, „Eve“, MDE) (Katzung und Harfst 1996).

1.2 Historischer Überblick

MDMA wurde bereits 1898 von dem deutschen Chemiker Haber im Rahmen seiner Doktorarbeit synthetisiert. 1912 wurde es von Merck wiederentdeckt und 1914 als Appetitzügler patentiert, aber nie auf den Markt gebracht.

MDA wurde erstmals 1910 synthetisiert, aber erst Ende der 30er Jahre näher untersucht. Es wurde mehrfach als Medikamentenwirkstoff patentiert: als Antidepressivum (1957), Antitussivum (1958), Ataraktikum (1960) und Anorektikum (1961). In der Medizin wurde MDA jedoch nie angewendet (Gill et al. 2002; Hegadoren et al. 1999; Stone et al. 1986).

Berichten zufolge wurden MDMA und MDA - wie auch LSD - in den 50er Jahren als sogenannte psychochemische Kampfstoffe („Wahrheitserum“) in den USA untersucht, aber aufgrund der hohen Toxizität wieder verworfen (Milroy 1999; Szukaj 1994).

Eine Resynthese von MDA und MDMA durch Shulgin, 1965, der für ihren Einsatz in der Psychotherapie und Psychoanalyse eintrat, führte diese Substanzen wieder in die wissenschaftliche Diskussion ein (Shulgin 1986 zit. nach Szukaj 1994).

Das spezielle Wirkungsspektrum machte Psychiater und Psychotherapeuten aufmerksam, die auf günstige Effekte bei bestimmten Patientengruppen hofften (Milroy 1999; Shulgin 1986 zit. nach Szukaj 1994). So wurden diese Substanzen aufgrund ihrer entactogenen Wirkung („innere Berührung hervorbringend“) von den

70ern bis in die 90er Jahre als adjuvantes Therapeutikum in der Psychotherapie z.T. erfolgreich eingesetzt und galten bald als „Penicillin für die Seele“ (Milroy 1999; Hermle et al. 1993).

Da befürchtet wurde, dass sie missbräuchlich verwendet werden könnten, sollten diese Erfolge vorerst nicht an die Öffentlichkeit gelangen. Trotzdem gelang es nicht, MDA und MDMA von der „Szene“ fernzuhalten:

Bereits Ende der 60er, Anfang der 70er gelangte MDA in den USA auf den Markt („the new love drug“). Nach Bekanntwerden mehrerer Todesfälle ging der Konsum ab 1973 stark zurück, MDA wurde in den „Controlled Substances Act“ (CSA) (nicht verkehrsfähige Substanzen) eingestuft und in der Drogen-Szene von MDMA abgelöst. MDMA wurde bis 1980 nur mäßig konsumiert, machte aber durch seine besondere Wirkung (euphorische kombiniert mit psychedelischen Effekten) schnell auf sich aufmerksam (Gill et al. 2002). Mitte der 70er wurde der ursprüngliche Szenename „Empathy“ werbewirksam durch „Ecstasy“ ersetzt.

1985 wurden MDA und MDMA aufgrund einer drastischen Zunahme des Konsums unter Studenten und erster Berichte über ihre Toxizität und Neurotoxizität in den USA (trotz Protestes zahlreicher Psychiater, die es als Psycholytikum schätzten) in die Anlage I des BtM-Gesetzes aufgenommen (Hegadoren et al. 1999; Steele et al. 1994; Szukaj 1994).

1986 wurden sie in Deutschland (in Folge eines Beschlusses der Vereinten Nationen) ebenfalls dem Betäubungsmittelgesetz (Anlage I des BtMG) unterworfen, da keine akzeptable medizinische Verwendbarkeit, dafür aber ein hohes Missbrauchspotential besteht. Bereits 1971 waren sie in Großbritannien als „Klasse A-Droge“ des BtM-Gesetzes eingestuft worden (Henry 1992; Milroy 1999).

Nach dem Verbot von MDA und MDMA wurde zunächst MDEA (MDE) und später auch MBDB als „Designer-Drogen“ im klassischen Sinne synthetisiert („designed“), um das Betäubungsmittelgesetz zu umgehen. Sie gelangten in den späten 80er Jahren auf den Markt.

MDEA ist in Deutschland seit 1991 in die Anlage I des BtMG eingestuft, MBDB wurde 1995 der Anlage I des BtMG unterstellt (Katzung und Harfst 1996).

In den letzten Jahren erlangte Ecstasy als sogenannte „Freizeit- und Partydroge“ immer mehr an Bedeutung. Es wird hauptsächlich in kleinen Gruppen, aber auch bei großen Tanzveranstaltungen, sog. „Raves“, überwiegend von Jugendlichen der „Techno-Szene“ konsumiert (Milroy 1999).

In der deutschen Drogenszene lässt sich eine Veränderung vermuten: Während der Konsum betäubender Drogen eher zurückgeht, werden „Ecstasy“ und andere „Partydrogen“ immer häufiger konsumiert. Die Konsumenten scheinen sich im Wesentlichen auf die Gruppe der 15 bis 25-Jährigen zu beschränken. In England konsumierten ca. 13-18 % der 18 bis 25-Jährigen, in Frankreich ca. 5% der männlichen 18 bis 23-Jährigen (Vaiva et al. 2001), in Deutschland konsumierten 1995 ca. 11-14 % der 12 bis 25-Jährigen Ecstasy (Dinse 1997). Ergebnisse aus dem europäischen und außereuropäischen Ausland (z.B. Brasilien (Ferigolo et al. 1998)) weisen in eine ähnliche Richtung (Thomasius et al. 1997).

In Großbritannien ging man 1995 von ca. 1 Mio. Ecstasy-Konsumenten aus, in den Niederlanden von bis zu 500.000 Konsumenten, in Deutschland wurde die Zahl der Konsumenten 1996 auf mehr als 500.000 geschätzt (Katzung und Harfst 1996).

Ecstasy ist die zur Zeit am häufigsten konsumierte synthetische Droge unter Jugendlichen und jungen Erwachsenen (Thomasius und Kraus 1999).

1.2.1 Mögliche Inhaltstoffe/Tablettenzusammensetzungen

Ecstasy wird vorwiegend oral in Tablettenform (selten auch als Kapseln) eingenommen. Die Tabletten sind häufig bunt und fallen durch unterschiedliche Logos (z.B. Smiley, Herz) auf. Hierdurch soll eine Art „Markenbewusstsein“ bei den Konsumenten hervorgerufen werden, wobei die gleiche Prägung keinesfalls dasselbe Herstellungslabor oder gar denselben Inhalt garantiert.

Die illegale Herstellung erfolgt vorwiegend nach der Methode der reduktiven Aminierung oder durch die Leukart-Wallach-Synthese (Bohn et al. 1993; Renton et al. 1993).

Die Zusammensetzung der Tabletten ist regional und chargenweise verschieden.

Mögliche Inhaltsstoffe sind: MDMA, MDEA, MDA, MBDB, Amphetamin, Methamphetamin, Ephedrin, Coffein, Paracetamol, Phenylethylamin, z.T. auch

Atropin und andere Substanzen. Oft ist der Gehalt an pharmakologisch aktiven Substanzen auch sehr gering.

Saunders untersuchte zahlreiche als Ecstasy angebotene Tabletten und stellte fest, dass in den letzten Jahren insgesamt 10 % aller Tabletten keine aktive Substanz enthielten, 5 % Amphetamin, Ephedrin und/oder Coffein, 60 % MDMA, 20 % MDEA und 10 % MBDB (Saunders 1997, zit. nach Milroy 1999). In Deutschland enthielten die untersuchten Blut- und Urinproben der letzten Jahre fast ausschließlich MDMA oder, seltener, Amphetamin.

Die Applikation als Tabletten hat mehrere Vorteile: Vor allem ist durch die perorale Applikation die Hemmschwelle niedriger als bei Drogen, die geraucht oder gespritzt werden. Zudem sind die Tabletten seit ihrer Etablierung auf dem Markt preisgünstig; die Tablettenform suggeriert den Konsumenten pharmazeutische Qualität.

Ecstasy hat das Image, im Vergleich zu anderen Freizeitdrogen „safe“, also gesundheitlich unbedenklich, zu sein, was durch die Laienpresse lange Zeit unterstützt wurde (Hegadoren et al. 1999).

1.3 Wirkungsmechanismus

Die psychoaktiven Ecstasy-Substanzen greifen in die zentrale Neurotransmitter-Homöostase ein. Hierbei beruht der Hauptwirkmechanismus auf Interaktionen mit dem serotonergen und in zweiter Linie dem dopaminergen System. Zu einem geringeren Teil wird auch Noradrenalin beeinflusst (Schmoldt 1999).

Es wird zwischen der Kurzzeit- und der Langzeit-Wirkung unterschieden, erstere ist für die von den Konsumenten erwünschten Rauscheffekte verantwortlich.

Die Langzeitwirkung äußert sich in einer Neurodegeneration und wird unter 1.6 beschrieben.

1.3.1 Serotonerges System

Ecstasy bewirkt eine Erhöhung der extrazellulären Konzentration des Serotonins (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) (Gough et al. 1991; Rudnick und Wall 1992b). Dies resultiert aus der Fähigkeit des MDMA, die 5-HT-Freisetzung zu stimulieren, indem

es mit hoher Affinität an das 5-HT-Transporter-Protein (selektiver Serotonin-Transporter (SERT)) bindet, die Richtung des Neurotransmitter-Transportes umkehrt (Rudnick und Wall 1992a) und den Rücktransport hemmt (Kokotos-Leonardi und Azmitia 1994). Intrazellulär soll die Freisetzung aus den Speichervesikeln stimuliert werden (Cozzi et al. 1999; Gu und Azmitia 1993).

Der stimulatorische Effekt auf die 5-HT-Freisetzung konnte experimentell *in vitro* bereits in Synaptosomen (McKenna et al. 1991; Nichols et al. 1982), Hirn-Schnitten (Johnson et al. 1986; Sprouse et al. 1989) und Neuronen-Kulturen (Azmitia et al. 1990; Gu und Azmitia 1993) belegt werden. Der 5-HT-Efflux konnte auch *in vivo* durch Mikrodialyse bewiesen werden (Gough et al. 1991; Gudelsky und Nash 1996; Schmidt et al. 1987).

Diese akute Freisetzung des 5-HT soll zum einen ein Calcium-abhängiger Effekt (Crespi et al. 1997), zum anderen ein Calcium-unabhängiger, Transporter-vermittelter Effekt sein (Johnson et al. 1986; Schuldiner et al. 1993).

Die durch Ecstasy bewirkte Freisetzung *in vivo* kann größtenteils durch Substanzen, die an den 5-HT-Transporter binden und somit die 5-HT-Wiederaufnahme in die präsynaptischen Nervenendigungen hemmen, vermindert werden, wie zum Beispiel durch Fluoxetin, Fluvoxamin und Citalopram (Azmitia et al. 1990; Gu und Azmitia 1993; Gudelsky und Nash 1996; Hekmanpanah und Peroutka 1990; Schmidt 1987; Schmidt und Taylor 1987, 1988; Schmidt et al. 1987) oder durch Imipramin (Rudnick und Wall 1992b).

MDA, MDMA und MDEA sind in ihrer 5-HT-Ausschüttung äquipotent (O'Loinsigh et al. 2001).

Darüber hinaus blockiert MDMA den Abbau des 5-HT durch die Monoaminoxidase-A (MAO-A). Hierdurch werden ebenfalls die 5-HT-Spiegel erhöht (Kotokos-Leonardi und Azmitia 1994). Die Konzentration des 5-HT-Hauptmetaboliten 5-Hydroxyindol-essigsäure (5-HIAA) im Gehirn sinkt um 30-60 % (Battaglia et al. 1987; Colado et al. 1993; Hewitt und Green 1994; Stone et al. 1986) und ist auch nach zwei Wochen noch selektiv vermindert (Stone et al. 1987b).

Der Effekt der gesteigerten 5-HT-Freisetzung ist reversibel, nach 3-4 Tagen sinkt die extrazelluläre Konzentration an 5-HT wieder auf die Kontrollwerte ab, wie *in vivo*

mittels Mikrodialyse im Striatum und präfrontalen Cortex festgestellt werden konnte (Gudelsky und Nash 1996).

Dieser gesteigerten 5-HT-Ausschüttung folgt eine Langzeit-Entleerung. Ecstasy (hier MDMA) bewirkt eine dosisabhängige ausgedehnte regionale Reduktion der 5-HT-Spiegel in mehreren Hirn-Regionen, v.a. im Hippocampus, Striatum und Neocortex (Colado und Green 1994; Commins et al. 1987; Schmidt et al. 1991), was bereits auf seine Neurotoxizität hindeutet.

1.3.2 Dopaminerges System

Hinsichtlich der Wirkung im dopaminergen System ließ sich nachweisen, dass Ecstasy im Gehirn zu einer präsynaptischen Freisetzung von Dopamin führt (Colado und Green 1994; Gold et al. 1989; Johnson et al. 1986; Schmidt et al. 1987; Stone et al. 1986,1987b), die ebenfalls Transporter- und Calcium-abhängig ist (Mc Kenna et al. 1991; Nash und Brodtkin 1991). Die dopaminerge Komponente ist jedoch wesentlich geringer als die serotoninerge (Schechter 1989, zit. nach Thomasius et al. 1997; Wall et al. 1995). Ecstasy soll ebenfalls den Dopamin-Rücktransport hemmen (Steele et al. 1987). Es verhält sich nach Schechter in seiner Wirkung wie ein indirekter Dopamin-Rezeptoragonist (Schechter 1986, zit. nach Thomasius et al. 1997). Wahrscheinlich führt die hervorgerufene 5-HT-Freisetzung indirekt durch eine 5-HT_{2A}-Rezeptor-Stimulation zu einer Dopamin-Freisetzung (Callaway et al. 1991; Nash 1990).

Nach Stone und Mitarbeitern sollen weder MDA, MDMA noch MDEA einen Effekt auf das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der DA-Synthese, die Tyrosin-Hydroxylase (TH), haben (Stone et al. 1987). Nash und Mitarbeiter berichten allerdings über einen stimulierenden Effekt von MDMA auf die TH-Aktivität (Nash et al. 1991), der indirekt durch die vermehrte DA-Freisetzung erfolgt.

In Bezug auf die extrazelluläre Konzentration der DA-Metaboliten gibt es unterschiedliche Angaben: Nash (1990) und Colado und Green (1994) berichten von einem Absinken der 3,4- Dihydroxyphenylacetessigsäure (DOPAC) -Konzentrationen, Stone et al. (1986 und 1987b) von einem Anstieg, O'Shea et al. (2001) von einem Abfall der Homovanillinsäure (HVA)-Konzentration.

Neuere Untersuchungen lassen nach ersten Hinweisen bei Versuchen mit Mäusen (Colado et al. 2001) bzw. bei Primaten (Ricaurte et al. 2002) auch einen neurotoxischen Effekt von MDMA auf die dopaminergen Neuronen vermuten. In dieser Hinsicht wird allerdings in anderen Studien Gegenteiliges berichtet (Colado et al. 1997; Schmidt 1987; Stone et al. 1986).

1.3.3 Pharmakokinetik

Wirkungseintritt nach oraler Aufnahme ist nach ca. 30 min (10-60 min), die Effekte halten ca. 3-8 Stunden an. Der Wirkungshöhepunkt liegt bei 1-3 Stunden (Katzung und Harfst 1996). Die Halbwertszeit für MDMA liegt bei 5-10 Stunden, für MDA 3-8 Stunden. Angaben für MDEA und MBDB liegen nicht vor.

Die primäre Metabolisierung erfolgt über die Leber, wo MDMA, MDEA und MBDB zunächst durch N-Desalkylierung abgebaut werden (z.B. MDMA zu MDA). Der weitere Abbau erfolgt durch eine O-Desalkylierung (z.B. Öffnung des Methylenedioxyringes zum Dihydroxy-Metabolit), Desamination und/oder Konjugation (Lim und Foltz 1988). Der größte Anteil (z.B. fast 65 % des MDMA) wird aber unverändert über den Urin ausgeschieden (Gill et al. 2002).

Laut einer Studie von De-la-Torre und Kollegen an Menschen soll MDMA einer nicht-linearen Kinetik folgen, was dazu führt, dass es bei höheren MDMA-Dosen zu einer Akkumulation der Substanz kommen kann (De-la-Torre et al. 2000).

Vergleicht man die Substanzen MDA, MDMA und MBDB, so haben sie bei der [³H]-5-HT-Freisetzung einen gleichen Effekt (im µM-Bereich) und es besteht keine signifikante Stereoselektivität (Johnson et al. 1986). Andere Quellen berichten von einer Spezifität für die serotonineren Nervenendigungen in der Reihenfolge: MDA > MDMA > MDEA > MBDB (Schmoltdt 1999).

In Bezug auf die [³H]-DA-Freisetzung-Potenz scheinen allerdings große Differenzen zu bestehen: MDA ist potenter als MDMA; MBDB bewirkt einigen Untersuchungen zufolge keine Freisetzung von DA (Callaway et al. 1991; Johnson et al. 1986). Johnson et al. (1989) stellten fest, dass MDEA einen geringeren Effekt auf das dopaminerge System hat als MDMA und MDA, zum gleichen Ergebnis kamen

O’Loinsigh et al. (2001). Nach Ricaurte et al. (1987) hat MDEA allerdings keinen Effekt auf die DA-Freisetzung bei der Ratte.

1.4 Wirkung auf den Konsumenten

Bei Ecstasy handelt es sich um eine psychotrope Substanz, die sowohl eine Amphetamin-typische sympathikomimetische Stimulation als auch eine halluzinogene Wirkung hervorruft.

Für die typische Wirkung von Ecstasy wurde eine eigenständige Gruppe neu definiert (Nichols 1986):

„Entactogene“

1. griechisch: en = innen; gen = verursachen, erzeugen

2. lateinisch: tactus = berührt

→ „ Im Inneren ein Gefühl erzeugend“

1.4.1 Positiv erlebte psychotrope Akuteffekte

Die akute Wirkung beruht auf einer Aktivierung des mesocorticolimbischen Systems („Belohnungs-System“) und vermittelt eine subjektive Wahrnehmung von Empathie (Fähigkeit, sich anderen verbunden zu fühlen), erhöhter Kommunikations- und Kontaktbereitschaft, erhöhter Emotionalität, verminderter Ich-Abgrenzung, verbesserter Introspektionsfähigkeit, herabgesetzter Aggressivität, Glück, Euphorie, seelischer Ausgeglichenheit, milder Ekstase, intensiverer visueller Wahrnehmung, verändertes Zeitgefühl, Stimulation, erhöhter Energie, Bewegungsdrang und Antriebssteigerung (Thomasius und Jarchow 1997).

1.4.2 Negativ erlebte psychotrope Akuteffekte

Nach Abklingen der erwünschten Wirkungen oder auch parallel dazu können folgende unerwünschte Wirkungen auftreten: Konzentrationsstörungen, Antriebslosigkeit, Misstrauen, Angst, Depression, Appetitverlust, visuelle Halluzinationen, auditorische und visuelle Wahrnehmungsstörungen, motorische Unruhe. Die Schwere der Nebenwirkungen scheint dosisabhängig zu sein (Obrocki et al. 2001; Thomasius et al. 1997).

Es entsteht eine psychische, aber keine physische Abhängigkeit. Eine Toleranzentstehung ist möglich (Henry 1992), weshalb häufig zyklische Benutzungsmuster eingehalten werden, durch die einer schnellen Zunahme der unerwünschten Wirkungen und der ebenfalls raschen Toleranzwirkung entgegengesteuert werden kann (Peroutka et al. 1988).

Aufgrund der Verarmung an Neurotransmittern in den Nervenendigungen kommt es nach Einnahme von Ecstasy zur so genannten Tachyphylaxie, wodurch eine spätere Einnahme weiterer Tabletten keine neuen Rauschzustände, sondern nur eine Verstärkung der Nebenwirkungen zur Folge hat.

1.5 Toxikologische Aspekte

Nach dem Konsum von Ecstasy kann es zu schweren internistischen Komplikationen kommen: Vor allem die Trias Hyperthermie, Rhabdomyolyse, DIC (disseminated intravascular coagulopathy) hat in der Vergangenheit bereits zu zahlreichen Todesfällen geführt. Die Hyperthermie als Ausdruck des „Serotonin-Syndroms“ ist als wahrscheinlich häufigste Nebenwirkung allerdings keine oder keine primäre Folge der körperlichen Betätigung, da sie auch in Ruhe auftritt (Iwersen und Schmoldt 1996). Die Pharmakologie der Hyperthermie konnte bisher nicht vollständig geklärt werden (Mechan et al. 2000). Sie scheint deutlich zur unten beschriebenen Neurotoxizität beizutragen (Colado et al. 1999a; Malberg et al. 1996; Yuan et al. 2002). Die Rhabdomyolyse und die intravasale Gerinnung mit konsekutiver Nierenschädigung werden als Folgen der Hyperthermie angesehen (Schmoldt 1999). Außerdem wurden akutes Nierenversagen, Hepatotoxizität, z.T. mit fulminantem Leberversagen, Kollaps (meist nach körperlicher Betätigung über die Belastungsgrenzen hinaus) und Krämpfe in der Fachliteratur beschrieben (Henry et al. 1992).

Konkrete toxikologische Daten liegen nur wenige vor:

LD₅₀ (Ratte, i.p.) MDA = 27mg/kg KG; LD₅₀ (Ratte, i.p.) MDMA = 49mg/kg KG;
LD₅₀ (Ratte, i.p.) MBDB = 95mg/kg KG.

Hunde und Affen scheinen empfindlicher zu sein: LD₅₀ (i.p.) MDA = 6-7mg/kg KG (Hardman et al. zit. nach Hegadoren et al. 1999).

1.5.1 Vegetative Effekte

Vor allem die Freisetzung der Katecholamine führt zu zahlreichen z.T. schwerwiegenden Nebenwirkungen und Komplikationen. Es wurde berichtet über: Appetitlosigkeit, Mundtrockenheit, Schlaflosigkeit, Trismus, Bruxismus, Schwitzen, heiße oder kalte Flushs, Gangunsicherheiten, Hyperreflexie, Tremor, Harndrang, Mydriasis, Augenrollen, Konzentrationsstörungen, Parästhesien, Übelkeit, Erbrechen, Ataxie, Muskelschmerzen oder -steife, Hypertension, Tachykardie (bis hin zum Herzkreislaufversagen), Schlaganfälle, Herzinfarkte (Gill et al. 2001; Henry et al. 1992; Steele 1994; Thomasius et al. 1997).

1.5.2 Neurologische Komplikationen

Schwerwiegende zentralnervöse Komplikationen nach Ecstasy-Konsum sind beschrieben: Cerebrale Krampfanfälle, Hirninfarkt, intrakranielle Blutungen, Subarachnoidal-Blutungen, cerebrale Sinusvenenthrombose (Thomasius und Jarchow 1997).

1.5.3 Langzeitschäden

Eine weitere große Gefahr des Missbrauchs liegt in den potentiellen psychiatrischen Folgeerkrankungen. Über nachstehende Komplikationen wurde in der Literatur berichtet: Halluzinationen, Insomnie, Panikstörungen, Paranoide Psychose, Atypische Psychose, Depressives Syndrom, Depersonalisationssyndrom, remittierende und anhaltende paranoide Syndrome (Thomasius und Jarchow 1997, Vaiva et al. 2002). Über „Flashbacks“ wurde ebenfalls in der Literatur berichtet (Übersicht bei Green et al. 1995).

Diese Erkrankungen können - neben prädisponierenden Persönlichkeitsmerkmalen - bereits als Beweis für neurotoxische Folgeerscheinungen des Ecstasy-Konsums gewertet werden (Morgan 2000; Obrocki et al. 2001).

Trotz dieser deutlichen Hinweise für ihre Neurotoxizität sind manche Autoren immer noch davon überzeugt, dass MDMA und MDA als sichere psychotherapeutische Mittel mit guten psycholytischen Eigenschaften eingesetzt werden könnten (Pentney 2001)!

Als besonders problematisch anzusehen ist, dass das Risiko für anhaltende Schäden von den Konsumenten unterschätzt wird. Schwere Zwischenfälle, zum Teil mit letalem Ausgang, können bereits nach der erstmaligen Einnahme von Ecstasy auftreten, aber auch eine vorherige Erfahrung mit der Droge stellt keine Garantie für ihre Sicherheit dar.

Die akuten toxischen Wirkungen sind dosisunabhängig und individuell verschieden. Der erwünschte „therapeutische“ Effekt kann also bereits im toxischen Bereich liegen.

1.6 Neurotoxizität

Ecstasy ist ein selektives Neurotoxin für 5-HT-Nervenendigungen im Gehirn. Es produziert einen Abfall der 5-HT-Gehalte und dessen Hauptmetaboliten 5-HIAA (Ricaurte et al. 1988b), eine Reduktion der Dichte der „5-HT-uptake-sites“ und einen Abfall der Tryptophan-Hydroxylase-Aktivität (Chatterjee und Anderson 1993; Schmidt und Taylor 1987,1990; Schmidt et al. 1991; Stone et al. 1987a, b; Yang et al. 1997).

MDMA bewirkt bereits nach einzelnen Dosen eine morphologische Zerstörung der serotonergen Nervenendigungen (Rudnick & Wall 1992a), die sich in einem Langzeit-Verlust vor allem der feinen serotonergen Axon-Terminals in verschiedenen Arealen des Gehirns zeigt (O’Hearn et al. 1988; Ricaurte et al. 1988c). Vor allem in den Gebieten peripherer Verzweigung der Axone (Hippocampus, Striatum, frontaler Cortex) ist die Schädigung besonders ausgeprägt, Gebieten also, die von serotonergen Nerven ausgehen, deren Zellkörper in den rostralen Anteilen der dorsalen Raphe liegen (Stone et al. 1988). Die Zellkörper selbst werden bei Ratten nicht geschädigt (Johnson et al. 1991), bei Primaten dagegen konnte auch eine Schädigung der Zellkörper beobachtet werden (Ricaurte und McCann 1992; Ricaurte et al.1988c).

Diese Degeneration der feinen axonalen Strukturen konnte sowohl histologisch (Commins et al. 1987; Johnson et al. 1992; Molliver et al. 1990; O’Hearn et al. 1988; Slikker et al 1988) als auch biochemisch (u.a. Battaglia et al.1987; Schmidt 1987) nachgewiesen werden. Sie äußert sich in einem starken Konzentrationsabfall von 5-HT und seines Metaboliten 5-HIAA, was im Gehirn von Nagetieren und nicht-humanen

Primaten nach einzelner oder mehrfacher Dosis untersucht wurde (Commins et al. 1987; McKenna und Peroutka 1990; O'Shea et al. 1998; Ricaurte et al. 1988c,1992; Schmidt 1987; Stone et al 1986), und einer Reduktion in der Dichte der „5-HT-uptake-sites“, die durch Markierung mit [3H]Paroxetin bestimmt werden konnte (Battaglia et al. 1987, 1988; Colado et al. 1995; Commins et al. 1987; Hewitt und Green 1994; Marcusson et al. 1988; Molliver et al 1990; Nash et al. 1991; O'Hearn et al. 1988; Schmidt 1987; Schmidt und Taylor 1987, 1988; Sprague und Nichols 1995a; Stone et al. 1986, 1987a,b).

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten eine mögliche Reversibilität der Schädigung mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen, die z.T. vom Dosierungsregime, aber vor allem von der untersuchten Spezies abhingen. Battaglia et al. (1988) fanden bei Ratten nach einem Jahr eine vollständige Recovery (Wiederherstellung) der „5-HT-uptake-sites“ im Cortex. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Ricaurte und Kollegen in ihrer Studie an Ratten (Ricaurte et al. 1988c). Auch Scanzello et al. (1993) konnten bei fast allen untersuchten Ratten eine vollständige Reinnervation belegen.

Bei Affen lag dagegen nach 60 Monaten immer noch ein deutlicher Verlust von „5-HT-uptake-sites“ und eine verminderte 5-HT- und 5-HIAA-Konzentration im Gehirn vor (Hatzimitriou et al. 1999; Insel et al. 1989 zit. nach Hegadoren et al. 1999; Ricaurte et al. 1992). Ricaurte et al. kommen zu dem Schluss, dass Primaten ca. 8 mal empfindlicher auf Ecstasy reagieren und im Gegensatz zu Ratten nicht in der Lage sind, Axon-Schädigungen zu beheben (Ricaurte et al. 1988c). Die Ergebnisse von Slikker et al. (1988) unterstützen diese Feststellung. Mäuse sollen gegenüber dem neurotoxischen Potential des Ecstasy noch unempfindlicher als Ratten sein (Battaglia et al. 1988).

Wie Hatzimitriou et al. in ihrer Arbeit an Affen zeigen konnten, blieben diese neurologischen Degenerationen über mehr als 7 Jahre bestehen, wobei sie allerdings, abhängig von ihrer Lokalisation, im Vergleich zur Schädigung nach 18 Monaten leicht vermindert waren (Hatzimitriou et al. 1999). Vorübergehend kann auch in einigen Arealen eine ungerichtete Hyperregeneration beobachtet werden, vor allem in solchen, die nahe zu den Zellkörpern liegen.

Im Gegensatz zu anderen Autoren, die das neurotoxische Geschehen in die „akute Phase“, die bis zu 24h oder länger andauern kann, und die „long-term“-Phase unterteilen, die 12 Monate oder länger dauert (u.a. McKenna und Peroutka 1990), teilen Molliver und Kollegen die Neurotoxizität in vier Phasen ein (Molliver et al. 1990):

1. Vorübergehende Transmitter-Freisetzung und Entleerung der Speicher.
2. Irreversible Axon-Degeneration 24-48 h nach Gabe der Substanz.
3. Regionale Denervation, die für Wochen bis Monate persistieren kann.
4. Langsam voranschreitende partielle Regeneration über ein oder mehrere Jahre.

Die Toxizität ist nicht abhängig von der Applikationsform: Finnegan et al. (1988) konnten zeigen, dass die Effekte auf die 5-HT-Konzentration bei Ratten sowohl nach s.c. als auch nach oraler Gabe auftraten. Slikker und Kollegen konnten ebenfalls eine neurotoxische Wirkung bereits nach oraler Gabe von Ecstasy feststellen (Slikker et al. 1988). Ricaurte et al. (1988a) wiesen nach, dass beim Primaten dieselbe Dosis oral gegeben zwar nur noch halb so wirksam ist wie nach s.c.-Gabe, aber noch deutliche Effekte auf den Neurotransmitterhaushalt hat.

Bekanntermaßen sind in Tierversuchen gewonnene Ergebnisse nicht immer auf den Menschen übertragbar. Mehrere Arbeiten konnten jedoch zeigen, dass humane Neuronen ebenfalls durch Ecstasy geschädigt werden.

Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Untersuchungen an Langzeit-Ecstasy-Konsumenten, die Ricaurte et al. und die Arbeitsgruppe um McCann durchgeführt haben, lassen auf eine Neurotoxizität auch bei Menschen schließen (McCann et al. 1998; Ricaurte et al. 2000a). Zum gleichen Ergebnis kommen McCann et al., die die Cerebrospinalflüssigkeit von Ecstasy-Konsumenten untersuchten (McCann et al. 1994). Ricaurte et al. (2000b) legten mit Hilfe eines Interspezies-Scaling-Prinzips dar, dass die an Affen untersuchten Dosen im Bereich der bei Ecstasy-Usern üblichen Dosen liegen.

In der Arbeit von Valerie Curran werden die Probleme der Studien am Menschen sehr ausführlich diskutiert. Aber auch sie spricht von einer großen Gefahr für die Volksgesundheit infolge der Neurotoxizität (Curran 2000).

Fast alle zitierten Untersuchungen wurden mit MDMA durchgeführt. Studien mit MDEA (Colado et al. 1999b; Ricaurte et al. 1987; Series und Molliver 1994; Stone et al. 1987a), MDA (Ricaurte et al. 1985) oder MBDB (Callaway et al. 1991) belegen, dass diese Substanzen ebenfalls neurotoxisch wirken, wobei MDEA weniger stark toxisch sein soll als MDMA und MDA (Johnson et al. 1987; Johnson et al. 1989; Ricaurte et al. 1987; Series und Molliver 1994).

Der Pathomechanismus der Neurodegeneration konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden.

2 Fragestellung

2.1 Neurotoxizität – in der Literatur diskutierte Pathomechanismen

Zur Erklärung der Neurotoxizität wurden zahlreiche Hypothesen aufgestellt, von denen im Folgenden die wesentlichen vier hervorgehoben werden:

- Ein peripher oder zentral (Colado et al. 1999d; Johnson et al. 1991, 1992) gebildeter reaktiver Metabolit des MDMA soll in die serotoninergen Nervenendigungen gelangen und dort neurotoxisch wirken, evtl. durch Bildung freier Radikale (Chu et al. 1996; Esteban et al. 2001; Miller et al. 1997; Sanchez et al. 2001; Schmidt 1987; Schmidt und Taylor 1988; Zhao et al. 1992).

Gegen diese Hypothese spricht eine Arbeit von McCann und Ricaurte, in der Metaboliten von MDA direkt eingesetzt wurden und keine Neurotoxizität beobachtet werden konnte (McCann und Ricaurte 1991).

- Toxische Serotonin-Metabolite sollen im Gehirn gebildet werden: Das Serotonin könnte zu 5,6-Dihydroxytryptamin (5,6-DHT) oder 5,7-Dihydroxytryptamin (5,7-DHT) (Berger et al. 1992, zit. nach Sprague und Nichols 1995b; Malberg et al. 1996) oder 5,5-dihydroxy-4,4'-bitryptamin (Commins et al. 1987, zit. nach Colado und Green 1995; Wrona et al. 1992) oxidiert werden.

Hiergegen ist die Arbeit von Yang et al. (1997) anzuführen, die die Bildung von 6-DHT widerlegen konnte, und die Arbeit von Sprague und Mitarbeitern, die einen protektiven Effekt der Serotonin-Precursoren 5-Hydroxytryptophan und Tryptophan beweisen konnten, was der Neurotoxizität von Serotonin widerspricht (Sprague et al. 1994).

- Ein Anstieg von Hydroxyl-Radikalen im Hirn sei entscheidend (Colado und Green 1995; Colado et al. 1999c).

Diese Hypothese wird durch Untersuchungen gestützt, die mithilfe von Mikrodialyse zeigen konnten, dass nach systemischer Applikation von MDMA in den Dialysaten des Striatums und des Hippocampus die Bildung von 2,3-Dihydroxybenzoesäure (2,3-DHBA) aus Salicylaten anstieg, was auf eine hohe Konzentration an freien Radikalen schließen lässt (Colado et al. 1995; Shankaran et al. 1999a). Diese Radikale könnten möglicherweise aus dem Metabolismus des MDMA resultieren (Colado et al. 1995).

Weitere Untersuchungen stützen die These, dass oxidativer Stress eine Rolle in diesem Geschehen spielt. So konnte gezeigt werden, dass der Hydroxyl-Radikalfänger alpha-Phenyl-N-tert-butyl-nitron (PBN) neuroprotektiv wirkt (Colado und Green 1995) und die Neurotoxizität durch systemische Gabe von L-Cystein verhindert werden kann (Nash et al. 1990; Stone et al. 1988). Transgene Mäuse, die die [CuZn] Superoxid-Dismutase überexprimieren, sind resistent gegenüber der neurotoxischen Wirkung des MDMA (Cadet et al. 1995).

- Dopamin soll eine Schlüsselrolle bei der Neurotoxizität von Ecstasy einnehmen. Dies vermuten andere Autoren, die sich in ihren Studien mit der Pharmakologie des MDMA und möglichen neuroprotektiven Agenzien beschäftigten und unter anderem den Dopamin-Antagonisten Haloperidol einsetzten (Hewitt und Green 1994; Nash et al. 1990; Schmidt et al 1990b; Stone et al. 1988).

Die Arbeiten von Colado et al. (1999d) und Schmidt et al. (1991), die eine Verstärkung der MDMA-induzierten Neurodegeneration durch den Dopamin-Precursor L-DOPA beweisen konnten, unterstützen diese Annahme, ebenso die Arbeit von Sprague und Nichols (1995a), die eine Neuroprotektion durch Verminderung der Dopamin-Konzentration im Gehirn durch den MAO-B-Inhibitor L-Deprenyl feststellten und eine Schlüsselrolle der MAO-B im Pathomechanismus vermuten, wie auch Fornai et al. (2001).

Auch Stone et al. (1988) gehen von einer wichtigen Rolle der hohen Dopamin-Konzentrationen nach MDMA-Exposition aus: In ihren Untersuchungen konnten die Langzeit-Verluste sowohl durch einen Dopamin-uptake-Inhibitor als auch einen Tyrosin-Hydroxylase-Inhibitor abgeschwächt werden. Rudnick und Wall kamen in ihrer Arbeit, in der ein Dopamin-uptake-Inhibitor und nicht-neurotoxische Metaboliten des MDMA eingesetzt wurden, ebenfalls zu dem Schluss, dass Dopamin eine Rolle im neurotoxischen Geschehen spielen könnte (Rudnick und Wall 1993). Nash und Nichols konnten eine lineare Korrelation der Neurotoxizität mit dem akuten Anstieg der extrazellulären Dopamin-Konzentration belegen (Nash und Nichols 1991). Gronier und Jeanningros (1995) gelang es, die Neurotoxizität durch Hemmung der dopaminergen Systems zu verhindern.

Untersuchungen des Einflusses eines Inhibitors des Dopamin-Synthese-Enzyms TH, α -Methyl-p-tyrosin (AMPT), konnten zeigen, dass die Hemmung der Dopaminsynthese eine Verminderung bzw. Verhinderung der Serotonin-Depletion zur Folge hatte (Schmidt et al. 1985; Stone et al. 1988).

Auf welche Art und Weise Dopamin letztlich neurotoxisch wirkt ist unklar. Nash (1990) vermutet, dass Dopamin in die serotonineren Nerven-Terminals gelangen kann und dort der Autoxidation unterliegt. Dies könnte dann zur Bildung von H_2O_2 oder des toxischen Metaboliten 6-Hydroxydopamin und damit zur Zerstörung der neuronalen Zellmembranen führen (Stone et al. 1988). Schmidt und Lovenberg (1985) vermuten ebenfalls die Bildung eines toxischen Metaboliten des Dopamins in den serotonineren Neuronen.

Dem selektiven Serotonin-Transporter kommt erwiesener Maßen eine große Bedeutung sowohl bei den akuten als auch bei den Langzeit-Effekten des MDMA zu, indem er z.B. für die Aufnahme auch des Dopamins verantwortlich sein könnte. Die gleichzeitige Gabe eines Serotonin-Reuptake-Inhibitors wie Fluoxetin, Fluvoxamin oder Citalopram zusammen mit MDMA kann sowohl die Neurotoxizität (Battaglia et al. 1988; Malberg et al. 1996; Sanchez et al. 2001; Schmidt 1987; Schmidt und Taylor 1987; Schmidt et al. 1991) als auch den akuten Anstieg der Hydroxyl-Radikale (Shankaran et al. 1999b) verhindern.

Der Anstieg an freien Radikalen trat nur bei intakten serotoninerger Nervenendigungen auf, was darauf schließen lässt, dass diese reaktiven Spezies in den serotoninerger Nervenendigungen gebildet werden (Colado et al. 1997).

2.2 Ziel der Arbeit

Angesichts dieser Hinweise sollte eine Hypothese gefunden werden, die diese Ergebnisse schlüssig in sich vereinen kann.

Folgender Pathomechanismus ist zu vermuten:

Nach Gabe von MDMA wird Serotonin aus den Speichervesikeln und dem Cytoplasma ausgeschüttet. Das Serotonin verbleibt extrazellulär im synaptischen Spalt, da der Reuptake durch MDMA inhibiert ist. Somit verarmen die Nervenendigungen an Serotonin. Nun kann das Dopamin, das ebenfalls durch MDMA ausgeschüttet wird, in die entleerten Axon-Terminals gelangen. Dort wird es durch die Monoaminoxidase-B desaminiert, wodurch Wasserstoffperoxid entsteht. H_2O_2 ist eine cytotoxische Komponente, die unter normalen Umständen schnell durch protektive Hirn-Enzyme (z.B. Katalase, Glutathion-Peroxidase) inaktiviert wird. Ist dieser H_2O_2 -Entstehungs-Prozess aber sehr extensiv, sind die reduktiven Kapazitäten des Neurons überlastet. So könnte es zu einer Lipoperoxidation der Membranen kommen, die eine selektive Degeneration der Serotonin-Axon-Terminals zur Folge hat (Sprague und Nichols 1995b).

Diese Hypothese wird durch weitere Studien gestützt: So wurde festgestellt, dass MDMA die Lipidoxidation im Gehirn erhöht (Colado et al. 1997b; Sprague und Nichols 1995b).

Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die hier vorgestellte Hypothese zum Pathomechanismus plausibel ist.

Folgende zwei Hauptfragen sollten geklärt werden:

1. Kann Dopamin in die serotoninergeren Nervenendigungen gelangen?
2. Entstehen in den Axonterminals durch den Abbau des Dopamins reaktive Sauerstoffspezies?

Da in den meisten Studien nur MDMA als Leitsubstanz der Ecstasy-Gruppe eingesetzt wurde und es keine Untersuchungen gibt, die die vier Ecstasy Substanzen MDMA, MDA, MDEA und MBDB direkt miteinander vergleichen, sollen im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich die kinetischen Konstanten dieser Stoffe bestimmt werden. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob - wie in manchen Arbeiten angedeutet - Differenzen in der Toxizität der einzelnen Vertreter bestehen.

Amphetamin und Methamphetamin wurden mit einbezogen, um mögliche Unterschiede zwischen den Entactogenen und den Weckaminen aufzudecken.

2.3 Vorgehensweise

Zur Klärung dieser Fragen wurden folgende Teilaufgaben bearbeitet:

- Entwicklung eines geeigneten Modells zur Untersuchung der serotoninergeren Nervenendigungen.
- Erstellung einer Kinetik der Serotonin-Aufnahme über den membranständigen selektiven Serotonin-Transporter (SERT).
- Untersuchung, ob Dopamin ebenfalls über den Serotonin-Transporter aufgenommen werden kann. Bestimmung der kinetischen Konstanten.
- Überprüfung einer möglichen Aufnahme von Ecstasy über den Serotonin-Transporter. Messung der Aufnahme-Kinetik.
- Analyse des Effektes der Ecstasy-Substanzen auf den SERT. Erstellung einer Hemmkinetik, Vergleich der sechs Substanzen.
- Untersuchung der Aufnahme von Serotonin, Dopamin und MDMA über den Amin-Transporter der Speichervesikel.

- Die Monoaminoxidase-B: Hat Ecstasy einen Einfluss auf ihre Aktivität? Bestimmung der Hemmkinetiken für MDMA, MDA, MDEA, MBDB, AMPH und METH.
- Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies durch den oxidativen Abbau von Dopamin durch MAO-B. Welchen Einfluss haben die Ecstasy-Substanzen?

3 Methoden

3.1 Vorbereitung der Thrombozyten

3.1.1 Gewinnung der Thrombozyten-Konzentrate

Die Thrombozyten-Konzentrate (TK1) werden in der Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Abteilung für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg, aus frischem Spender-Vollblut mittels fraktionierter Zentrifugation gewonnen. Die Thrombozyten (Tbz) sind in Citratpuffer suspendiert und werden in Composelect®-Beuteln (Fresenius Hemocare, Bad Homburg, Deutschland) bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken gelagert. Bis Ende des Jahres 2000 waren diese Konzentrate als Arzneimittel zugelassen (Zul.Nr.:10574a/96-(1-4)), seit Anfang 2001 werden sie nur noch als Arzneimittel-Zwischenstufe hergestellt. Die Konzentrate werden nur bis 5 Tage nach der Herstellung verwendet und danach verworfen, wobei die Spezifikationen mindestens über 7 Tage erfüllt werden.

Am Tag 6 nach der Gewinnung konnten die nicht verbrauchten Konzentrate für diese Untersuchungen genutzt werden. Die Konzentrate wurden bei Raumtemperatur (RT) auf einer Schüttelapparatur bis zum Gebrauch gelagert. Sie wurden nur am ersten Tag nach dem Verfall (6. Tag nach Isolierung) verwendet, um Schwankungen, die durch längere Lagerung entstehen könnten und eine direkte Vergleichbarkeit erschweren, weitgehend auszuschließen.

3.1.2 Vorbereitung der intakten Thrombozyten

Jeweils 1 ml des Tbz-Konzentrates wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und zentrifugiert (2 min, $6000 \times \text{min}^{-1}$, RT). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet vorsichtig mit Transportpuffer bei Raumtemperatur resuspendiert. Die suspendierten Blutplättchen wurden gepoolt, gezählt, anschließend mit Transportpuffer auf die gewünschte Thrombozytenzahl/ μl eingestellt und nochmals gezählt.

3.1.3 Herstellung des Thrombozyten-Lysates

Um die Monoaminoxidase der Tbz anzureichern, wurden vier Konzentrate gepoolt und jeweils 12 ml in einem Sarstedt-Röhrchen zentrifugiert (5 min, $3500 \times \text{min}^{-1}$, RT). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit H_2O dest. lysiert, homogenisiert und nochmals zentrifugiert. Nach Abtrennung und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet (Lysat) bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Vor einem Versuch wurde das Tbz-Lysat aufgetaut, mit Puffer resuspendiert und die Protein-Konzentration eingestellt.

3.1.4 Bestimmung der Thrombozytenzahl

Die Anzahl der Tbz wurde mittels eines Durchflusszytometers (AVIDA; Firma Bayer, München) im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg, bestimmt.

3.1.5 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) mit dem Bioquant® Protein Kit (Merck, Darmstadt) ermittelt. Die Eichgeraden (0,1-1,0 mg Protein/ml) wurden mit Rinder-Gammaglobulin in dem jeweils verwendeten Puffer erstellt.

3.2 Aufnahme über den selektiven Serotonin-Transporter

3.2.1 Aufnahme von Serotonin

3.2.1.1 Vorbereitungen

Filterplatten:

Die Millipore Filterplatten wurden vorbereitet, indem die nicht benötigten Reihen mit der dafür vorgesehenen Klebefolie (Millipore, Schwalbach) abgeklebt wurden. Die verwendeten Wells wurden vor Versuchsbeginn zwei Mal mit $100 \mu\text{l}$ Stopplösung gewaschen.

Stopplösung:

Lithiumchlorid 0,65 %, in H_2O dest., ca. 4°C ; Osmolarität: 288 mOsmol.

Transportpuffer:

NaCl 66 mmol/L, Na₂HPO₄ 25 mmol/L, KCl 6 mmol/L, Glucose 6 mmol/L, MgSO₄ 1 mmol/L; pH 6,7 (eingestellt mit H₃PO₄ (70 %) und KOH (1 mol/L)).

Stammlösungen:

Alle Stammlösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Transportpuffer in einer Konzentration von 1 mg/ml angesetzt und bei -20°C gelagert. Sie wurden bei Bedarf täglich frisch mit Transportpuffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Verdünnung der Tritium-markierten Serotonin-Lösung:

Die Lösung wurde, wenn nicht anders vermerkt, so mit Transportpuffer verdünnt, dass in 5 µl ca. 3,7 kBq (ca. 100.000 cpm) enthalten waren.

Inkubationslösung:

Die Inkubationslösung enthielt 1 Teil Serotonin (Endkonzentration je nach Fragestellung 0,1-0,8 µmol/L), 1 Teil [³H]Serotonin (100.000 cpm) und 2 Teile Agens oder Puffer.

3.2.1.2 Durchführung

100 µl Tbz-Suspension wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß im Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schütteln 5 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl Inkubationslösung gestartet. Nach der Inkubationszeit wurden 100 µl des Ansatzes in 400 µl eiskalter Lithiumchlorid-Lösung gestoppt. Sofort wurden 400 µl entnommen, in ein Well einer Millipore Filterplatte gegeben und schnell unter Vakuum abgesaugt (Dauer max. 30 sec). Die Filter wurden zweimal mit 100 µl LiCl-Stopplösung gewaschen. Anschließend wurden sie mindestens 1 h bei RT getrocknet, in Zinsser Minivials (Zinsser, Frankfurt/Main) gestanzt und mit 3 ml Szintillationscocktail (Aquasafe 300 plus; Zinsser, Frankfurt/Main) versetzt. Die Vials wurden kurz geschüttelt und 5-12 h im β-Counter äquilibriert. Danach wurde die Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler 2 min gemessen.

Es wurden Dreifach-Bestimmungen mit jeweils drei verschiedenen Tbz-Chargen durchgeführt.

3.2.1.3 Bestimmung der unspezifischen Bindung

Die unspezifische Bindung des Serotonins (5-HT) an die Tbz wurde mit drei Methoden bestimmt:

1. Inkubation der Tbz in Natrium-Ionen-freiem Medium:

Hierzu wurde in allen eingesetzten Lösungen der Transportpuffer durch Natrium-Ionen-freien Puffer ersetzt.

Zusammensetzung des Na⁺-freien Puffers: LiCl 66 mmol/L, K₂HPO₄ 25 mmol/L, KCl 6 mmol/L, Glucose 6 mmol/L, MgSO₄ 1 mmol/L, pH 6,7 (mit H₃PO₄ (70 %) und KOH (1mol/L) eingestellt).

Inkubationslösung: 1 Teil 5-HT (Endkonzentration 0,1-0,8 µmol/L), 1 Teil [³H]5-HT (ca. 100.000 cpm/5 µl), 2 Teile Natrium-Ionen-freier Puffer.

2. Inkubation mit einem hohen Überschuss an „kaltem“ 5-HT:

Inkubationslösung: 1 Teil 5-HT (Endkonzentration 0,1-0,8 µmol/L), 1 Teil [³H]5-HT (ca. 100.000 cpm/5 µl), 2 Teile 5-HT (Endkonz.: 0,1 mg/ml).

3. Zugabe des selektiven Serotonin-Reuptake-Inhibitors (SSRI) Paroxetin:

Inkubationslösung: 1 Teil 5-HT (Endkonzentration 0,1- 0,8 µmol/L), 1 Teil [³H]5-HT (ca. 100.000 cpm/5 µl), 2 Teile Paroxetin (Endkonz.: 20 nmol/L).

3.2.1.4 Zeitverlauf des 5-HT-Transportes

Es wurde ein x-faches des Ansatzes in ein Sarstedt-Röhrchen vorgegeben und 5 min im Wasserbad vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge Inkubationslösung gestartet und im Wasserbad weiter inkubiert. Zu bestimmten Zeiten wurden jeweils 100 µl des Ansatzes entnommen und wie unter 2.2.1.2 weiterbehandelt. Der Zeitverlauf wurde über 25 min gemessen, die eingesetzte 5-HT-Konzentration betrug 0,8 µmol/L.

3.2.1.5 Bestimmung kinetischer Konstanten

Zur Charakterisierung der Aufnahme-Kinetik wurden die Michaelis-Menten Konstante (K_m) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) bestimmt. Hierzu wurden verschiedene 5-HT-Konzentrationen wie angegeben eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 1 min. Die Versuche wurden mit drei verschiedenen Tbz-Chargen als Dreifach-Bestimmungen durchgeführt. Die unspezifische Bindung wurde durch Zugabe von Paroxetin bestimmt. Die Ermittlung der Konstanten erfolgte graphisch aus dem Lineweaver-Burk-Plot.

3.2.2 Aufnahme von Dopamin

3.2.2.1 Vorbereitungen

Um zu überprüfen, ob Dopamin (DA) ebenfalls in die Tbz aufgenommen wird, konnte die gleiche Versuchsanordnung wie für die Bestimmung der 5-HT-Aufnahme gewählt werden (siehe 3.2.1).

Allerdings wurde die DA-Stammlösung anders angesetzt und die [^3H]DA-Lösung anders verdünnt:

Ansetzen der DA-Stammlösung:

Es wurde eine Lösung mit 10 mg/ml DA in Essigsäure 0,2 N : Ethanol im Verhältnis 9:1 angesetzt und bei -20°C gelagert.

Verdünnung der Tritium-markierten DA-Lösung:

Die Lösung wurden so verdünnt, dass in 5 μl ca. 7,4 kBq (ca. 200.000 cpm) enthalten waren.

3.2.2.2 Durchführung

Die Versuche wurden, wie unter 3.2.1.2 beschrieben, durchgeführt.

Die Inkubationslösung war wie folgt zusammengesetzt: 1 Teil DA (Endkonzentrationen: 0,1- 1,6 $\mu\text{mol/L}$), 1 Teil [^3H]DA (200.000 cpm/5 μl), 2 Teile Transport-Puffer (v/v).

3.2.2.3 Unspezifische Bindung

Die unspezifische Bindung wurde, wie unter 3.2.1.3 beschrieben, bestimmt.

Inkubationslösungen:

1. Inkubation der Tbz in Natrium-Ionen-freiem Medium:
1 Teil DA (Endkonzentration 0,1- 1,6 $\mu\text{mol/L}$), 1 Teil [^3H]DA (ca. 200.000 cpm/5 μl), 2 Teile Natrium-Ionen-freier Puffer.
2. Inkubation mit einem hohen Überschuss an „kaltem“ DA:
1 Teil DA (Endkonzentration 0,1-1,6 $\mu\text{mol/L}$), 1 Teil [^3H]DA (ca. 200.000 cpm/5 μl), 2 Teile DA (Endkonzentration: 0,1 mg/ml).
3. Zugabe des SSRI Paroxetin:
1 Teil DA (Endkonzentration 0,1-1,6 $\mu\text{mol/L}$), 1 Teil [^3H]DA (ca. 200.000 cpm/5 μl), 2 Teile Paroxetin (Endkonzentration: 20 nmol/L).

3.2.2.4 Zeitverlauf des Dopamin-Transportes

Dieser Versuch wurde, wie unter 3.2.1.4 dargestellt, durchgeführt. Die eingesetzte DA-Konzentration betrug 0,8 $\mu\text{mol/L}$, die Aufnahme wurde über 20 min gemessen.

3.2.2.5 Bestimmung kinetischer Konstanten

Zur Untersuchung der Aufnahme-Kinetik wurden die Michaelis-Menten Konstante (K_m) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) bestimmt. Hierzu wurden DA-Konzentrationen von 0,1 - 1,6 $\mu\text{mol/L}$ eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 2 min. Die Versuche wurden mit drei verschiedenen Tbz-Chargen als Dreifach-Bestimmungen durchgeführt. Die unspezifische Bindung wurde durch Zugabe von Paroxetin bestimmt. Die Ermittlung der Konstanten erfolgte graphisch aus dem Lineweaver-Burk-Plot.

3.2.3 Aufnahme von MDMA

3.2.3.1 Vorbereitungen

Um eine mögliche MDMA-Aufnahme in die Tbz zu untersuchen, wurde die gleiche Versuchsanordnung wie für die Bestimmung der 5-HT-Aufnahme gewählt (siehe 3.2.1).

Verdünnung der Tritium-markierten MDMA-Lösung:

Die Lösung wurden so verdünnt, dass in 5 μl ca. 7,4 kBq (ca. 200.000 cpm) enthalten waren.

3.2.3.2 Durchführung

Die Versuche wurden, wie unter 3.2.1.2 beschrieben, durchgeführt.

Die Inkubationslösung war wie folgt zusammengesetzt: 1 Teil MDMA (Endkonzentrationen: 0,2 – 1,6 $\mu\text{mol/L}$), 1 Teil [^3H]MDMA (200.000 cpm/5 μl), 2 Teile Puffer (v/v).

3.2.3.3 Unspezifische Bindung

Die unspezifische Bindung wurde, wie unter 3.2.1.3 beschrieben, bestimmt.

Inkubationslösungen:

1. Inkubation der Tbz in Natrium-Ionen-freiem Medium:
1 Teil MDMA (Endkonzentration 0,2 - 1,6 $\mu\text{mol/L}$), 1 Teil [^3H]MDMA (ca. 200.000 cpm/5 μl), 2 Teile Natrium-Ionen-freier Puffer.
2. Inkubation mit einem hohen Überschuss an „kaltem“ MDMA:
1 Teil MDMA (Endkonzentration 0,2 -1,6 $\mu\text{mol/L}$), 1 Teil [^3H]MDMA (ca. 200.000 cpm/ 5 μl), 2 Teile MDMA (Endkonzentration: 0,1 mg/ml).
3. Zugabe des SSRI Paroxetin:
1 Teil MDMA (Endkonzentration 0,2 -1,6 $\mu\text{mol/L}$), 1 Teil [^3H]MDMA (ca. 200.000 cpm/5 μl), 2 Teile Paroxetin (Endkonzentration: 20 nmol/L).

3.2.3.4 Zeitverlauf des MDMA-Transportes

Dieser Versuch wurde, wie unter 3.2.1.4 dargestellt, durchgeführt. Die eingesetzte MDMA-Konzentration betrug 0,5 $\mu\text{mol/L}$, der Zeitverlauf wurde über 3 min gemessen.

3.2.3.5 Bestimmung der kinetischen Konstanten

Zur Charakterisierung der Aufnahme-Kinetik wurden die Michaelis-Menten Konstante (K_m) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) bestimmt. Hierzu wurden

MDMA-Konzentrationen von 0,2 bis 1,6 $\mu\text{mol/L}$ eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 30 sec. Die Versuche wurden mit drei verschiedenen Tbz-Chargen als Dreifach-Bestimmungen durchgeführt. Die unspezifische Bindung wurde durch Zugabe von Paroxetin bestimmt. Die Ermittlung der Konstanten erfolgte graphisch aus dem Lineweaver-Burk-Plot.

3.3 Hemmung der Aufnahme in die Thrombozyten

3.3.1 Hemmung der Serotonin-Aufnahme

Der Einfluss möglicher Inhibitoren auf den Transport von 5-HT über den SERT wurde mit der gleichen Versuchsanordnung wie auch für die 5-HT-Aufnahme-Kinetik (3.2.1.5) untersucht.

Folgende mögliche Inhibitoren wurden eingesetzt:

| | | | |
|------|------|----------------|---------|
| MDMA | MDEA | Amphetamin | Dopamin |
| MDA | MBDB | Methamphetamin | |

Die zu untersuchenden Inhibitoren wurden in den Endkonzentrationen 2, 10 oder 20 $\mu\text{mol/L}$ in die Inkubationslösung gegeben, so dass sie gleichzeitig mit dem 5-HT auf die Tbz einwirken konnten. Die K_i -Werte (Inhibitor-Konzentration, die die ohne Inhibitor gemessene Reaktionsgeschwindigkeit halbiert) wurden graphisch aus Dixon-Plots ermittelt.

Inkubationslösung:

1 Teil 5-HT (Endkonzentrationen 0,2; 0,4; 0,8 $\mu\text{mol/L}$), 1 Teil [^3H]5-HT (ca. 100.000 cpm/5 μl), 1 Teil Inhibitor, 1 Teil Puffer (v/v).

Inkubationslösung zur Bestimmung der unspezifischen Bindung:

1 Teil 5-HT (Endkonzentration 0,2; 0,4; 0,8 $\mu\text{mol/L}$), 1 Teil [^3H]5-HT (ca. 100.000 cpm/5 μl), 1 Teil Inhibitor, 1 Teil Paroxetin (Endkonzentration: 20 nmol/L).

Die Inkubationszeit betrug 1 min.

3.3.2 Hemmung der Dopamin-Aufnahme

Die Hemmung des DA-Transportes über den Serotonin-Transporter durch 5-HT und MDMA wurde bestimmt. Der Versuch wurde, wie unter 3.3.1 beschrieben, durchgeführt. Allerdings wurden die eingesetzten Konzentrationen, die Inkubationszeit und die radioaktive Markierung pro Probe verändert.

Inkubationslösung:

1 Teil DA (Endkonzentration 0,2 und 0,8 $\mu\text{mol/L}$), 1 Teil [^3H]DA (ca. 200.000 cpm/ 5 μl), 1 Teil Inhibitor, 1 Teil Puffer (v/v).

Inkubationslösung zur Bestimmung der unspezifischen Bindung:

1 Teil DA (Endkonzentration 0,2 und 0,8 $\mu\text{mol/L}$), 1 Teil [^3H]DA (ca. 200.000 cpm/ 5 μl), 1 Teil Inhibitor, 1 Teil Paroxetin (Endkonzentration: 20 nmol/ml).

Die Inkubationszeit betrug 2 min.

3.4 Aufnahme über den Vesikel-Transporter

Um den Transport in die Speichervesikel zu untersuchen, wurden die Tbz mit Reserpin vorbehandelt, das selektiv den Vesikel-Transporter hemmt.

3.4.1 Vorbereitung

Die Reserpin-Stammlösung wurde in 1 Teil Essigsäure 5 % gelöst und mit 6 Teilen DMSO 7 % verdünnt, so dass die Stammlösung einen Gehalt von 8 mg/ml erreichte. Sie wurde bei -20°C gelagert, erst kurz vor Gebrauch aufgetaut und auf die gewünschte Konzentration mit Transportpuffer verdünnt, um ein Ausfallen des Reserpins zu verhindern.

Das Lösungsmittel ohne Reserpin wurde als Blindwert eingesetzt, um eine mögliche Beeinflussung der Tbz auszuschließen.

3.4.1.1 Bestimmung der Reserpin-Konzentration mittels HPLC

HPLC-Ausrüstung:

Die Chromatographie-Ausrüstung bestand aus einer BioRad Pumpe Modell 1350, einem Rheodyne 7125 Probeninjektor, einem Pulsdämpfer, einem Fluoreszenz-Detektor (Firma Shimadzu) und einem SpectroMonitor D.

Chromatographische Bedingungen:

| | |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|
| Säule: | LiChrospher RP-18, 4,6 mm x 75 mm, 5 µm Partikelgröße |
| Vorsäule: | LiChrospher RP-18 |
| Probenvolumen: | 20 µl |
| Eluent: | 90 % H ₂ O, 10 % Methanol, 0,1 % Eisessig, pH 4,4 |
| Flussrate: | 1,0 ml/min |
| Detektor: | Fluoreszenzdetektor: Exc 280 nm, Em 360 nm |
| Sensitivität: | 3 (low) |
| Retentionszeit: | 5,4 min |
| Analysenzeit: | 10 min |
| Integration: | Integration der Peakflächen |

Eichkurve:

Die zu untersuchenden Proben wurden mit Fließmittel verdünnt, eine Eichkurve wurde mit 0,1-1,0 µg/ml Reserpin in Ethanol erstellt.

3.4.2 Aufnahme von Serotonin in die Vesikel

80 µl Tbz-Suspension wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt. Es wurden 20 µl Reserpin (Endkonzentration: 70 µmol/L) oder 20 µl Reserpin-Lösungsmittel zugegeben und die Ansätze im Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schütteln 10 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl Inkubationslösung gestartet, die 1 Teil 5-HT (0,6 µmol/L), 1 Teil [³H]5-HT (100.000 cpm/5 µl) und 2 Teile Puffer enthielt (v/v). Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden 2 Teile Puffer durch Paroxetin (Endkonzentration 20 nmol/L) ersetzt.

Nach der Inkubationszeit von 15 min wurden 100 µl des Ansatzes in 400 µl eiskalter Lithiumchlorid-Lösung gestoppt und weiter, wie unter 3.2.1 beschrieben, verfahren.

3.4.2.1 Hemmung der 5-HT Aufnahme in die Speichervesikel

Der Einfluss folgender Substanzen auf die 5-HT-Aufnahme über den Vesikel-Transporter wurde überprüft:

| | | |
|------|------|----------------|
| MDMA | MDEA | Amphetamin |
| MDA | MBDB | Methamphetamin |

Hierzu wurden im Reaktionsansatz 1 Teil Puffer durch 1 Teil Inhibitor ersetzt.

Die Inkubationslösung war wie folgt zusammengesetzt:

1 Teil 5-HT, 1 Teil [³H]5-HT, 1 Teil Inhibitor, 1 Teil Puffer (v/v).

Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 10 µmol/L eingesetzt, zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde 1 Teil Puffer durch 1 Teil Paroxetin (Endkonzentration 20 nmol/L) ersetzt.

3.4.3 Aufnahme von Dopamin in die Vesikel

Der Transport von DA in die Speichervesikel wurde analog zum 5-HT-Transport untersucht (siehe 3.4.2). DA wurde in einer Konzentration von 0,2 – 1,6 µmol/L eingesetzt, die Verdünnung für [³H]DA wurde so gewählt, dass 5 µl ca. 200.000 cpm entsprachen. Die Inkubationslösungen wurden dementsprechend hergestellt.

3.4.4 Aufnahme von MDMA in die Vesikel

Der Versuch wurde wie für 5-HT und DA (3.4.2; 3.4.3) durchgeführt. Die Konzentration von MDMA betrug 2 µmol/L, von [³H]MDMA ca. 200.000 cpm/ 5 µl.

3.5 Bestimmung der MAO-B-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität der Monoaminoxidase-B (MAO-B) wurde mit Tbz-Lysat durchgeführt, in dem das Enzym angereichert worden war.

3.5.1 Vorbereitung

Puffer:

KH_2PO_4 0,5 mol/L, pH 7,4 (mit H_3PO_4 (70 %) eingestellt)

Enzympräparation:

Das Tbz-Lysat (siehe 3.1.3) wurde aufgetaut, mit 8 ml Puffer resuspendiert und homogenisiert. Die Proteinmenge wurde bestimmt und mit Puffer auf 0,6 mg/ml eingestellt.

Stammlösungen:

Die Stammlösungen für Kynuramin und die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 10 mg/ml in H_2O dest. angesetzt und bei -20°C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurden sie aufgetaut und mit H_2O verdünnt.

3.5.2 Durchführung

Jeweils 1 ml Tbz-Lysat wurde in 7 ml Zentrifugenröhrchen vorgegeben. Es wurden 0,5 ml Kaliumphosphatpuffer und 1 ml H_2O oder Inhibitor-Lösung hinzugefügt. Der Ansatz wurde bei 37°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln 5 min vorinkubiert. Durch Zugabe der Kynuramin-Lösung (Endkonzentration 20-100 $\mu\text{mol/L}$) wurde die Reaktion gestartet, nach der Inkubationszeit wurde mit 2 ml eiskalter Trichloressigsäure (TCA) 10 % (w/v) gestoppt und die Proben zentrifugiert (5 min, $3500 \times \text{min}^{-1}$, RT). 1 ml Überstand wurde mit 2 ml Natronlauge (1 mol/L) versetzt und fluorimetrisch die gebildete Menge 4-HOQ bestimmt (Exc 315nm, Em 380nm). Zur Bestimmung der Leerwerte wurde den Ansätzen der selektive MAO-B-Inhibitor L-Deprenyl zugesetzt (Endkonzentration 0,1 $\mu\text{mol/L}$).

3.5.2.1 Kinetik

Um die kinetischen Konstanten zu bestimmen, wurden unterschiedliche Substrat-Mengen eingesetzt: Die Kynuramin-Konzentrationen betragen 20, 40, 60, 80 und 100 $\mu\text{mol/L}$, die Inkubationszeit betrug 15 min. Weiter wurden die Ansätze, wie unter Durchführung (3.5.2) beschrieben, behandelt. Die Werte wurden als Lineweaver-Burk-

Diagramm aufgetragen und der K_m -Wert und V_{max} direkt aus der graphischen Darstellung ermittelt.

3.5.2.2 Zeitverlauf

Mehrere Proben wurden nach der Vorinkubation mit der gleichen Konzentration an Substrat versetzt und bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden in 5-Minuten-Abständen gestoppt, so dass der zeitliche Verlauf des Kynuramin-Abbaus bis 30 min bestimmt werden konnte.

3.5.2.3 Hemmung

Um einen Einfluss möglicher Inhibitoren auf die Aktivität der MAO-B zu untersuchen, wurden diese in einer Konzentration von jeweils 0,08 mmol/L und 0,16 mmol/L zum Tbz-Lysat gegeben und bei 37°C im Wasserbad 30 min vorinkubiert. Anschließend wurde Kynuramin in einer Konzentration von 20 bzw. 40 µmol/L zum Ansatz gegeben und weitere 15 min inkubiert. Weiter wurde wie unter 3.5.2 verfahren.

Folgende Inhibitoren wurden auf ihr Hemmpotential überprüft:

| | | | |
|------|------|----------------|-----------|
| MDMA | MDEA | Amphetamin | Dopamin |
| MDA | MBDB | Methamphetamin | Serotonin |

Es wurden jeweils Dreifach-Bestimmungen mit drei verschiedenen Tbz-Präparationen durchgeführt und die Werte als Dixon-Plot aufgetragen, wodurch ein direktes Ablesen der K_i -Werte möglich war.

3.5.2.4 Reversibilität

Der Frage, ob die Hemmung der MAO-B-Aktivität reversibel ist, wurde mit folgender, nach Scorza (1997) modifizierten, Versuchsdurchführung nachgegangen:

Die Tbz-Lysate wurden, wie unter 3.5.2.3 beschrieben, mit den Inhibitor-Lösungen 30 min inkubiert. Danach wurde eine Hälfte der Proben durch dreimaliges Zentrifugieren und Resuspendieren des Pellets mit Puffer gewaschen. Da die Proteinmenge durch das Waschen um ca. 25 % abnimmt und um mögliche Störfaktoren durch den Waschvorgang mit zu berücksichtigen, wurden als Vergleichsproben Tbz-

Zubereitungen eingesetzt, die bereits vor der Inkubation gewaschen worden waren. Nach dem Waschen wurde Kynuramin zugegeben und, wie unter 3.5.2 beschrieben, weiter verfahren.

3.6 Bestimmung des nativen Serotoningehaltes in Thrombozyten

3.6.1 HPLC-Ausrüstung

Die HPLC Anlage bestand aus einer BioRad Pumpe Modell 1350, einem Rheodyne 7125 Probeninjektor, einem Pulsdämpfer, einem elektrochemischen Detektor (Modell 1340c, BioRad) und einem SpectroMonitor D.

3.6.2 Chromatographische Bedingungen

| | |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------|
| Säule: | LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 4,6 mm x 250 mm, 5µm Partikelgröße |
| Vorsäule: | LiChrospher 100 RP-18 endcapped |
| Probenvolumen: | 20 µl |
| Eluent: | 88 % H ₂ O dest., 12 % Methanol, pH 2,5 (mit Phosphorsäure) |
| Flussrate: | 1,0 ml/min |
| EC-Detektor: | angelegte Spannung: 0,8 V Empfindlichkeit: 2 nA/V Attenuation: 6 |
| Retentionszeit: | 8,8 min |
| Analysenzeit: | 15 min |
| Integration: | Integration der Peakflächen |

3.6.3 Eichkurve

Die Eichkurve wurde mit 5-HT in Konzentrationen von 1-10 µmol/L hergestellt.

3.6.4 Durchführung

Zehn Tbz-Konzentrate wurden auf ihren nativen 5-HT-Gehalt untersucht. Hierzu wurde zunächst die Thrombozytenzahl der Proben bestimmt, anschließend jeweils 990 µl eines Konzentrates in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und die Proben

zentrifugiert (2 min, $4000 \times \text{min}^{-1}$, RT). Der Überstand wurde verworfen und die Tbz-Pellets zum Lysieren bei -20°C eingefroren.

Zur Messung der 5-HT-Konzentration wurden die Ansätze aufgetaut, mit H_2O auf $990 \mu\text{l}$ ergänzt, mit $10 \mu\text{l}$ Perchlorsäure (HClO_4) 70 % versetzt, geschüttelt und zentrifugiert. Der klare Überstand konnte direkt eingespritzt werden. Die Proben waren im Kühlschrank zwei Tage stabil, bei RT verminderte sich der 5-HT-Gehalt um ca. 6 % innerhalb von 8 h.

3.7 Untersuchung der Membran-Integrität

Die Integrität der Tbz-Membranen wurde mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kit (LDH) der Firma Roche-Diagnostics, Basel (CH), untersucht.

3.7.1 Durchführung

Die Tbz wurden, wie unter 3.1.2 beschrieben, vorbereitet und gezählt. Anschließend wurde die Suspension mit Transportpuffer auf ca. 80×10^3 Tbz/ μl verdünnt. $100 \mu\text{l}$ der Tbz-Verdünnung oder Puffer wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt, $100 \mu\text{l}$ Agens ($0,01 - 100 \mu\text{g/ml}$) zugegeben und die Ansätze 15 min bei 37°C im Wasserbad leicht geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Proben zentrifugiert (10 min, $14000 \times \text{min}^{-1}$, RT) und $100 \mu\text{l}$ des Überstandes in die Wells einer Mikrotiterplatte überführt. Nach Zugabe von je $100 \mu\text{l}$ der frisch hergestellten Reaktionslösung wurde 30 min im Dunkeln inkubiert und danach die Absorption bei 490 nm in einem ELISA Reader gemessen.

Als Kontrollen wurden bei jedem Versuch folgende Ansätze mitbestimmt:

1. Background-Kontrolle: Statt Tbz wurde Puffer eingesetzt. Dieser Wert wurde von allen anderen Werten abgezogen.
2. Substanz-Kontrolle: Die Testsubstanzen in der am höchsten verwendeten Konzentration wurden zu $100 \mu\text{l}$ Puffer gegeben, um etwaige Interferenzen mit dem Test Kit zu überprüfen.
3. Low-Kontrolle: Statt eines Agens wurde den Tbz Puffer zugesetzt (entspricht der spontanen Freisetzung von LDH aus den Tbz).

4. High-Kontrolle: Den Tbz wurde Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1 % zugesetzt. Hierdurch wurden alle Zellen zerstört und ein vollständiger Austritt der LDH erfolgte.

Die Differenz zwischen der Low- und der High-Kontrolle ist die maximal mögliche Freisetzung an Lactat-Dehydrogenase und wurde gleich 100 % gesetzt.

Alle Versuche wurden mit drei verschiedenen Tbz-Chargen als Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

Auswertung:

$$\text{Cytotoxizität [\%]} = \frac{\text{Absorption Probe} - \text{Low-Kontrolle}}{\text{High-Kontrolle} - \text{Low-Kontrolle}} \times 100$$

3.8 Bestimmung von H₂O₂

3.8.1 Vorbereitung

Puffer:

KH₂PO₃-Puffer 0,5 mol/L, pH 7,4 (eingestellt mit Phosphorsäure 70 %).

Enzympräparation:

Das Tbz-Lysat (siehe 3.1.3) wurde aufgetaut, mit 0,25 ml Puffer resuspendiert und homogenisiert. Die Proteinmenge wurde gemessen und mit Puffer auf 6 mg/ml eingestellt. Zur Bestimmung der Proteinmenge musste der Ansatz 1:10 verdünnt werden, da die Werte sonst außerhalb des linearen Bereiches lagen.

Eichreihe:

Zur Erstellung der Eichreihe wurde die Wasserstoffperoxid-Lösung 30 % zuerst auf ihren tatsächlichen H₂O₂-Gehalt überprüft (siehe 3.8.1.1), auf 0,001-2,0 nmol/Ansatz verdünnt und weiter wie die Proben behandelt.

Amplex®:

Die Stammlösung wurde mit 10 mg/ml in DMSO angesetzt und bei -20°C gelagert. Kurz vor der Verwendung wurde sie aufgetaut und mit Puffer verdünnt, die Endkonzentration betrug 25 nmol/Ansatz, entsprechend 50 nmol/ml.

HR-Peroxidase:

Eine Stammlösung mit einem Gehalt von 1 Einheit (U) HRP (Horseradish Peroxidase) pro ml wurde in H₂O dest. hergestellt und bei -20°C aufbewahrt. Sie wurde in einer Endkonzentration von 0,1 U/ml eingesetzt.

3.8.1.1 Bestimmung der H₂O₂-Konzentration der Stammlösung

Da die Konzentration der handelsüblichen Wasserstoffperoxid-Lösungen nur mit ca. 30 % angegeben wird und H₂O₂ eine sehr labile Verbindung darstellt, war es nötig, vor Erstellung einer Eichgeraden den genauen Gehalt an Wasserstoffperoxid zu bestimmen. Hierzu wurde die Stammlösung 1:1000 verdünnt und anschließend photometrisch bei 230 nm vermessen.

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes und des Extinktionskoeffizienten (E) $81 \times \text{cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}$ (Mohanty et al. 1997) wurde der tatsächliche Gehalt berechnet.

3.8.2 Durchführung

In ein 7 ml-Zentrifugenröhrchen wurden 200 µl Enzympräparation vorgelegt. Hierzu wurden 100 µl Puffer, 50 µl Amplex® (Endkonzentration: 50 µmol/L), 50 µl HRP (Endkonzentration.: 0,1 U/ml) pipettiert. Der Ansatz wurde 10 min bei 37°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln vorinkubiert. Anschließend wurden 100 µl Puffer, Agens oder der MAO-B-Inhibitor L-Deprenyl (0,1 µmol/L) zur Bestimmung des Blindwertes zugefügt und weitere 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Aceton gestoppt und die Proben 5 min bei $3500 \times \text{min}^{-1}$ (RT) zentrifugiert. 500 µl des Überstandes wurden mit 1 ml H₂O dest. 1:3 verdünnt und die Fluoreszenz bestimmt, indem 1 ml direkt in den Detektor (mittlere Empfindlichkeit, Exc 590 nm, Em 645 nm) eingespritzt wurden. Die Menge des entstandenen H₂O₂ wurde anhand der Eichkurve berechnet, wobei die Blindwerte vorher abgezogen wurden.

4 Material

4.1 Chemikalien

Alle Substanzen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit der höchsten im Handel befindlichen Reinheit verwendet.

4.1.1 Reagenzien

| | Firma |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| (+/-) Amphetamin-Sulfat | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Amplex® Red reagent | Molecular Probes, USA, über MoBiTec, Göttingen |
| D-Glucose | Merck, Darmstadt |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Dopamin (Dihydroxyphenylethylamin) | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| [³ H]-Dopamin (250 µCi/250 µl) | NEN Life-Science Products, Deutschland |
| EDTA (Titriplex III) | Merck, Darmstadt |
| HOQ-4 (4-Hydroxyquinolin) | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| KOH 1 mol/L | Merck, Darmstadt |
| Kynuramin-Dihydrobromid | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Lithiumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Magnesiumsulfat | Merck, Darmstadt |
| (+/-) MBDB-Hydrochlorid | LKA, Hamburg |
| (+/-) MDA-Hydrochlorid | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| (+/-) MDEA-Hydrochlorid | LKA, Hamburg |
| (+/-) MDMA-Hydrochlorid | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| [³ H]-MDMA (250 µCi/250 µl) | Sondersynthese der Firma Amersham Life Science, Deutschland |
| (+) Methamphetamin-Hydrochlorid | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| NaOH 1 mol/L | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Paroxetin-Hydrochlorid-Hemihydrat | Smith Kline Beecham, |
| Peroxidase (Horse Radish-) | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| R-Deprenyl-Hydrochlorid | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Reserpin | Fluka, Buchs (CH) |
| Rinder Gammaglobulin | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Serotonin-Creatinin-Sulfat | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| [³ H]-Serotonin-Creatinin-Sulfat (250 µCi/250 µl) | NEN Life-Science Products, Deutschland |
| Szintillationscocktail Aquasafe® 300 plus | Zinsser, Frankfurt/Main |
| Trichloressigsäure | Merck, Darmstadt |
| Wasserstoffperoxid ca. 30 % (Perhydrol®) | Merck, Darmstadt |

4.1.2 Lösungsmittel

| | Firma |
|-------------------------|---------------------------------|
| Aceton | Merck, Darmstadt |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Merck, Darmstadt |
| Essigsäure 99 % | Merck, Darmstadt |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| Perchlorsäure 70 % | Merck, Darmstadt |
| Phosphorsäure 85 % | Merck, Darmstadt |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |

4.1.3 Fertig-Tests

| | Firma |
|------------------------|-------------------------------|
| Bioquant® Protein-Test | Merck, Darmstadt |
| Cytotoxicity-Kit | Roche-Diagnostics, Basel (CH) |

4.2 Humanes Untersuchungsmaterial

| | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| Humane Thrombozyten-Konzentrate | Transfusionsmedizin, UKE, Hamburg |
|---------------------------------|-----------------------------------|

(Citrat-Puffer: 26,3g Na-Citrat,
3,27g Citronensäuremonohydrat,
25,5g Glucosemonohydrat,
2,51g Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat,
Aqua dem. ad 1000,0; pH 6,5)

4.3 Geräte

4.3.1 Verbrauchsmaterial

| | Firma |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Eppendorf Reagiergefäße | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µl) | Sarstedt, Heidelberg |
| Sarstedt Röhrchen 1,5; 5; 12 ml | Sarstedt, Heidelberg |
| Photometer-Küvetten 10x4x4, 5mm | Sarstedt, Heidelberg |
| Mikrotiterplatten | Gudenrath, Hamburg |
| Filterplatten HVPP Durapore (0,45µm) | Millipore, Schwalbach |
| Klebefolie für Filterplatten | Millipore, Schwalbach |
| Punch Tips für Filterplatten | Millipore, Schwalbach |
| 1 ml-Spritzen, Omnifix ® | Braun, Melsungen |

4.3.2 Laborgeräte

| | Firma |
|---------------------------------------|-------------------------|
| Durchflusszytometer ADVIA 120 | Bayer, München |
| Vakuumapparatur für Filterplatten | Millipore, Schwalbach |
| Multiple Punch Assembly für Filterpl. | Millipore, Schwalbach |
| Flüssigszintillationszähler: | |
| MINAXI Tricarb® | Packard, Frankfurt/Main |
| Tricarb® 2000 CA | Packard, Frankfurt/Main |

Material

HPLC-Detektoren:

| | |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Elektrochemischer Detektor Modell 1340c | BioRad, München |
| Fluoreszenzdetektor Modell RF-10AXL | Shimadzu, Duisburg |
| Integrator | Thermo Separation Products, Egelsbach |
| Minivials 2000 | Zinsser, Frankfurt/Main |
| Osmometer | Knauer, Berlin |
| pH-Meter | Knick, Berlin |
| Photometer | Varian, Darmstadt |
| Photometer | Shimadzu, Duisburg |
| Photometer für Mikroplatten EL _x 808 | Bio-Tek Instruments, Neufahrn HPLC |
| Pumpe Modell 1350 | BioRad, München |

HPLC-Säulen:

| | |
|--------------------------------------|------------------|
| LiChrospher® RP 18, 4,6x75 mm, | |
| LiChrospher® RP 18, 4,6x250 mm endc. | Merck, Darmstadt |

HPLC-Vorsäulen:

| | |
|------------------------------------|-----------------------|
| LiChrospher® RP 18, 2 cm, | |
| LiChrospher® RP 18, 2 cm endcapped | Merck, Darmstadt |
| Schüttelmaschine LS 20 | Gerhardt, Bonn |
| Stanzgerät für Filterplatten | Millipore, Schwalbach |
| Vakuumapparatur für Filterplatten | Millipore, Schwalbach |
| Vortexer | Heidolph, Schwabach |
| Wasserbad mit Schütteleinrichtung | GFL, Burgwedel |

Zentrifugen:

| | |
|---------------------------------|---------------------|
| Eppendorf Tischzentrifuge 5415C | Eppendorf, Hamburg |
| Rotanta/TC | Hettich, Tuttlingen |

5 Ergebnisse

5.1 Serotoninerge Neuronen

Serotoninerge Axon-Terminale enthalten zwei unterschiedliche Transportsysteme für Serotonin. Das erste transportiert extrazelluläres Serotonin (5-HT) aus dem synaptischen Spalt ins Cytoplasma (selektiver Serotonin-Transporter), das zweite Transportsystem cytoplasmatisches 5-HT in die Speichervesikel (Amin-Transporter). Beide transportieren 5-HT gegen ein Konzentrationsgefälle und sind deshalb energieabhängig (Rudnick und Humphreys 1992).

5.1.1 Der selektive Serotonin-Transporter

Der selektive Serotonin-Transporter (SERT) ist in die präsynaptische Membran eingelagert. Hier findet ein Co-Transport von einem Molekül 5-HT mit je einem Ion Na^+ und Cl^- im Austausch mit einem K^+ -Ion statt. Der Transport wird stimuliert durch internes Na^+ und Cl^- und externes K^+ . Der transmembranäre Ionen-Gradient (Na^+ : außen > innen; K^+ : innen > außen) wird direkt durch eine Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten, außerdem indirekt durch die Erzeugung einer transmembranären Potentialdifferenz (innen negativ geladen), wodurch zusätzlich ein Cl^- -Gradient (außen > innen) entsteht. Nach dem Einwärts-Transport des 5-HT-Moleküls und dem dadurch bedingten Auswärtstransport eines K^+ -Ions kehrt der Transporter in seine Ausgangsform zurück und kann wieder ein neues Molekül binden (K^+ kann in seiner Abwesenheit durch H^+ ersetzt werden) (Liu et al. 1999; Rudnick und Humphreys 1992; Rudnick und Wall 1992a) (Abbildung 3).

5.1.2 Der Transporter für biogene Amine

Der Transport über den vesikulären Monoamin-Transporter in die Speichervesikel ist ATP-abhängig. Hier findet ein Einwärts-Transport eines 5-HT-Moleküls im Austausch mit zwei (aber auch einem oder mehreren) H^+ -Ionen statt (Fishkes und Rudnick 1982); die treibende Kraft ist ein pH-Gradient, der durch eine H^+ -ATPase aufrechterhalten wird, so dass in den Speichervesikeln ein saurerer pH-Wert herrscht. Zusätzlich herrscht eine Potential-Differenz, bei der das Innere der Vesikel im Verhältnis zum

Cytoplasma positiv geladen ist (Rudnick und Humphreys 1992; Rudnick und Wall 1992a). Dieser Transporter ist identisch mit anderen biogenen Amin-Transportern im Organismus. Er transportiert in verschiedenen Zellen z.B. 5-HT, Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin oder Histamin in die Speichervesikel (Liu et al. 1999; Rudnick et al. 1990) (Abbildung 3).

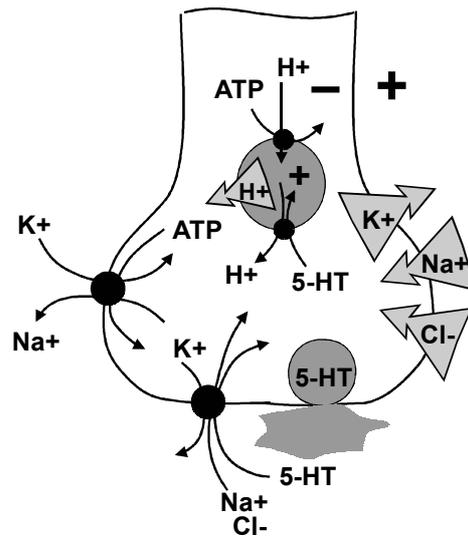


Abbildung 3 **Transporter-Systeme der Synapsen**

5.2 Methodenauswahl

Um Untersuchungen mit dem SERT und dem Vesikel-Transporter durchführen zu können, musste zunächst eine Methode und ein geeignetes Modell gewählt werden.

In vorhergehenden Arbeiten wurde z.B. mit Hirn-Homogenat (Marcusson et al. 1988), mit Synaptosomen (Schmidt und Taylor 1987; Schmidt et al. 1987) oder mit Ratten-Hirnschnitten (Johnson et al. 1986) gearbeitet.

Um mit möglichst ursprünglichem humanem Material ohne postmortale Veränderungen zu arbeiten, wurden Thrombozyten gewählt.

5.2.1 Thrombozyten als Modell

Blutplättchen sind ein anerkanntes Modell für die serotoninerger Nervenendigungen, da sie denselben 5-HT-Transporter besitzen (Gronier und Jaenningros 1995; Hawiger 1992; Launey et al. 1992; Lesch et al. 1993; Pletscher 1978; Sneddon 1973). Darüber

hinaus sind sie – wie die 5-HT-Neuronen – in der Lage das 5-HT mit Hilfe eines Vesikel-Transporters in die Speichervesikel einzulagern. In dieser Funktion gleichen die Thrombozyten (Tbz) also ebenfalls exakt den serotoninen Nervenendigungen (Chatterjee und Anderson 1993; DaPrada et al. 1988; Gronier und Jaenningros 1995; Rudnick und Humphreys 1992; Stahl 1985). Zu bedenken ist allerdings, dass nicht alle Gegebenheiten gleich sind. So findet in den Tbz z.B. keine Synthese von 5-HT statt, da ihnen die hierzu nötigen Enzyme fehlen (Huether und Schuff-Werner 1996).

In intakten Tbz arbeiten beide Transport-Systeme „in Reihe“, um 5-HT in den Speichervesikeln anzureichern. Die Akkumulationsrate wird durch das Membransystem bestimmt, wobei die endgültige Tbz-Speicherkapazität für 5-HT durch die Speicherung in den Vesikeln limitiert ist (Liu et al. 1999; Rudnick und Humphreys 1992). Die Analyse der individuellen Transportsysteme getrennt voneinander ist schwierig und hat vor allem den Nachteil, dass eine Untersuchung der beiden Transporter in zwei voneinander getrennten Systemen nicht die physiologischen Gegebenheiten widerspiegelt.

Um den *in-vivo*-Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurde in dieser Arbeit mit intakten Tbz gearbeitet. So konnten die beiden Transport-Systeme in ihrer realen Beziehung zueinander untersucht werden. Eine selektive Inhibition des Vesikel-Transporters ermöglichte eine Differenzierung der beiden Transportsysteme (siehe unter 5.5).

5.2.2 Gewinnung der Thrombozyten

Da die Herstellung von Tbz-Konzentraten sehr zeitaufwändig ist, und zu ihrer Gewinnung größere Mengen an frischem Vollblut benötigt werden, welches vorher noch nicht eingefroren oder im Kühlschrank gelagert worden sein darf (da die Tbz sonst ihre Aktivität verlieren), wurde überprüft, ob die in der Transfusionsmedizin des UKE hergestellten Tbz-Konzentrate (näheres dazu im Methodenteil 3.1.1) nach Ablauf ihrer Verwendungsfrist für Patienten noch für Transport-Versuche geeignet sind. Nach ersten Probeversuchen stellte sich heraus, dass diese Präparate genügend Aktivität für

Aufnahme-Untersuchungen besitzen. Somit konnte auf die Isolierung der Tbz im eigenen Labor (z.B. nach Rudnick et al. (1981)) verzichtet werden.

5.2.3 Waschen der Thrombozyten

Die TK1-Thrombozyten-Konzentrate der Blutbank sind in Citrat-Puffer suspendiert. Da dieses Medium keine optimalen Bedingungen für den zu untersuchenden SERT bietet und das noch z.T. enthaltene Serum ebenfalls stört, mussten die Tbz vor ihrer Verwendung für Transport-Versuche gewaschen werden. Da aufgrund ihrer großen Empfindlichkeit eine Verletzung unbedingt vermieden werden musste (Peters et al. 1992) und die Tbz durch eine Zentrifugation bei zu hohen Umdrehungen oder bei zu unvorsichtigem Resuspendieren leicht aggregieren, stellte sich nach verschiedenen Versuchen die unter 3.1.2 beschriebene Waschmethode als geeignet heraus.

Alle Arbeiten mit den Tbz wurden bei Raumtemperatur durchgeführt (Wölfel und Graefe 1991). Es musste darauf geachtet werden, dass auch der Transport-Puffer vor seiner Verwendung auf Raumtemperatur gebracht wird, da sonst die Tbz ihre Aktivität verlieren und keine Aufnahme von 5-HT mehr stattfindet.

5.3 Serotoningehalt der verwendeten Thrombozyten

In den meisten Versuchen dieser Arbeit wurden intakte Tbz von jeweils nur einem Spender verwendet. Diese haben naturgemäß interindividuell unterschiedlich große Mengen an 5-HT gespeichert, wodurch ein Einfluss auf die durchgeführten Untersuchungen zu erwarten war. Um abschätzen zu können, wie sehr diese 5-HT-Gehalte differieren, wurden die 5-HT-Mengen von zehn TK1-Konzentraten bestimmt.

5.3.1 Optimierung der HPLC-Methode

Zur quantitativen Bestimmung des 5-HT-Gehaltes wurde eine HPLC-Anlage mit angeschlossenem elektrochemischen Detektor eingesetzt (Huether und Schuff-Werner 1996; Johnson et al. 1992; Sprague et al. 1996). Nachdem die Chromatographie mit Octansulfonat als Ionenpaar (Hashiguti et al. 1993; Helander und Tottmar 1987; Sprague und Nichols 1995b) keine befriedigenden Ergebnisse erbrachte, wurde ein Laufmittel mit 12 % Methanol bei pH 3,8 mit Zusatz von 0,002 % EDTA gewählt

(modifiziert nach Aymard et al. 1994; Shihabi und Scaro 1980). Durch den Ersatz der RP-18 Säule durch eine RP-18 endcapped Säule (Merck, Darmstadt) war eine saubere Abtrennung des 5-HT von Störsubstanzen möglich. Die Erhöhung des Methanol-Anteils auf 15 % und vor allem eine Erniedrigung des pH-Wertes auf 2,3 bewirkte eine frühere Elution des 5-HT. Es eluierte bei einer Flussrate von 1 ml/min bei 8,8 min (siehe Beispielchromatogramm, Abbildung 4), die Gesamtdauer der Bestimmung konnte so auf 15 min begrenzt werden. Die Integration der Peakflächen erfolgte mit einem angeschlossenen Integrator.

Weitere Bedingungen der Chromatographie:

| | |
|--------------------------|------------|
| Referenzelektrode: | Ag/AgCl |
| Potential: | + 0,7 V |
| Signal/Noise-Ratio: | 2 |
| Probevolumen: | 20 µl |
| Bestimmungsgrenze: | 0,4 µmol/L |
| Nachweisgrenze: | 0,1 µmol/L |
| Korrelationskoeffizient: | 0,999 |

Eichkurve: 1-10 µmol/L (siehe Abbildung 5)

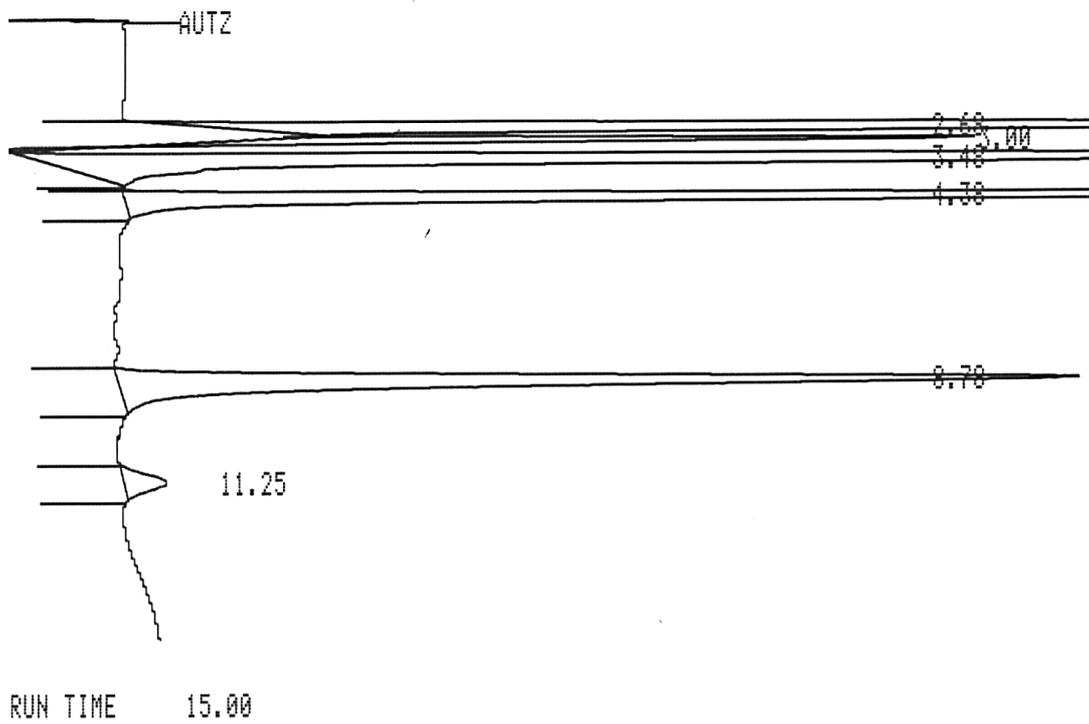


Abbildung 4 Beispielchromatogramm einer Serotonin-Bestimmung, Probe 2 (2,44 $\mu\text{mol/L}$; siehe auch Tabelle 1).

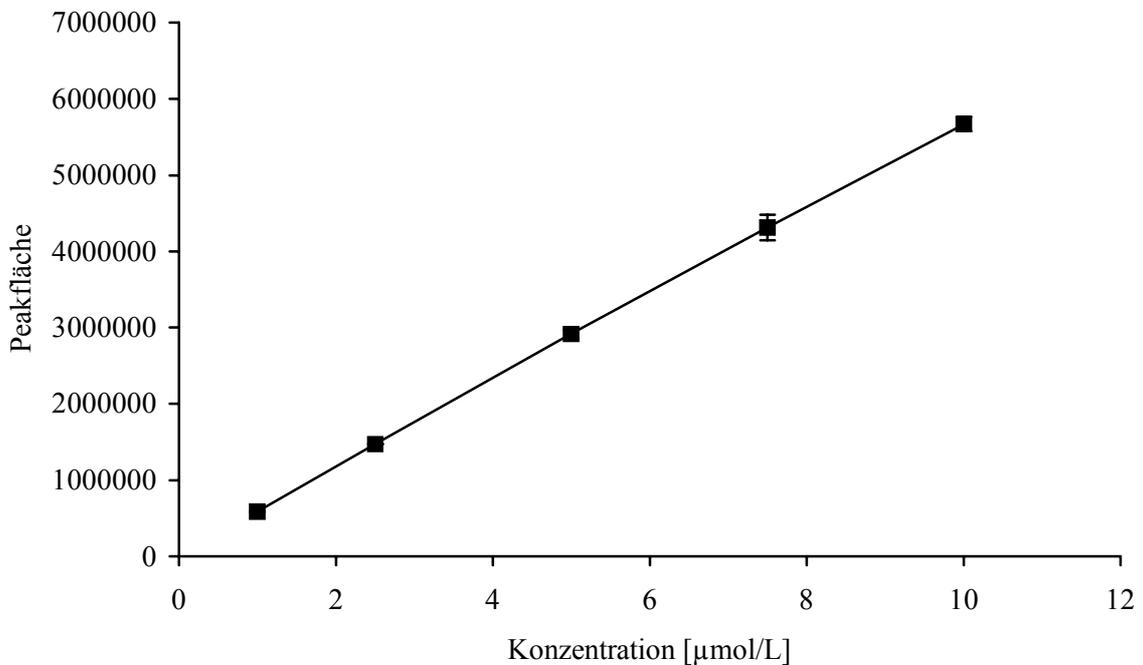


Abbildung 5 Eichkurve der Serotonin-Bestimmung mittels HPLC-EC Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei getrennten Versuchen.

5.3.1.1 Präzipitation der Thrombozyten

Vor dem Aufgeben auf die HPLC-Säule mussten die Proteine der zu untersuchenden Proben gefällt werden. Es wurden unterschiedliche Reagenzien auf ihre Brauchbarkeit überprüft:

Aceton und Acetonitril bewirkten einen sehr großen Störpeak im Chromatogramm, Methanol hatte für den verhältnismäßig hohen Protein-Anteil zu schwache Fällungskapazitäten. Eine Präzipitation mit Perchlorsäure 80 %ig, wie auch bei Aymard et al. (1994) und Pussard et al. (1996) verwendet, erwies sich als optimal. Ein Einsatz von nur 1 % der Probenmenge genügte, um nach der Zentrifugation einen klaren Überstand zu erhalten. Der pH-Wert des Überstandes betrug 1,15 und die Probe konnte ohne weitere Bearbeitung direkt auf das HPLC-System gegeben werden.

Eine Zugabe von Ascorbinsäure zur Probe, um die Oxidation des 5-HT zu verhindern, ist nur bei Vollblut aufgrund seines Oxyhämoglobin-Gehaltes notwendig (Aymard et al. 1994). Bei Tbz ist es somit nicht nötig und würde zudem auch den Nachweis per EC-Detektor stören (Pussard et al. 1996).

5.3.2 Der native 5-HT-Gehalt in humanen Thrombozyten

Die Konzentration des nativen 5-HT in den Tbz wurde auf die im Ansatz enthaltene Tbz-Anzahl bezogen. Wie auch bei Pussard et al. (1996) belegt, ist dies bei Tbz-Konzentraten, die naturgemäß schwankende Blutplättchen-Mengen aufweisen, sinnvoller, als zuvor alle Ansätze auf die gleiche Tbz-Zahl zu verdünnen (zumal die Eichkurve über einen genügend weiten Konzentrationsbereich linear verlief) oder, wie in manchen Arbeiten auch praktiziert, ihre Anzahl nicht in die Angaben mit einzubeziehen.

Der 5-HT-Gehalt der hier untersuchten Tbz-Präparationen lag zwischen 3,79 und 2,44 $\mu\text{mol/L}$, bezogen auf 1×10^{12} Tbz/L (siehe Tabelle 1).

Der Mittelwert betrug $3,02 \pm 0,45 \mu\text{mol/L}$.

Tabelle 1 Der native Serotonin-Gehalt in Thrombozyten-Konzentraten

| Tbz-Konzentrat | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| 5-HT-Gehalt [$\mu\text{mol}/10^{12} \text{ Tbz} \times \text{L}^{-1}$] | 2,70 | 2,44 | 3,03 | 3,39 | 3,13 | 3,34 | 3,79 | 2,51 | 2,57 | 3,25 |

5.4 Der selektive Serotonin-Transporter

Ziel dieses Teilabschnittes war es, die Aufnahme von 5-HT in die Tbz zu charakterisieren und den Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf diesen Transport zu untersuchen.

Des Weiteren sollte eine mögliche Aufnahme von DA und MDMA überprüft werden.

5.4.1 Auswahl der Methode und Bestimmung der Reaktionsparameter

Für die Transporter-Versuche wurden die Methoden nach Rudnick et al. (1981) und Rudnick und Humphreys (1992) eingesetzt. Der 5-HT-Transport wurde mit Hilfe von radioaktiv markiertem 5-HT und anschließender Flüssigszintillationszählung bestimmt. Die Methoden wurden in Bezug auf die Reaktionsparameter leicht modifiziert:

Inkubationsstopp

Da die Inkubationszeiten für die kinetischen Untersuchungen sehr kurz gewählt werden mussten, war es wichtig, den Transport über den selektiven Serotonin-Transporter schlagartig abubrechen.

Die in der Literatur vertretenen Methoden, wie z.B. das Stoppen durch Zentrifugation (Peters et al. 1992), durch Zugabe von Formaldehyd (Gespach et al. 1986) oder eiskalter Kochsalzlösung 0,1 mmol/L (Rudnick und Humphreys 1992) wurden für nicht geeignet angesehen, da ein Efflux des bereits aufgenommenen Substrates oder eine Schädigung der Tbz-Membranen nicht ausgeschlossen werden konnten, bzw. ein möglicher Transportschub durch den hohen Natrium-Ionen-Gehalt vermutet wurde.

Sehr gut konnte die Reaktion durch Verwendung einer Lithium-Ionen-haltigen, eiskalten Lösung beendet werden, da auf diese Weise der Natrium-Ionen-Einstrom sofort unterbrochen wird.

Trotz allem muss sofort filtriert werden, da eine Diffusion immer noch, wenn auch sehr langsam, weiter stattfinden kann. Damit das Filtrieren genügend schnell stattfinden konnte, durfte die eingesetzte Tbz-Suspension nicht mehr als $4 - 5 \times 10^5$ Tbz/ μl enthalten, da sonst die Filter überlastet waren und der Filtrationsvorgang länger als die maximal tolerierbaren 30 s gedauert hätte. Um eine simultane Bearbeitung mehrerer Proben zu ermöglichen, wurde eine 96-Well-Filterplatte der Firma Millipore eingesetzt, die den Arbeitsaufwand im Gegensatz zu einzelnen Filtrationsvorgängen, wie z.B. bei Rudnick (1977) und Rudnick et al. (1981) durchgeführt, deutlich reduziert.

Puffer

Der Puffer für die Transport-Untersuchungen muss zum einen Na^+ , K^+ und Cl^- enthalten, da der Transport an diese Ionen gekoppelt ist, zum anderen Glucose als Energiequelle, um den transmembranären Ionengradienten zu erzeugen. Als Puffer für die Transport-Versuche wurde zunächst der Transport-Puffer nach Rudnick und Humphreys (1992) (siehe bei Methoden 3.2.1) eingesetzt. Dieser erwies sich als sehr gut geeignet. Veränderungen in der Zusammensetzung (z.B. eine Erhöhung der Natrium-Ionen-Menge (Launey et al. 1992), eine Erhöhung des Kalium-Anteils (Affolter und Pletscher 1982) oder eine Zugabe von EDTA (Launey et al. 1992)) ergaben keine Vorteile.

Vorinkubation

Eine Vorinkubation im Wasserbad bei 37°C von mind. 5 min erwies sich als sehr wichtig, da der Transport ohne Äquilibration in den ersten Minuten nicht linear verläuft. Eine längere Vorinkubationszeit von 15 min wie bei Gespach et al. (1986) durchgeführt, erbrachte keine weiteren Vorteile.

5.4.2 Serotonin-Aufnahme

Die Aufnahme von 5-HT, dem nativen Substrat des SERT, wurde in mehreren Versuchen näher spezifiziert.

5.4.2.1 Unspezifische Bindung

Es sollte überprüft werden, ob der gemessene Einwärts-Transport selektiv über den Serotonin-Membran-Transporter erfolgt.

Deshalb wurden zusätzlich Proben angesetzt, in denen

- (a) Natrium-Ionen-freier Puffer verwendet wurde (Gronier und Jeanningros 1995; Rudnick und Wall 1992a; Rudnick et al. 1981),
- (b) ein Überschuss unmarkiertes Substrat (0,1 mg/ml) (Gehlert et al. 1985; Marcusson et al. 1988; Peters et al. 1992; Rudnick und Wall 1992a),
- (c) ein selektiver Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI, z.B. Fluoxetin (Sprague und Nichols 1995b) oder Paroxetin (Langer und Galzin 1988; Mellerup et al. 1983)) zugegeben wurde oder
- (d) die Reaktion bei 4°C (Gronier und Jeanningros 1995; Schmidt et a. 1987) oder 0°C (Cozzi 1999; Langer und Galzin 1988) durchgeführt wurde.

Somit war der Transport entweder mangels Natrium-Ionen nicht möglich (a), bzw. der SERT selektiv inhibiert (c), das spezifisch aufgenommene [³H]-Substrat wurde durch den Überschuss an „kaltem“ Agens verdrängt (b) oder ein aktiver Transport war aufgrund der niedrigen Temperatur nicht möglich (d).

Wenn die Aufnahme an Substrat unter Methode (a) oder (c) niedriger ist als unter normalen Versuchsbedingungen, ist dies ein Beweis dafür, dass ein Transport über den SERT erfolgt. Die Inkubation mit einem Überschuss an nicht markiertem Substrat oder bei niedrigen Temperaturen ermittelt die generelle unspezifische Bindung und lässt keine Rückschlüsse auf die Aufnahme-Art zu. Im Idealfall sollten mit allen Methoden die gleichen Bindungs-Mengen ermittelt werden.

In den ersten Versuchsreihen mit 5-HT als Substrat wurden die drei erstgenannten unspezifischen Bindungen (a,b,c) bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die 5-HT-Aufnahme-Level mit den drei verschiedenen Methoden tatsächlich auf demselben

Niveau lagen (Abb. 6). Dies beweist, dass 5-HT selektiv über den Membrantransporter aufgenommen wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den folgenden Versuchen nur noch eine der Methoden verwendet: Das Verfahren b) wurde nicht gewählt, da es nicht Transporter-spezifisch ist. Methode a) hat den Nachteil, dass jeweils zwei verschiedene Tbz-Ansätze (einmal mit Transport-Puffer, einmal mit Na⁺-freiem Puffer) hergestellt und auf dieselbe Tbz-Anzahl eingestellt werden müssen und ebenfalls alle Verdünnungen jeweils mit jedem Puffer einmal angesetzt werden müssen. Die unspezifische Bindung wurde deshalb immer nach Methode (c) durch Zugabe des selektiven Inhibitors Paroxetin zur Inkubationslösung bestimmt, da dies einer der potentesten 5-HT-uptake-Inhibitoren (Mellerup et al. 1983) und somit ein selektiver Marker für 5-HT-uptake-sites ist (Marcusson et al. 1988; Gespach et al. 1986). Die unspezifische Bindung betrug maximal 20 % der 5-HT-Gesamtaufnahme. Die spezifische Aufnahme über den Transporter ergibt sich rechnerisch aus der Differenz zwischen Gesamt-Aufnahme und unspezifischer Aufnahme.

Leerwerte wurden bestimmt, indem die Tbz-Suspension durch Transport-Puffer ersetzt wurde. Sie betragen maximal 50 % der Werte, die für die unspezifische Bindung erhalten wurden und beruhen vor allem auf einer unspezifischen Filterbindung des radioaktiven Agens.

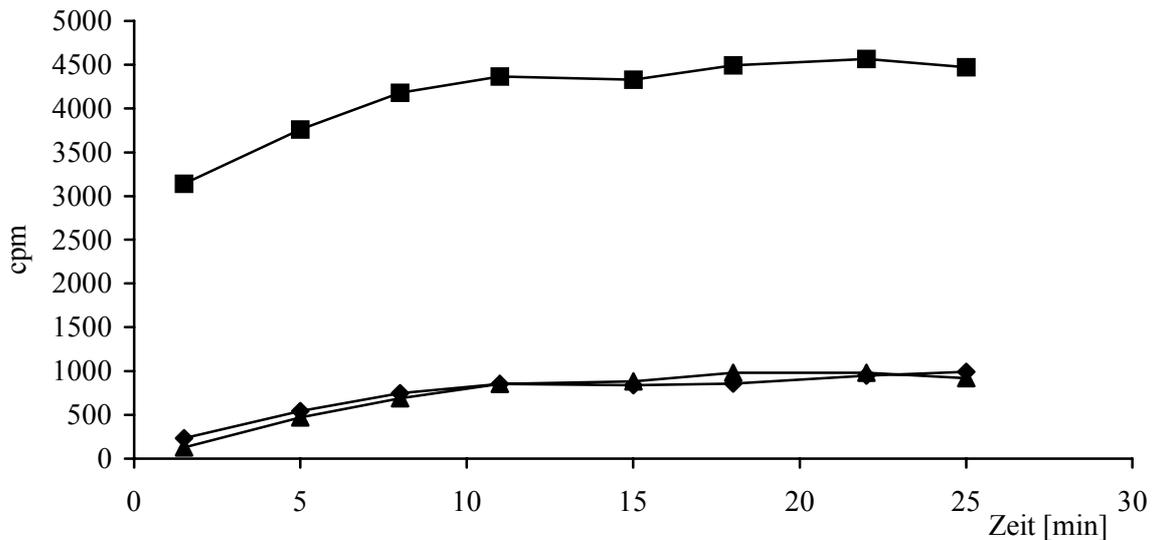


Abbildung 6 Bestimmung der unspezifischen Bindung
Durch Zugabe von Paroxetin (Rauten) oder den Einsatz eines Na⁺-freien Puffers (Dreiecke). Die Quadrate stellen die Gesamtaufnahme von 5-HT in die Tbz dar.

5.4.2.2 Zeitverlauf

Der Zeitverlauf der 5-HT-Aufnahme wurde untersucht. Der Transport erfolgt sehr schnell, verläuft bei einer Konzentration von 0,8 μM bis ca. 2 min linear und erreicht dann ein Plateau (Abb. 7).

Für weitere Untersuchungen wurde die Inkubationszeit auf 1 min festgelegt, damit sie im linearen Bereich der Aufnahme liegt. In anderen Arbeiten wurde ebenfalls eine Inkubation von 60 s (Gespach et al. 1986) oder sogar nur 15 s gewählt (Wölfel und Graefe 1991).

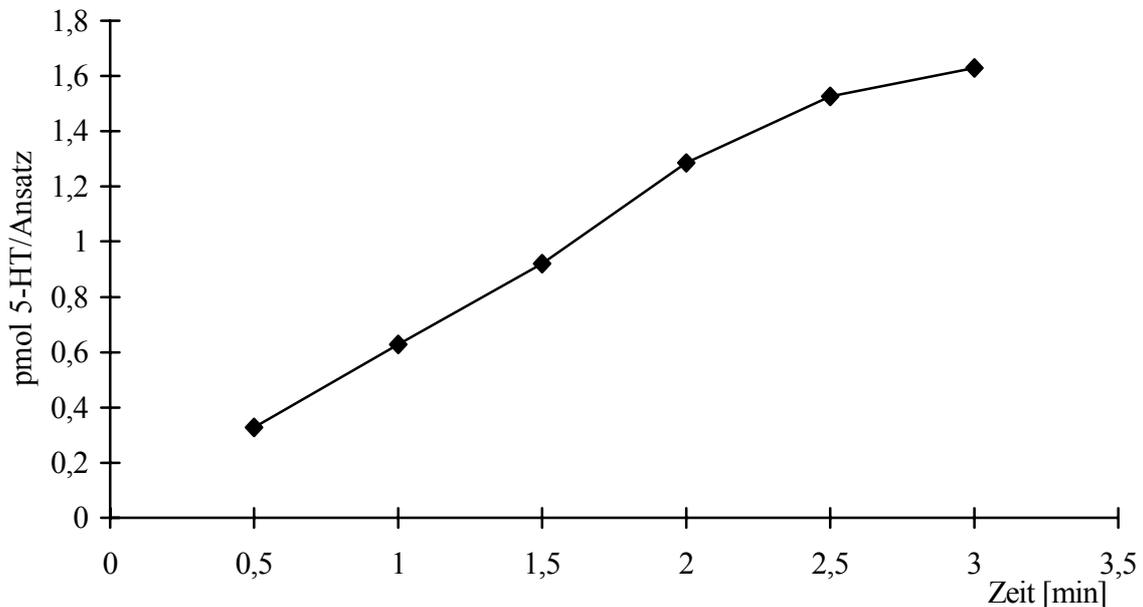


Abbildung 7 **Zeitverlauf der Serotonin-Aufnahme in die Tbz.**
Dargestellt ist exemplarisch die spezifische Aufnahme eines Einzel-Versuches. Die eingesetzte Konzentration betrug 0,8 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT, ein Ansatz entsprach 5×10^7 Tbz.

5.4.2.3 Weitere Parameter

Linearität, Zellzahl-Abhängigkeit

Die Aufnahme des 5-HT ist bis zum Erreichen eines Gleichgewichtes linear abhängig von der Inkubationszeit (siehe Abb. 7) und der eingesetzten Konzentration. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass bei der gewählten Inkubationszeit das Plateau noch nicht erreicht wurde. Ebenfalls steigt die aufgenommene 5-HT-Menge mit der eingesetzten Thrombozytenzahl. Hier erwiesen sich die Filter der verwendeten Filterplatten (Firma Millipore) als limitierender Faktor, da diese nicht überladen werden durften, um ein schnelles Absaugen zu gewährleisten.

pH-Wert

Da der pH-Wert von 6,7 nicht dem physiologischen pH-Wert entspricht, wurde überprüft, ob durch Änderungen des pH-Wertes eine Optimierung zu erreichen wäre. Eine Erniedrigung unter pH 6 schädigt die Tbz so stark, dass sie inaktiviert werden

(Berndsen 1983). Da die Aktivität des Transporters durch pH-Wert-Änderungen von 6,5 bis 7,3 nicht signifikant beeinflusst werden konnte (Abb. 8), wurde der pH gemäß der Original-Publikation bei 6,7 belassen.

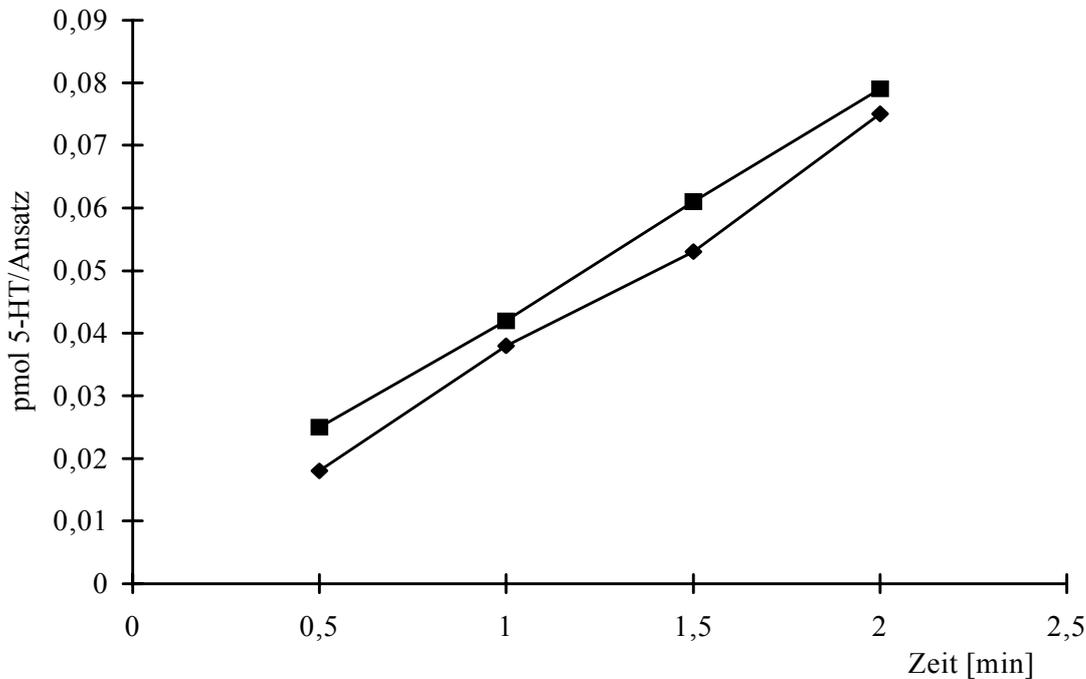


Abbildung 8 Verlauf der Serotonin-Aufnahme über den Serotonin-Transporter, exemplarisch für pH 6,7 (Rauten) und 7,1 (Quadrate) dargestellt; eingesetzt wurde $0,8 \mu\text{mol/L}$ 5-HT, ein Ansatz entsprach 5×10^7 Tbz.

Inkubationstemperatur

Der Einfluss der Inkubations-Temperatur wurde untersucht. Die Aufnahme bei niedrigeren Temperaturen findet langsamer statt als bei 37°C . Bei Temperaturen unter 30°C sank der Transport als aktiver Prozess drastisch ab.

Dies hätte den Vorteil erbracht, dass die Bearbeitung der Proben durch die daraus resultierenden längeren Inkubationszeiten einfacher gewesen wäre. Da die Bedingungen aber möglichst den physiologischen Gegebenheiten entsprechen sollten, erfolgten deshalb alle Versuche bei 37°C .

5.4.3 Kinetik

Nachdem die spezifische Aufnahme des 5-HT in die Tbz bestimmt werden konnte, sollte eine Aufnahme-Kinetik erstellt werden. Hierzu wurden mehrere 5-HT-Konzentrationen eingesetzt. Nach einigen Vorversuchen stellten sich die Konzentrationen von 0,1 bis 0,8 $\mu\text{mol/L}$ als besonders geeignet heraus. Bei niedrigeren Konzentrationen (0,05 $\mu\text{mol/L}$) kam es häufiger zu ungenauen Werten, bei 1,6 $\mu\text{mol/L}$ wurde bereits nach 1 min Inkubation ein Maximum erreicht. Als Inkubationszeit wurde 1 min gewählt, da bei einer Konzentration von 0,8 $\mu\text{mol/L}$ bereits nach 2 min ein Gleichgewicht erreicht wird (siehe 5.4.2.2).

Um die kinetischen Parameter zu bestimmen, wurden die Werte doppelt reziprok als Lineweaver-Burk-Plot aufgetragen und die Werte K_m (Schnittpunkt mit der Abzisse = $-1/K_m$) und V_{\max} (Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate = $1/V_{\max}$) abgelesen:

Der K_m -Wert für 5-HT beträgt 0,6 μM und $V_{\max} = 4 \text{ pmol/min}$ (bezogen auf 5×10^7 Tbz) (siehe Abb. 9).

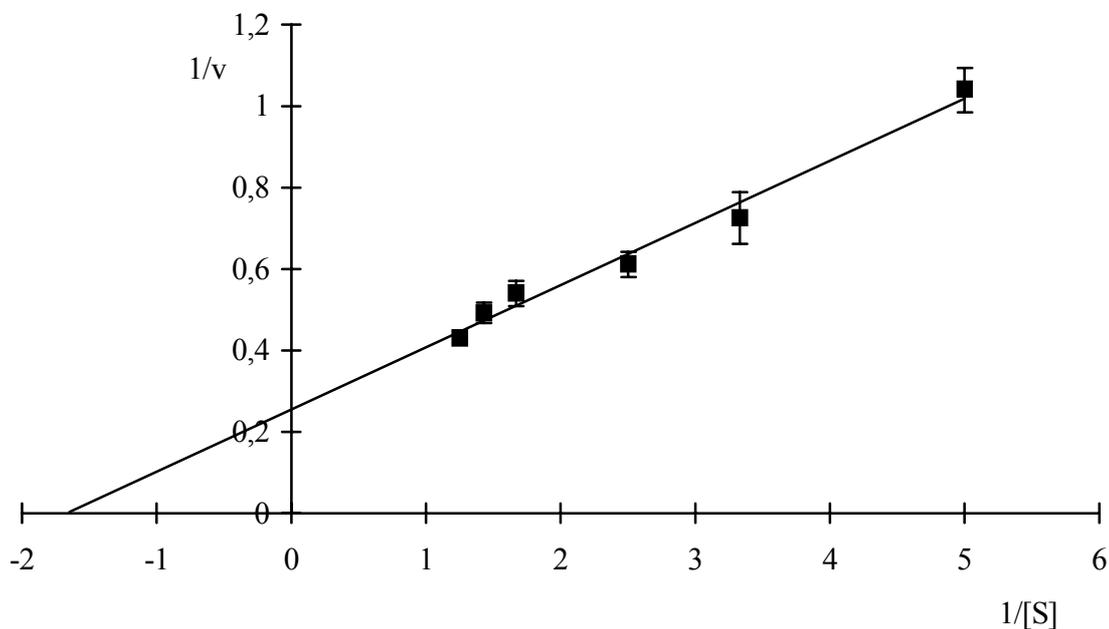


Abbildung 9

Serotonin-Aufnahme-Kinetik

Als Lineweaver-Burk-Plot ist die reziproke Geschwindigkeit v [$\text{pmol}/5 \times 10^7 \text{ Tbz}/\text{min}$] gegen die reziproke Substrat-Konzentration aufgetragen. Es wurden die Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichungen (SD) von drei Versuchen aufgetragen.

5.4.4 Hemmung der 5-HT-Aufnahme

In der Literatur zur Ecstasy-Neurotoxizität wird beschrieben, dass die Methylendioxy-Derivate des Amphetamins die Wiederaufnahme des 5-HT hemmen (Gough et al. 1991; Rudnick and Wall 1992b). Anhand des in dieser Arbeit verwendeten Modells für die serotoninergen Synapsen sollten diese Befunde verifiziert werden und zudem Hemmkinetiken für die untersuchten Substanzen erstellt werden, die eine Ermittlung des Hemmtyps und des K_i -Wertes ermöglichen (K_i = die InhibitorKonzentration, die notwendig ist, um die gegebene Reaktionsgeschwindigkeit zu halbieren).

Nach Dixon wird die Geschwindigkeit der Reaktion bei verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen und konstanter Substratkonzentration bestimmt, wodurch sich in der Auftragung der reziproken Geschwindigkeit $[1/v]$ gegen die InhibitorKonzentration $[I]$ eine Gerade ergibt.

Die Messungen werden bei mehreren Substratkonzentrationen wiederholt, wodurch insgesamt drei Geraden erhalten werden, die sich in einem Punkt schneiden sollten. Aus dem Schnittpunkt der Geraden wird der K_i -Wert ermittelt. Die Lage des Schnittpunktes gibt außerdem Aufschluss über den Hemmtyp der Reaktion.

Es wurden MDA, MDMA, MDEA, MBDB und als Vergleich außerdem Amphetamin (AMPH) und Methamphetamin (METH) überprüft.

Der Assay wurde, wie unter 3.3.1 beschrieben, durchgeführt. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in die Inkubationslösung gegeben, wodurch sie zusammen mit dem Substrat zu den Tbz pipettiert werden konnten. So wurden mögliche Effekte durch eine vorherige Inkubation nur mit Inhibitor in Abwesenheit größerer Mengen an Substrat vermieden. Die Inhibitoren wurden in den Konzentrationen 0, 2, 10 und 20 $\mu\text{mol/L}$ eingesetzt, die verwendeten 5-HT-Konzentrationen waren 0,2; 0,4 und 0,8 $\mu\text{mol/L}$.

Tabelle 2 **Hemmung der Serotonin-Aufnahme in die Thrombozyten**
K_i-Werte für die eingesetzten Inhibitoren

| Inhibitor | MDMA | MDA | MDEA | MBDB | AMPH | METH |
|------------------------------------|------|-----|------|------|------|------|
| K_i-Wert [µmol/L] | 2,8 | 2,4 | 3,2 | 3,0 | 14,5 | 11,9 |

Alle Ecstasy-Substanzen hemmen die 5-HT-Aufnahme in die Tbz (Tab. 2):

MDA besitzt den größten Hemmeffekt (K_i= 2,4 µmol/L), MDEA den geringsten (K_i= 3,2 µmol/L). Amphetamin und Methamphetamin als klassische Weckamine inhibieren ebenfalls den Transporter, allerdings erst bei höheren Konzentrationen. Folgende Reihenfolge der Hemmstärken konnte aufgestellt werden: MDA > MDMA > MBDB > MDEA > METH > AMPH.

Die Ergebnisse wurden als Dixon-Plot dargestellt, wobei die reziproke Aufnahmegeschwindigkeit $1/v$ [(pmol/5x10⁷Tbz/min)⁻¹] gegen die Inhibitor-konzentration [I] [µmol/L] aufgetragen wurde. Es wurden drei 5-HT-Konzentrationen eingesetzt: 0,2 µmol/L (Dreiecke), 0,4 µmol/L (Quadrate) und 0,8 µmol/L (Rauten) (Abbildungen 10-15); die Ergebnisse sind die Mittelwerte von Dreifachversuchen +/- Standardabweichung.

Wie anhand dieser Auftragungen gut abzulesen ist, handelt es sich bei allen untersuchten Substanzen um kompetitive Inhibitoren des SERT.

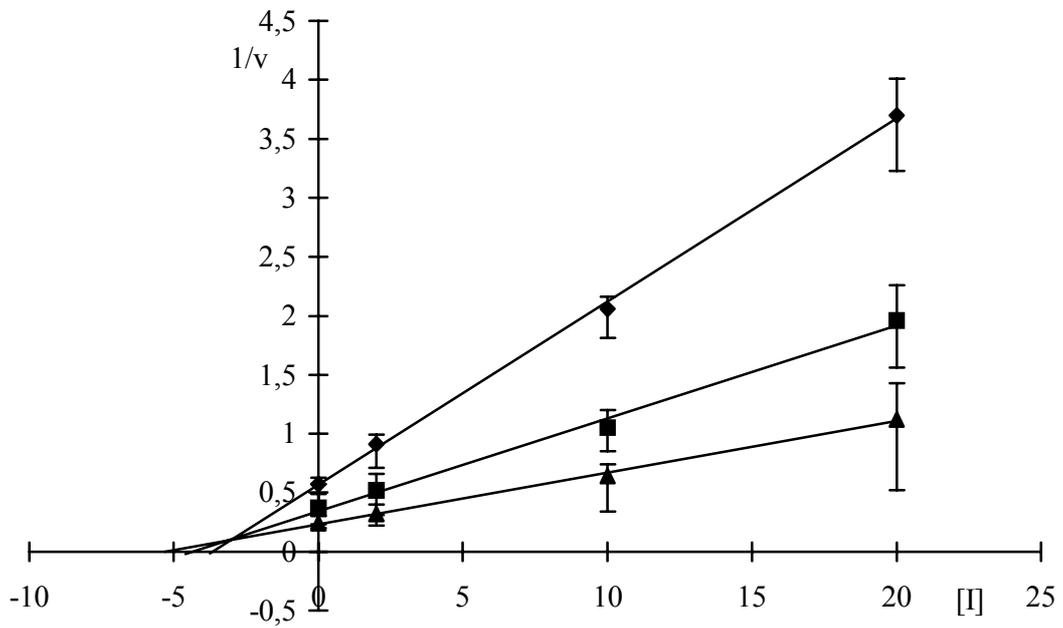


Abbildung 10 Inhibition des 5-HT-Transportes durch MDMA

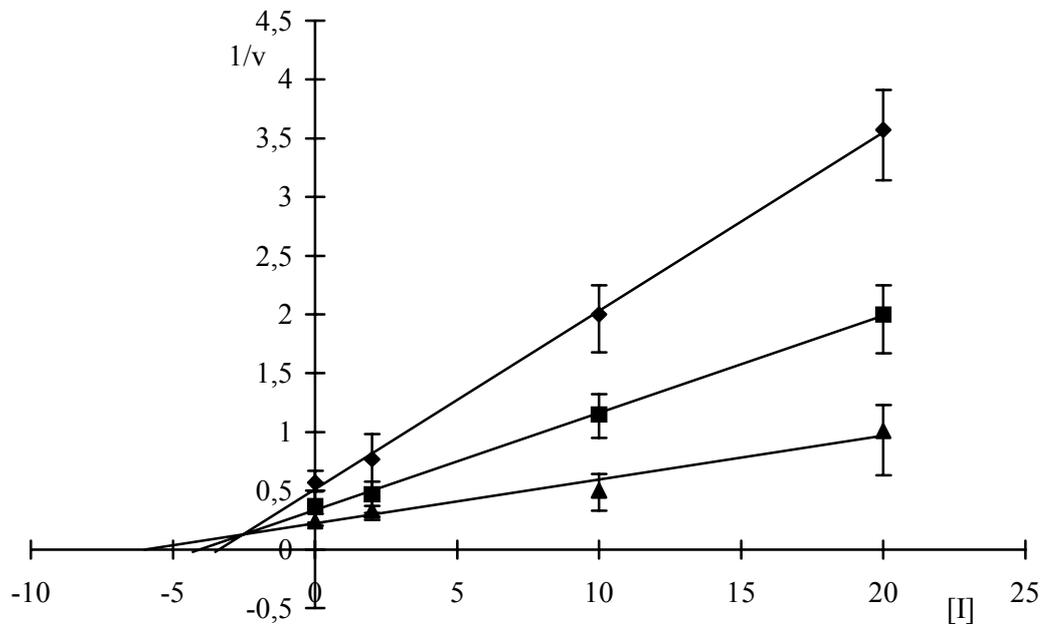


Abbildung 11 Inhibition des 5-HT-Transportes durch MDA

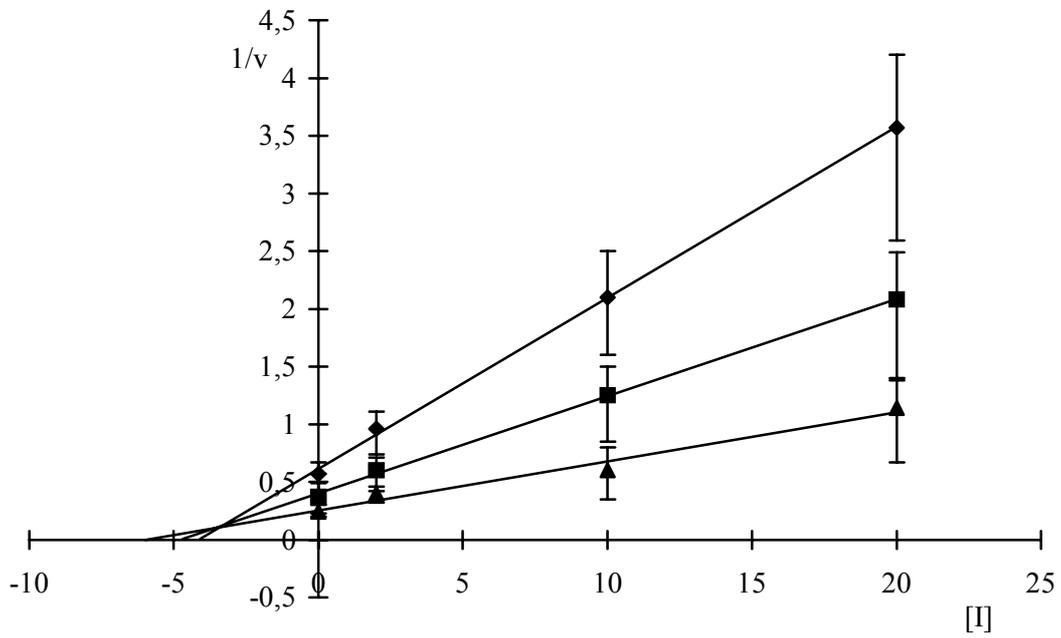


Abbildung 12 Inhibition des 5-HT-Transportes durch MDEA

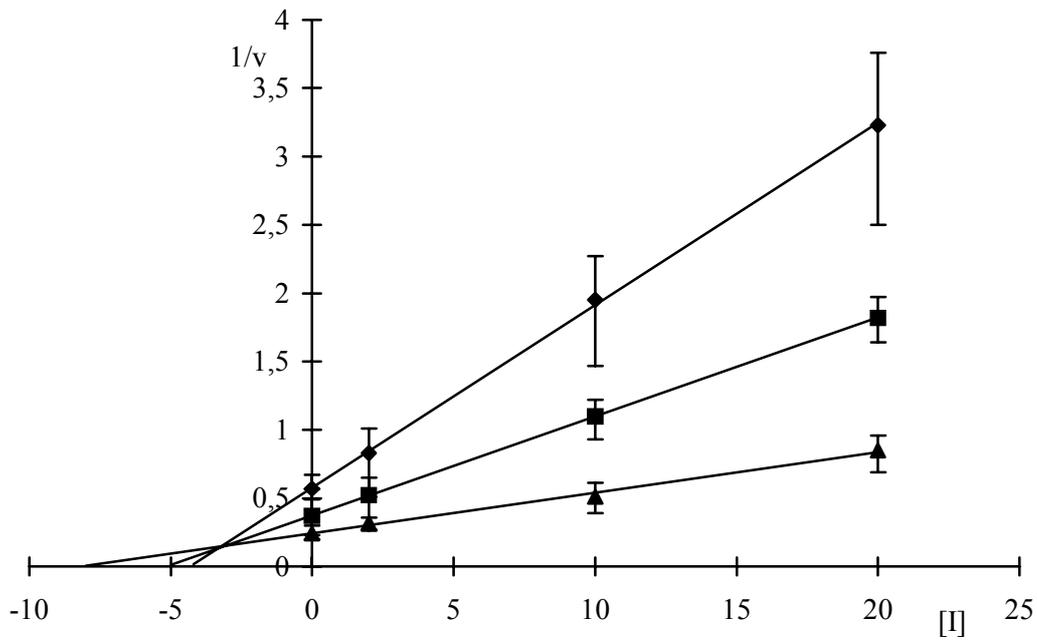


Abbildung 13 Inhibition des 5-HT-Transportes durch MBDB

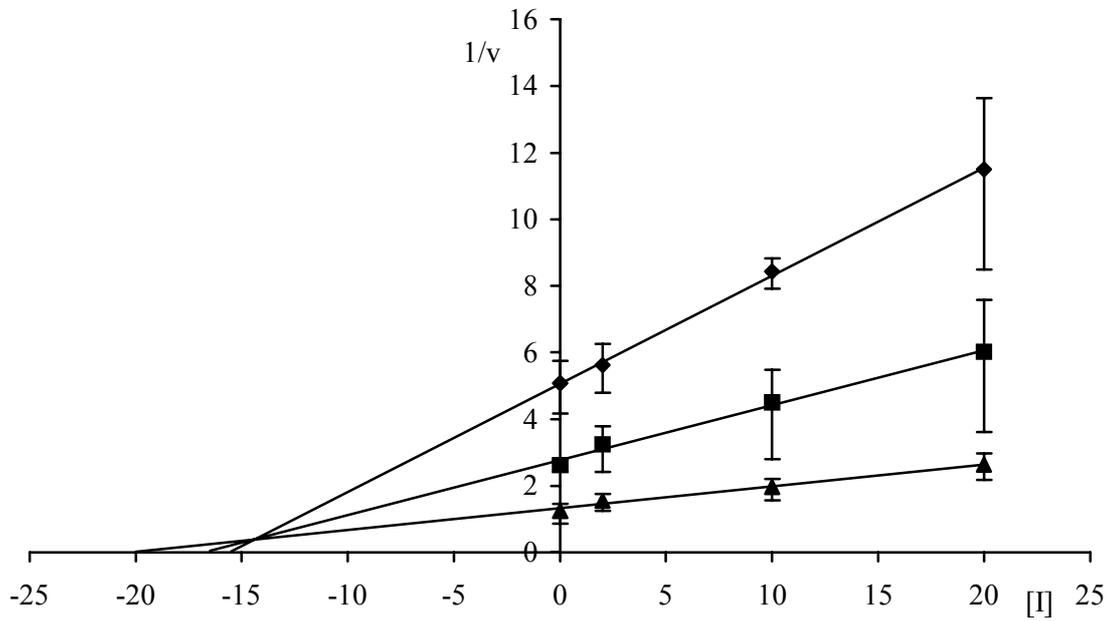


Abbildung 14 Inhibition des 5-HT-Transportes durch Amphetamin

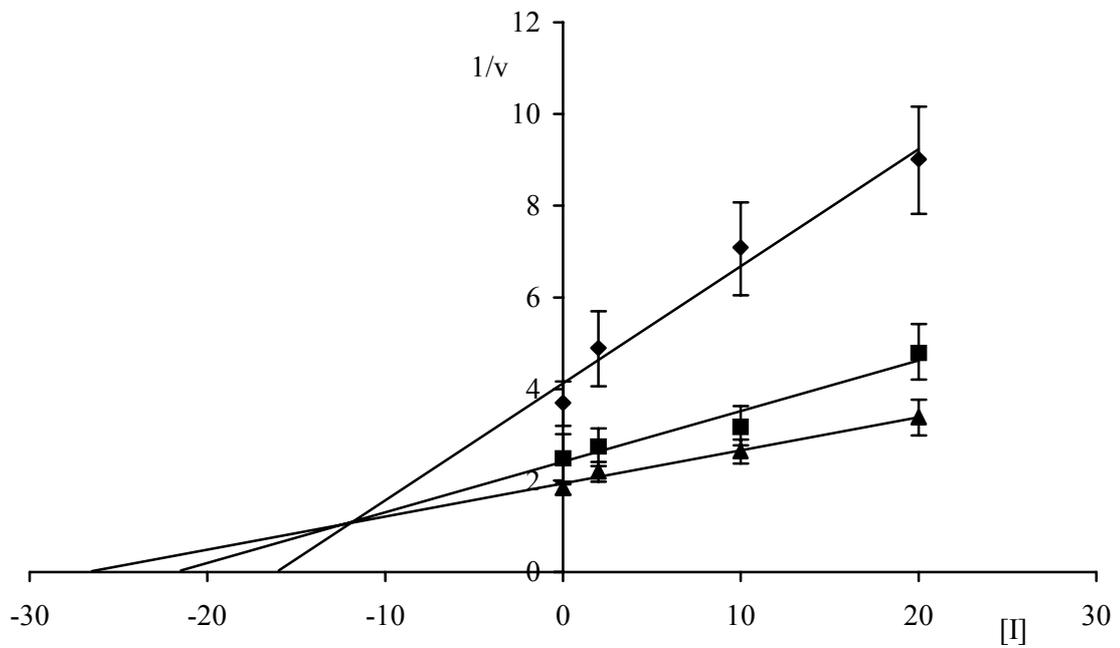


Abbildung 15 Inhibition des 5-HT-Transportes durch Methamphetamin

5.4.5 Dopamin-Aufnahme in die Thrombozyten

Ogleich der 5-HT-Transporter als spezifisch für 5-HT gilt, wurde geprüft, ob auch Dopamin (DA) als Substrat fungieren kann. In der Literatur finden sich hierzu widersprüchliche Angaben: Dean und Copolov (1991) stellten fest, dass DA zwar in die Nervenendigungen gelangen kann, dies aber über einen Imipramin-insensitiven Mechanismus geschieht, also nicht über den SERT. Mehrere Arbeiten vermuten ebenfalls einen spezifischen DA-Aufnahme-Mechanismus: Aminoff et al. (1974); Barbeau et al. (1975). Rotman et al. (1980) und Solomon et al. (1970) stellten fest, dass DA ein Substrat für eine relativ unspezifische Membranpumpe in den Tbz ist, die ebenfalls 5-HT und Noradrenalin transportiert.

Affolter und Pletscher (1982) diskutieren einen möglichen Transport von DA über den SERT, wobei sie auf mehrere Literaturstellen verweisen (Pletscher 1978; Rudnick 1977; Sneddon 1973). Diese Quellen vermuten ebenso wie Schmidt und Lovenberg (1985) einen Austausch von DA mit 5-HT über den SERT. Dies wurde aber nicht direkt, sondern nur indirekt über den [³H]5-HT-Efflux untersucht. Gordon und Olverman (1978) bewiesen einen Imipramin-sensitiven Aufnahme-Mechanismus für DA in die Tbz.

Auch Waldmeier (1985) zeigte *in vivo* bei Ratten eine Aufnahme von DA in 5-HT-Neuronen, die durch den SSRI Citalopram gehemmt werden konnte. Faraj et al. (1994) bewiesen einen aktiven, Na⁺-abhängigen und Imipramin-sensitiven DA-Transport in humane Lymphozyten.

5.4.5.1 Unspezifische Bindung

Um zu überprüfen, ob es sich um eine selektiven Aufnahme über den 5-HT-Transporter handelt, wurde die Inkubation

1. unter Zusatz von Paroxetin,
2. in Natrium-Ionen-freiem Medium wiederholt.

Es konnte bewiesen werden, dass DA in die Tbz gelangt.

Die verringerte DA-Aufnahme bei inaktivem SERT bewies eine Aufnahme über denselben Transporter wie 5-HT.

5.4.5.2 Zeitverlauf der Dopamin-Aufnahme in die Thrombozyten

Zur Charakterisierung der DA-Aufnahme waren mehrere Methoden denkbar.

Da sich die Methode zur Bestimmung des 5-HT-Transportes als gut geeignet erwiesen hatte und die Anwendung derselben Methode für verschiedene Substrate eine optimale Vergleichbarkeit ermöglicht, wurde für die DA-Versuche die gleiche Versuchsanordnung wie für 5-HT beschrieben (3.2.1) eingesetzt.

Die DA-Aufnahme erfolgt langsamer als die des 5-HT. Bei einer Konzentration von $0,8 \mu\text{mol/L}$ verläuft sie über 15 min linear (Abb.16).

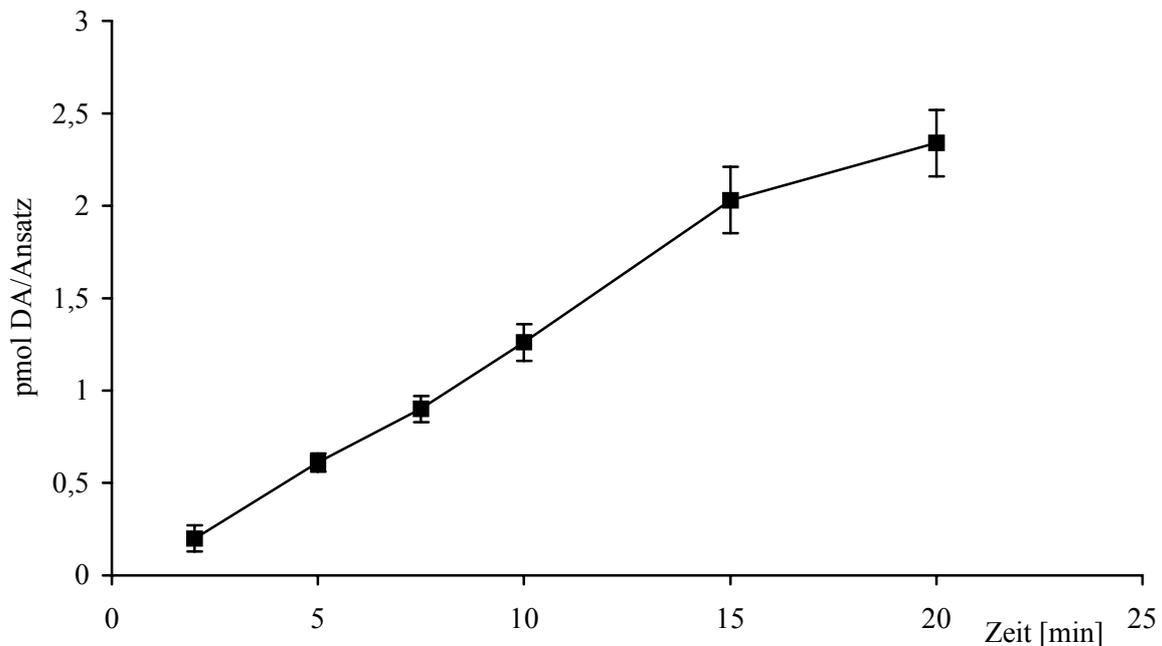


Abbildung 16 **Zeitverlauf der Dopamin-Aufnahme in die Thrombozyten**
 Die eingesetzte Konzentration war $0,8 \mu\text{mol/L}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei getrennten Versuchen, ein Ansatz entsprach 5×10^7 Tbz.

Um die DA-Aufnahme mit dem Transport des 5-HT vergleichen zu können, war die Kinetik des DA-Transportes von großem Interesse:

5.4.5.3 Kinetik

Die Versuchsbedingungen entsprachen denen der 5-HT-Kinetik-Bestimmung (siehe Methodenteil 3.2.1.5). Da mit einer geringeren DA-Aufnahme zu rechnen war, wurde mit höheren DA-Konzentrationen gearbeitet (0,1-1,6 $\mu\text{mol/L}$). Als Inkubationszeit wurden 2 min gewählt. Bei längeren Zeiten steigt die Gefahr einer Beeinträchtigung der Tbz durch die Inkubationsbedingungen und einen möglichen Verlust an Medium durch Verdunstung. Eine Inkubationszeit von 1 min, wie bei der Erstellung der 5-HT-Kinetik, ergab bei geringeren DA-Konzentrationen häufig sehr geringe cpm-Werte, die die Auswertung erschwerten bzw. höhere Schwankungen bewirkten.

Durch eine doppelt reziproke Auftragung der Aufnahme-Geschwindigkeit ($[1/v]$, auf 1 min berechnet) gegen die eingesetzte Konzentration $[1/S]$ (Lineweaver-Burk-Plot) konnten die kinetischen Konstanten aus der Graphik abgeschätzt werden (Abb. 17).

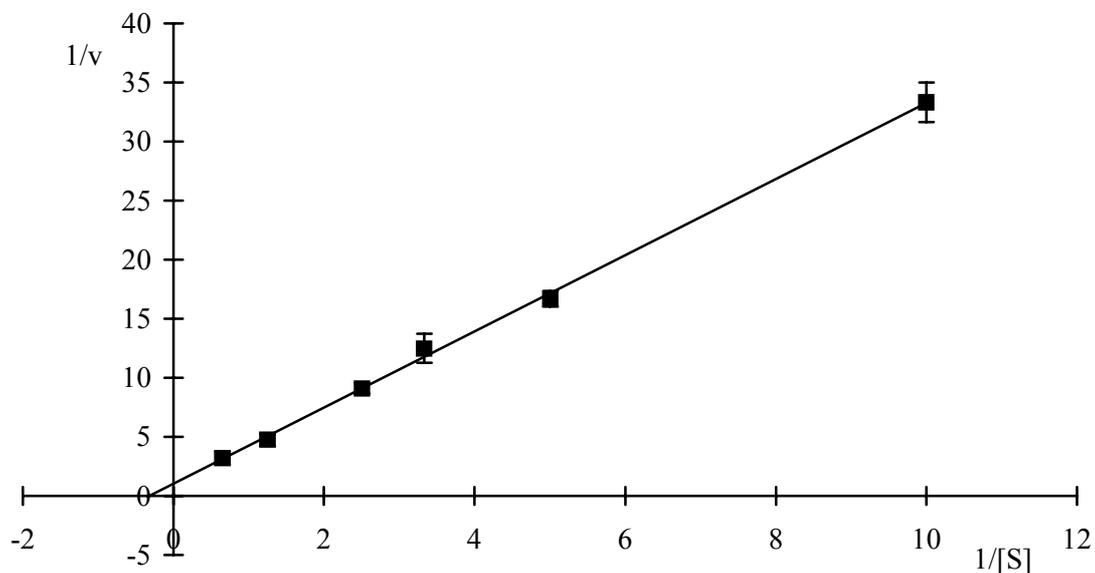


Abbildung 17

Dopamin-Aufnahme-Kinetik

Als Lineweaver-Burk-Plot wurde die reziproke Geschwindigkeit v [$\mu\text{mol/min}$] gegen die reziproke Substrat - Konzentration aufgetragen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD von drei verschiedenen Versuchen.

Für den DA-Transport in die Tbz ergaben sich folgende Werte: $K_m = 2,6 \mu\text{mol/L}$, $V_{\text{max}} = 0,8 \text{ pmol/min}$ (bezogen auf 5×10^7 Tbz).

Dies zeigt deutlich, dass DA zwar als Substrat akzeptiert wird, aber der 5-HT-Transport wesentlich spezifischer erfolgt. Die Transport-Geschwindigkeit des 5-HT ist fünfmal so hoch wie die des DA.

Da beide Substrate denselben Transporter nutzen können, sollte geklärt werden, inwieweit sie bei ihrer Aufnahme interagieren. Deshalb wurde - gewissermaßen als Kontrolle - sowohl der Transport von 5-HT in Gegenwart von DA als auch der Transport von 5-HT in Gegenwart von DA gemessen. Zusätzlich wurde der Einfluss von MDMA (exemplarisch für die Ecstasy-Inhaltsstoffe) auf die DA-Aufnahme überprüft.

5.4.5.4 Hemmung der Dopamin-Aufnahme

Die DA-Hemmversuche wurden analog zu den 5-HT-Hemmversuchen (siehe Methodenteil 3.3.1) durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen von 5-HT und DA lagen im Bereich ihres jeweiligen K_m -Wertes. Substrat und potentieller Inhibitor wurden gleichzeitig zu den vorinkubierten Tbz gegeben und diese dann 1 min inkubiert. Diese kurze Inkubationszeit wurde im Hinblick auf die schnelle 5-HT-Aufnahme gewählt.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich 5-HT und DA in ihrer Aufnahme hemmen. Der K_i -Wert für die Hemmung von DA durch 5-HT betrug $0,33 \mu\text{mol/L}$ (Abb. 18), für die Hemmung der 5-HT-Aufnahme durch DA wurden sehr hohe DA-Konzentrationen benötigt, der K_i -Wert lag bei $34 \mu\text{mol/L}$ (Abb. 19).

MDMA hemmt ebenfalls die DA-Aufnahme über den SERT. Der ermittelte K_i -Wert betrug $0,46 \mu\text{mol/L}$ (Abb. 20).

Bei allen Hemmstoffen handelt es sich um kompetitive Inhibitoren.

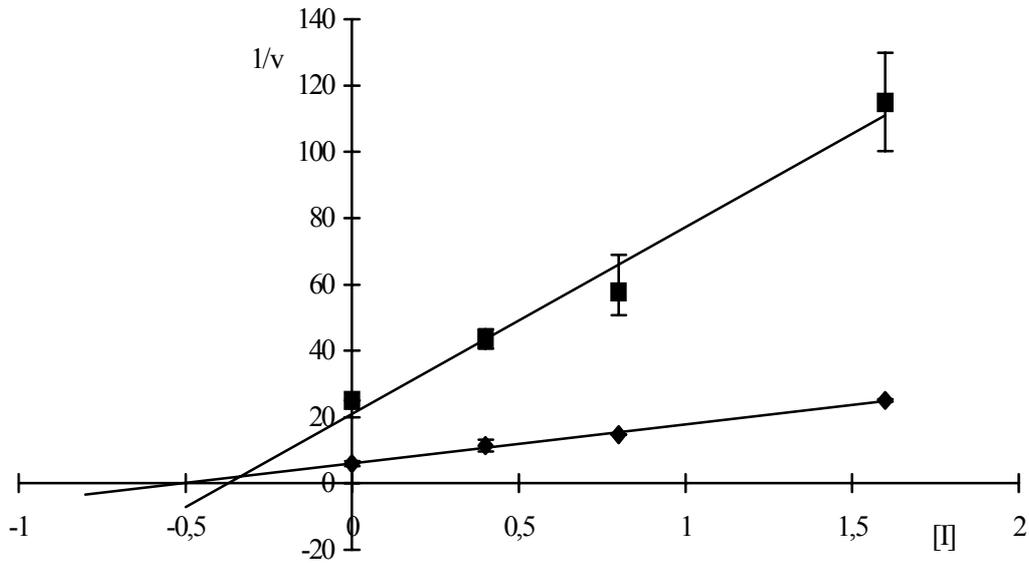


Abbildung 18

Inhibition der Dopamin-Aufnahme durch Serotonin

DA wurde in den Konzentrationen 0,2 (Quadrate) und 0,8 (Rauten) $\mu\text{mol/L}$ eingesetzt, der Inhibitor 5-HT in Konzentrationen von 0 – 1,6 $\mu\text{mol/L}$. Die Ergebnisse wurden als Dixon-Plot aufgetragen: $1/v$ gegen die Inhibitor-Konzentration.

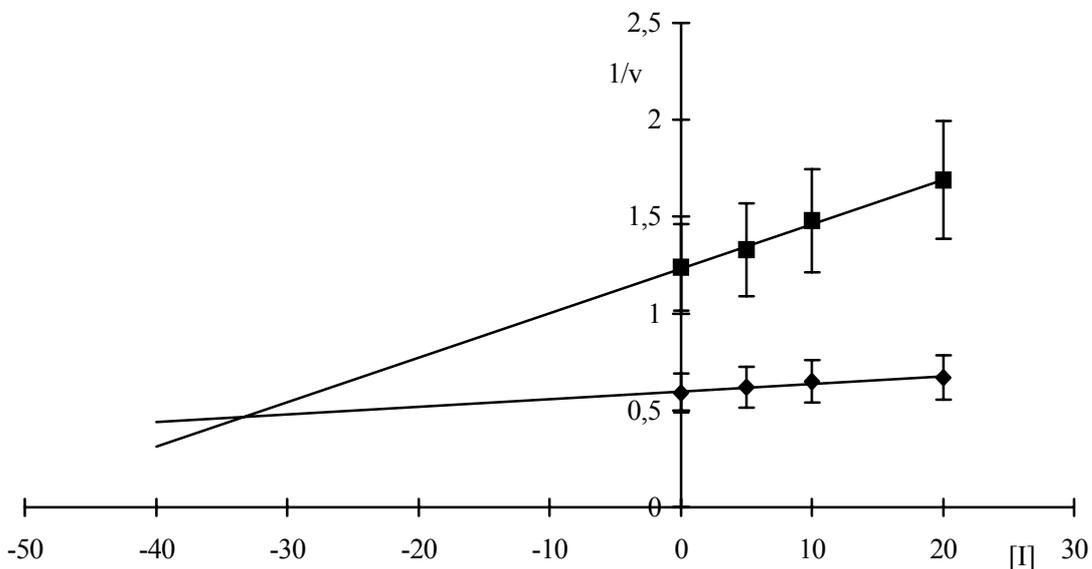


Abbildung 19

Inhibition der Serotonin-Aufnahme durch Dopamin

5-HT wurde in den Konzentrationen 0,2 (Quadrate) und 0,8 (Rauten) $\mu\text{mol/L}$ eingesetzt, der Inhibitor DA in Konzentrationen von 0 – 20 $\mu\text{mol/L}$. Die Ergebnisse wurden als Dixon-Plot aufgetragen: $1/v$ gegen die Inhibitor-Konzentration.

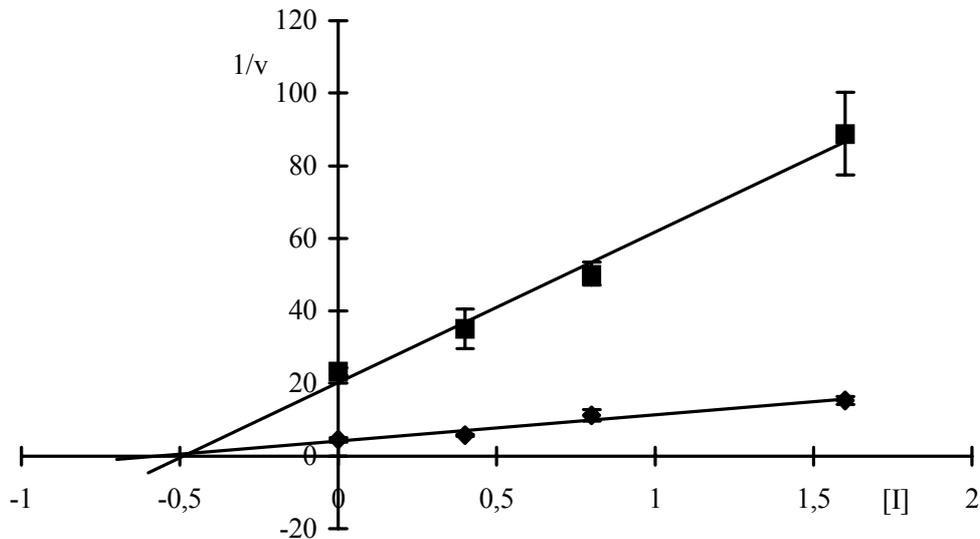


Abbildung 20

Inhibition der Dopamin-Aufnahme durch MDMA

DA wurde in den Konzentrationen 0,2 (Quadrate) und 0,8 (Rauten) $\mu\text{mol/L}$ eingesetzt, der Inhibitor MDMA in Konzentrationen von 0 – 1,6 $\mu\text{mol/L}$. Die Ergebnisse wurden $1/v$ gegen die Inhibitor-Konzentration als Dixon-Plot aufgetragen.

5.5 Der Vesikel-Transporter

Da die serotoninergeren Nervenendigungen sowohl den SERT als auch Speichervesikel aufweisen, ist es von Interesse, ob die Ecstasy-Substanzen, die – wie gezeigt werden konnte – einen Effekt auf den Membrantransporter haben, auch eine Hemmung des Vesikel-Transporters bewirken.

5.5.1 Serotonin-Aufnahme in die Vesikel

Um zu überprüfen, ob der Transport-Assay ebenfalls dazu geeignet ist, die Aufnahme von 5-HT in die Speichervesikel zu bestimmen, wurden die Tbz mit Reserpin vorbehandelt, das selektiv den Vesikel-Transporter (Rudnick und Humphreys 1992; Rudnick et al. 1981) hemmt: Durch eine H^+ -Ionen-Translokation wird der Transporter so verändert, dass er Reserpin praktisch irreversibel bindet (Rudnick et al. 1990). Reserpin besitzt so gut wie keinen Effekt auf den Membrantransporter (Rudnick und Humphreys 1992).

Eine weitere Möglichkeit, zwischen den beiden Transporter-Systemen zu unterscheiden, ist der Einsatz des Ionophors Gramicidin, das die Membranen für Ionen wie Na^+ , K^+ und H^+ frei durchgängig macht. Hierdurch kann ebenfalls cytosolisches 5-HT von vesikulärem 5-HT unterschieden werden: Die intakten Tbz verlieren nach Gramicidin-Zusatz nur das cytosolische, nicht aber das in den Vesikeln gespeicherte 5-HT (Rudnick und Humphreys 1992).

Da dies keine deutlichen Vorteile zur Reserpin-Methode bietet, wurde die Unterscheidung der Transporter mit Hilfe der erstgenannten Methode unternommen.

5.5.1.1 Herstellung der Reserpin-Lösungen

Ein Problem ergab sich aus dem Löslichkeitsverhalten des Reserpins: Die Stammlösung konnte nicht in Transportpuffer angesetzt werden, da Reserpin als Alkaloid praktisch nicht wasserlöslich ist. Der in der Literatur (Bartholini und Pletscher 1964) verwendete Citratpuffer zeigte keine zufriedenstellenden Lösungseigenschaften. Ein Lösen in organischen Lösungsmitteln (z.B. Ethanol, Ethylenglykol, Propanol, Pyridin, Methanol), jeweils 5 %ig in Transport-Puffer oder Essigsäure war nicht möglich, da die Tbz auf eine Zugabe dieser Lösungsmittel sehr empfindlich mit einer Abnahme der Transporter-Aktivität reagieren. Das von Scherman und Henry (1984) eingesetzte Lösungsmittel (2 mmol/L HCl + 200 mmol/L Essigsäure) hatte ebenfalls eine Thrombozytenschädigung zur Folge. Auch der Versuch, die Tbz mit einer ethanolischen Reserpin-Lösung vorzuinkubieren und das Lösungsmittel durch anschließendes Zentrifugieren zu entfernen, schlug fehl, da die Tbz sich nach dem Zentrifugationsschritt nicht mehr vollständig resuspendieren ließen und zum Teil aggregierten. Selbst eine Synthese von Reserpin-Hydrochlorid hatte nicht die gewünschte Wasserlöslichkeit zur Folge.

Schließlich stellte sich verdünnte Essigsäure (5 %) in Kombination mit DMSO (7 %) als gutes Lösungsmittel heraus. Die Konzentration der Lösungsmittel konnte durch deren Kombination so stark vermindert werden, dass bei ausreichender Lösekapazität kein signifikanter Effekt auf die SERT-Aktivität mehr auftrat. Es wurde eine Stammlösung mit einem Gehalt von 8 mg/ml Reserpin in DMSO/Essigsäure hergestellt und bei -20°C gelagert. Sie wurde erst kurz vor Gebrauch aufgetaut und auf

die gewünschte Konzentration mit Transportpuffer verdünnt, um ein Ausfallen der Substanz zu verhindern.

Um die tatsächliche Konzentration an Reserpin in der Verdünnung und ihre Stabilität zu überprüfen, wurde eine HPLC-Methode entwickelt. Zunächst wurde ein Fließmittel nach Cieri (1998) verwendet, was aber nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen führte. Nach mehreren Modifikationen erwies sich folgendes Fließmittel als günstig: 90 % H₂O, 10 % Methanol, 0,1 % Eisessig; pH 4,4.

Die weiteren chromatographischen Bedingungen sind im Methodenteil unter 3.7 beschrieben, Abbildung 21 zeigt ein Beispielchromatogramm.

Die zu untersuchenden Proben wurden mit Fließmittel verdünnt, eine Eichkurve wurde mit 0,1-1,0 µg/ml Reserpin erstellt (Abb.22). Der Korrelationskoeffizient betrug 0,999.

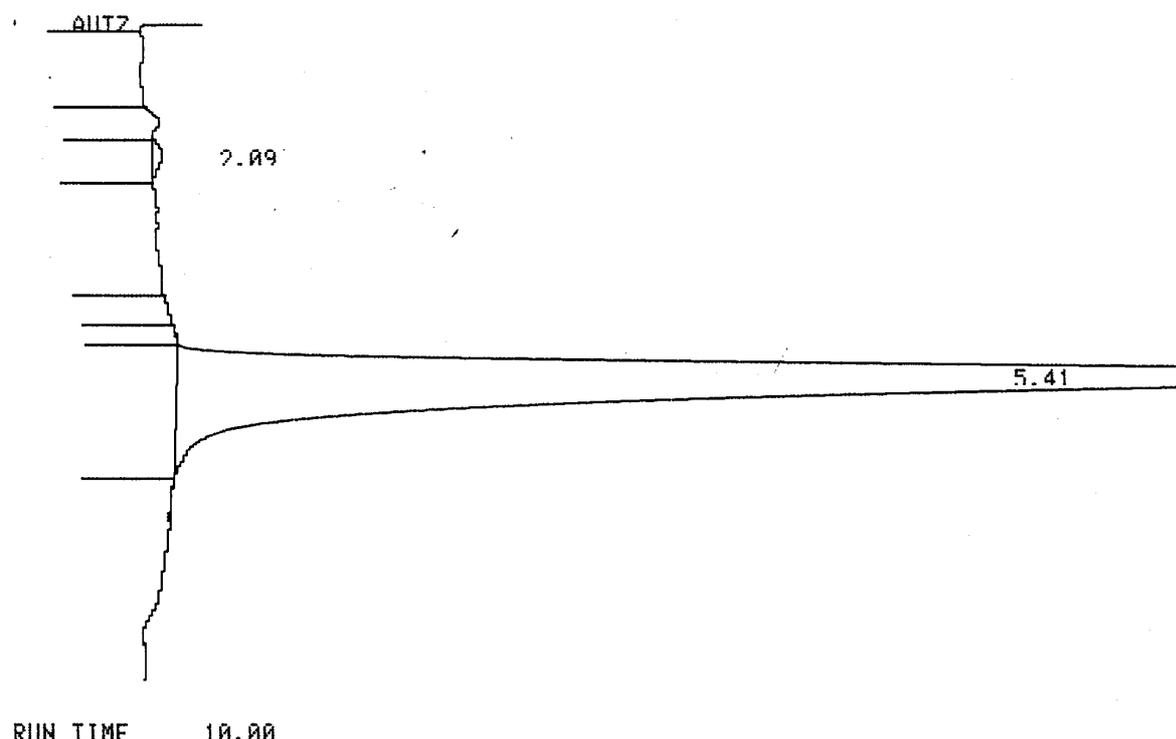


Abbildung 21 Reserpin-Bestimmung mittels HPLC/EC
Beispielchromatogramm einer Konzentration von 0,75 µg/ml Reserpin.

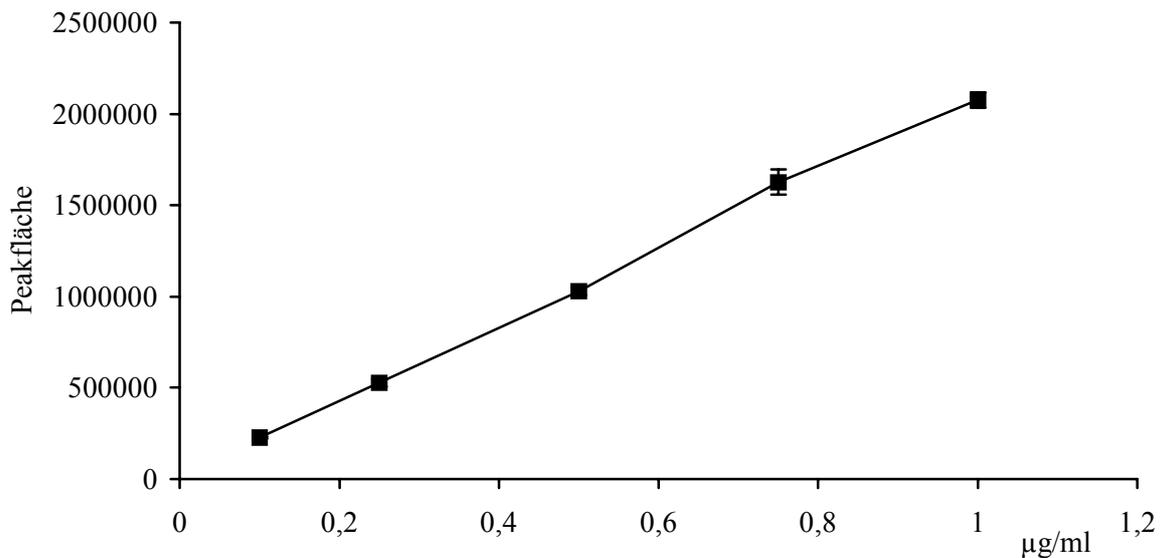


Abbildung 22 **Eichkurve für Reserpin, 0,1 – 1,0 µg/ml**
Mittelwerte +/- Standardabweichung von 3 Versuchen.

5.5.1.2 Durchführung

Die Hemmkonzentration des Reserpins wurde wie folgt ermittelt: Es wurden 0,8 µmol/L 5-HT eingesetzt, da dies die höchste verwendete 5-HT-Konzentration war. Die Tbz wurden im Wasserbad bei 37°C mit Reserpin vorinkubiert. Da das Reserpin aufgrund seiner Molekülgröße nur langsam an seinen Wirkort gelangt (Scherman und Henry 1984), wurden 10 min Vorinkubationszeit gewählt, wobei eine Überprüfung allerdings ergab, dass eine Vorinkubation von 5, 10, 15 und 20 min jeweils gleiche Ergebnisse erbrachte. Nun wurde die eingesetzte Reserpin-Konzentration so lange gesteigert, bis selbst im Aufnahme-Maximum kein Anstieg einer Hemmung mehr erreicht wurde. Parallel dazu wurde überprüft, ob das Reserpin-Lösungsmittel in identischer Verdünnung einen Einfluss auf die Aufnahme hat. Eine Konzentration von 70 µmol/L Reserpin erwies sich als optimal. Die Inkubationszeit mit 5-HT wurde von 1 min auf 15 min verlängert, da im Bereich der maximal aufgenommenen 5-HT-Menge in die Tbz die Hemmung des Vesikel-Transporters besonders deutlich wird (Abb. 24).

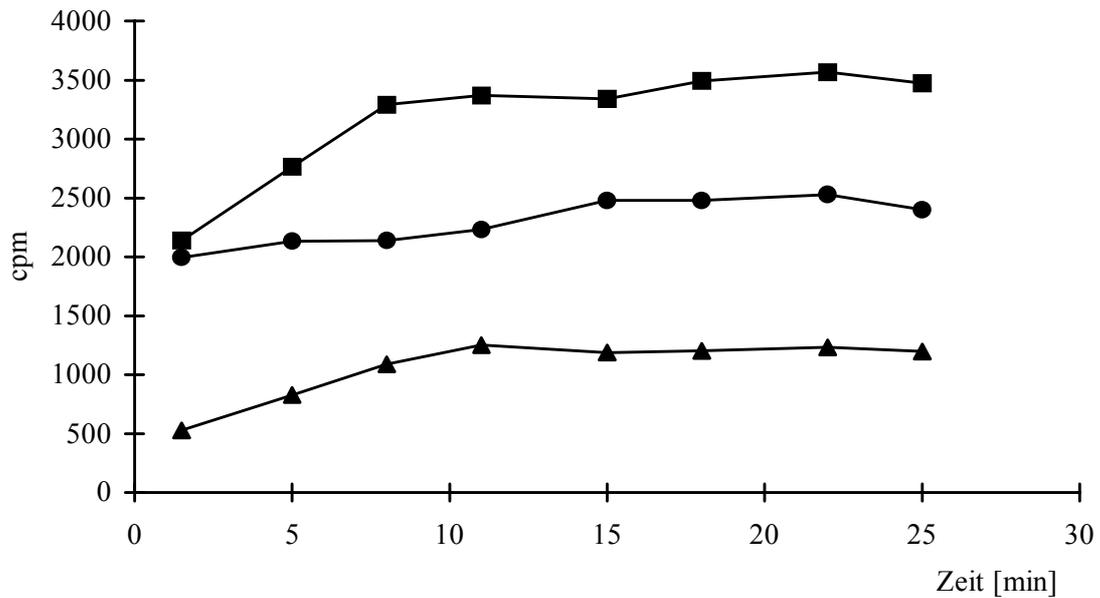


Abbildung 23

Aufnahme von Serotonin

Quadrate: Gesamtaufnahme in die Tbz; Dreiecke: unspezifische Bindung in Gegenwart von Paroxetin; Kreise: 5-HT-Aufnahme nach Vorinkubation mit Reserpin d.h. nur über den 5-HT-Transporter bei inhibiertem Vesikel-Transporter. 5-HT-konzentration: 0,8 $\mu\text{mol/L}$.

Mit dieser Versuchsanordnung konnte dargestellt werden, dass eine Vorinkubation mit Reserpin die Menge an aufgenommenem 5-HT deutlich verringerte (Abb. 23), d.h., dass 5-HT nicht nur in das Cytosol, sondern auch in die Speichervesikel der Tbz transportiert wird.

Zusätzlich wurde eine Kinetik unter Reserpin-Einfluss erstellt. Es ergab sich eine nicht-kompetitive Hemmung (Abb. 24).

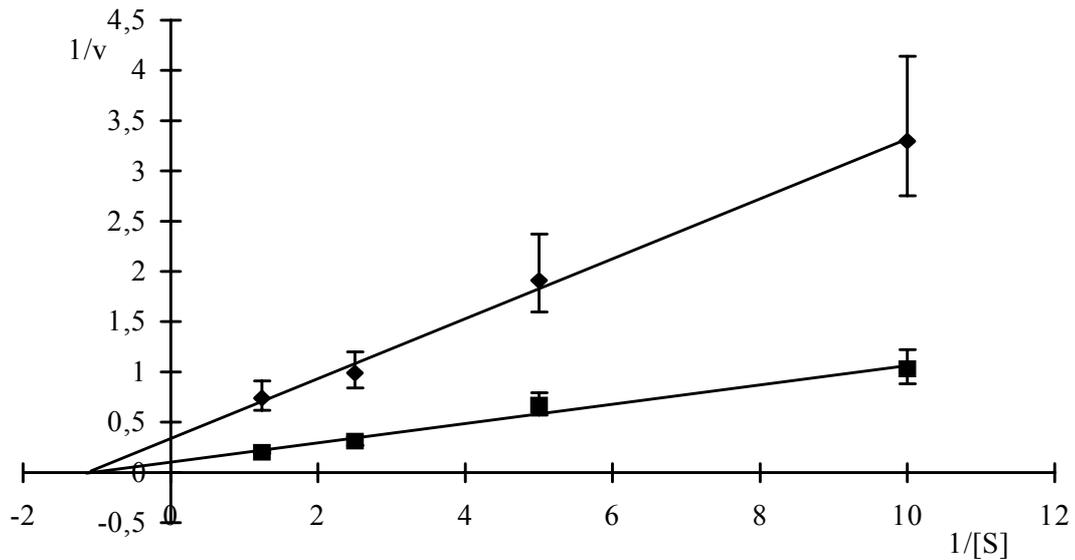


Abbildung 24 Kinetik der Serotonin-Aufnahme mit und ohne Reserpin
 Auftragung der reziproken Aufnahmegeschwindigkeit (auf 20 min berechnet) gegen die reziproke 5-HT-Konzentration als Lineweaver-Burk-Plot. Quadrate: Spezifische Aufnahme in die Tbz; Rauten: 5-HT-Aufnahme in das Cytosol.

Eine exakte Bestimmung der kinetischen Konstanten ist hieraus nicht ableitbar, da die Substratkonzentrationen sich auf das Außenmedium beziehen und nicht auf die in den Tbz herrschende, auf den Vesikel-Transporter wirkende Konzentration.

5.5.1.3 Einfluss von Inhibitoren

Es sollte nun differenziert werden, ob die Reduktion des aufgenommenen 5-HT ein Resultat einer Inhibition des Membran- oder des Vesikel-Transporters oder beider Transporter ist. Hierzu wurden folgende Ansätze untersucht:

Inkubation mit:

- | | |
|-------------------------------------------|---------------------------------------|
| a) Lösungsmittel des Reserpins | e) Reserpin |
| b) Lösungsmittel und Paroxetin | f) Reserpin und Paroxetin |
| c) Lösungsmittel und Inhibitor | g) Reserpin und Inhibitor |
| d) Lösungsmittel, Paroxetin und Inhibitor | h) Reserpin, Paroxetin und Inhibitor. |

Bildet man die Differenzen der ermittelten Aufnahme-Werte, so können folgende Informationen aus diesen Ergebnissen gewonnen werden:

- a) – b) entspricht der spezifischen Aufnahme in das Cytosol und die Vesikel (A).
- e) – f) stellt die spezifische Aufnahme nur in das Cytosol dar (B).
- c) – d) ergibt die spezifische Aufnahme in Cytosol und Vesikel mit Inhibitor (C).
- g) – h) ist die spezifische Aufnahme in das Cytosol in Gegenwart eines Inhibitors (D).

Subtrahiert man die in das Cytosol aufgenommene Menge 5-HT von der in die Vesikel und das Cytosol aufgenommenen Menge (A-B = ohne Inhibitor; C-D = mit Inhibitor), so ergibt sich rechnerisch die 5-HT-Konzentration, die in den Vesikeln gespeichert wird. Wenn A größer als C ist, so zeigt es, dass der eingesetzte Inhibitor die Aufnahme in die Tbz reduziert. Es könnte sich dabei um eine Hemmung des SERT oder des Vesikel-Transporters oder beider Aufnahme-Mechanismen handeln. Wenn die Differenz A-C, also die Aufnahme-Reduktion, die durch die Hemmung der Aufnahme in die Vesikel und das Cytosol durch den Inhibitor (= nicht reserpinisierte Tbz) entsteht, größer ist als die Reduktion im Cytosol alleine (= reserpinisierte Tbz), also die Differenz B-D, kann daraus geschlossen werden, dass zusätzlich zum Membrantransporter auch der Vesikel-Transporter gehemmt wird.

Tabelle 3 **Hemmung der Serotonin-Aufnahme in die Thrombozyten**
Hemmvergleich mit und ohne Reserpin. Angegeben ist die Verminderung der ursprünglichen 5-HT-Aufnahme in %.

| Inhibitor | MDMA | MDA | MDEA | MBDB | AMPH | METH |
|----------------------------------|------|-----|------|------|------|------|
| Hemmung ohne Reserpin [%] | 67 | 55 | 49 | 53 | 19 | 44 |
| Hemmung mit Reserpin [%] | 42 | 44 | 44 | 43 | 7 | 12 |

Diese Untersuchungen wurden für folgende Hemmsubstanzen durchgeführt: MDMA, MDA, MDEA, MBDB, AMPH und METH. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Ecstasy-Substanzen beide in den Tbz und somit auch in den serotoninerger Nervenendigungen vorkommenden Transporter-Typen gehemmt werden (siehe Abb. 25 und 26; Tab.3). Bei den Weckaminen fiel die Hemmung insgesamt schwächer aus:

Amphetamin und Methamphetamin waren in der Lage, ebenfalls den Vesikel-Transporter zu hemmen, allerdings nicht so stark wie die Ecstasy-Substanzen.

Mit diesem Modell, also intakten Tbz, ist es nicht möglich, eine Hemm-Kinetik des Vesikel-Transporters zu erstellen, da die Inhibition des Membran-Transporters vorgeschaltet ist. Eine Möglichkeit wäre, isolierte Vesikel, wie bei Rudnick et al. (1990) beschrieben, einzusetzen, was im Rahmen dieser Arbeit aber nicht durchgeführt werden sollte.

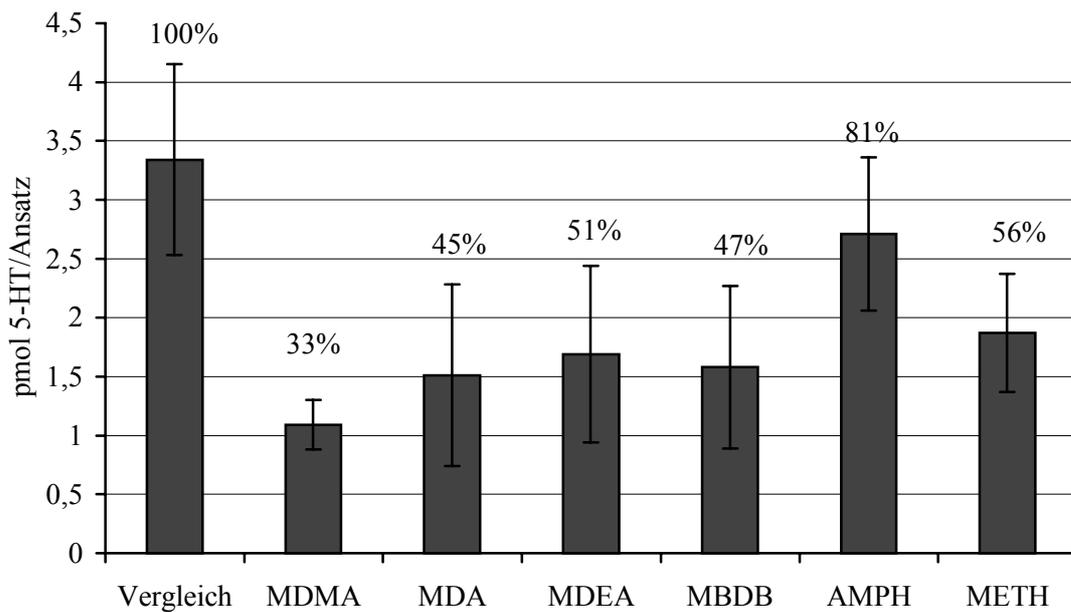


Abbildung 25 Hemmung der Serotonin-Aufnahme in Gegenwart des Reserpin-Lösungsmittels als Vergleich
Reaktionsbedingungen siehe Abbildung 26

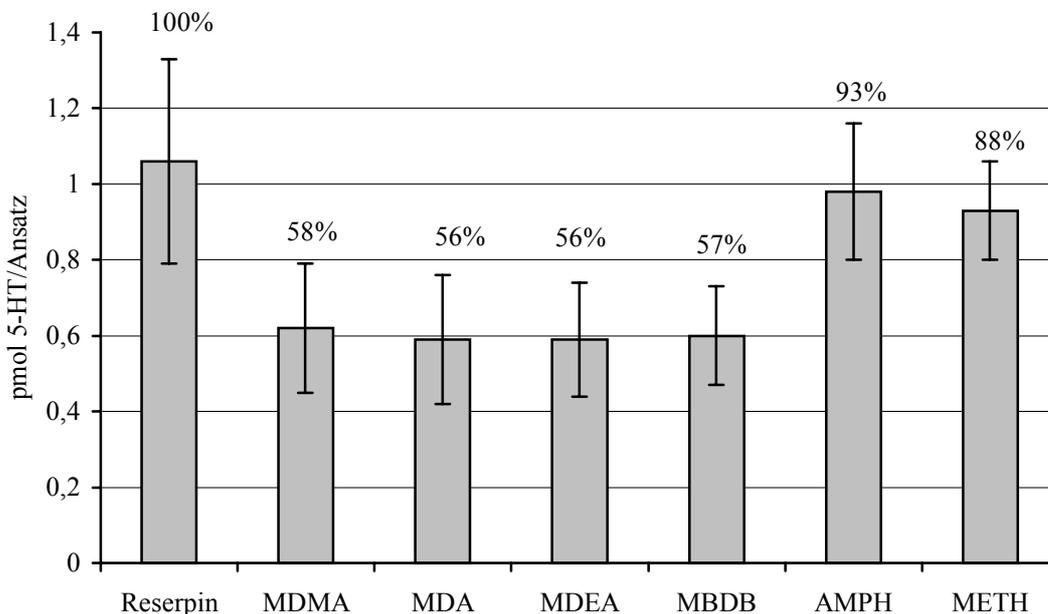


Abbildung 26 Hemmung der Serotonin-Aufnahme bei 15 min Inkubation in Gegenwart von Reserpin
eingesetzte Konzentrationen: 5-HT 0,6 $\mu\text{mol/L}$; Inhibitoren 10 $\mu\text{mol/L}$; 15 min Inkubation. Jeder Wert repräsentiert den MW \pm SD dreier Messungen der 5-HT-Aufnahme in Gegenwart des getesteten Inhibitors im Vergleich zur ungehemmten Kontrolle (=100 %); ein Ansatz entspricht 5×10^7 Tbz.

5.5.2 Dopamin-Aufnahme in die Speichervesikel

Die Aufnahme von DA über den SERT wurde bereits bewiesen (siehe 5.4.5). Dean und Copolov (1991) untersuchten die Aufnahme von [³H]DA in humane Tbz und stellten fest, dass Reserpin zwar einen Einfluss auf die Gesamt-5-HT-, aber nicht auf die Gesamt-DA-Aufnahme zeigte, somit DA also nicht in die Speichervesikel aufgenommen wird. Vor dem Hintergrund, dass der Vesikel-Transporter biogener Amine in allen Speichervesikeln nicht identisch, aber sehr ähnlich ist (Rudnick und Clark 1993), war dieses Ergebnis nicht schlüssig. Deshalb sollte eine mögliche Aufnahme des DA über den Vesikel-Transporter in dieser Arbeit nochmals überprüft werden.

Der Versuch wurde, wie unter 5.5.1 für 5-HT beschrieben, auch für DA durchgeführt: Die Tbz wurden 5 min bei 37°C äquilibriert und mit Reserpin oder Lösungsmittel versetzt. Nach weiteren 10 min wurde die Inkubationslösung, die [³H]DA und Puffer oder Paroxetin enthielt, zugegeben und 15 min inkubiert, gestoppt und wie üblich weiter aufgearbeitet. Unterschiede zur 5-HT-Methode waren, dass DA in einer höheren Konzentration (0,325 – 1,6 µmol/L) eingesetzt wurde, ebenso wurde das radioaktive DA in einer höheren Konzentration (200.000 cpm/5 µl) verwendet.

Da die DA-Aufnahme durch Reserpin um 45 +/- 4 % vermindert wurde, ergibt sich, dass DA nicht nur in das Cytosol, sondern auch in die Speichervesikel der Tbz gelangt (Abb. 27).

Zusätzlich wurde wie auch für 5-HT eine DA-Aufnahme-Kinetik in Anwesenheit von Reserpin mit einer Inkubationszeit von 20 min erstellt (nicht dargestellt). Auch hier ergab sich aus der Lineweaver-Burk-Auftragung ein nicht-kompetitiver Charakter der Hemmung.

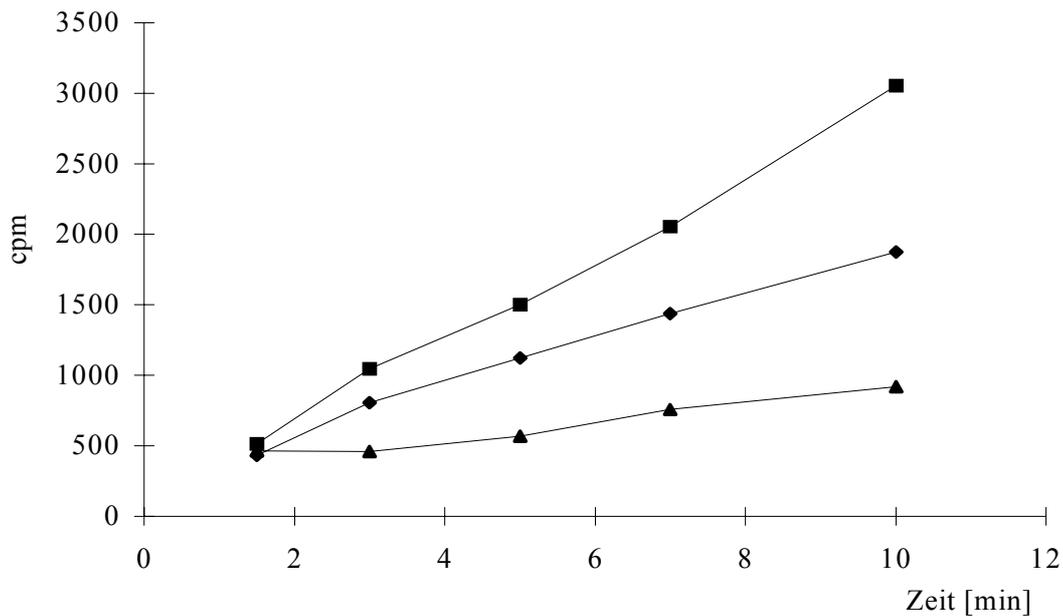


Abbildung 27

Aufnahme von Dopamin in die Thrombozyten

Die eingesetzte Konzentration betrug $1,6 \mu\text{mol/L}$. Quadrate: Gesamtaufnahme in die Tbzs; Dreiecke: unspezifische Bindung in Gegenwart von Paroxetin; Rauten: DA-Aufnahme nach Vorinkubation mit Reserpin d.h. nur über den 5-HT-Transporter bei inhibiertem Vesikel-Transporter.

5.6 MDMA-Aufnahme in die Thrombozyten

Die mögliche Aufnahme von MDMA in die Tbzs wurde im Laufe der Arbeit erst relativ spät untersucht. Zu diesem Zeitpunkt war schon bekannt, dass die eingesetzten Ecstasy-Substanzen die Aufnahme von 5-HT über den SERT und über den Vesikel-Transporter hemmen. Dies konnte als Hinweis dafür gelten, dass diese Substanzen ebenfalls ein Substrat für die Transporter darstellen. Vor allem, da die Hemmung des Membrantransporters kompetitiven Charakter besitzt.

MDMA wurde als Vertreter der Ecstasy-Gruppe gewählt, da es in Hamburg zur Zeit (Stand 2002) der am häufigsten konsumierte Ecstasy-Wirkstoff ist.

Auch in der Literatur wird von einer Aufnahme der Amphetamin-Derivate in das Cytosol ausgegangen, wobei allerdings nur indirekte Beweise durch unterschiedliche Hemmversuche (Rudnick und Wall 1992b; Schuldiner et al. 1993) geführt wurden. Schmidt et al. (1987) untersuchten die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ MDMA in Synaptosomen-

Präparationen von Ratten. Sie fanden keinen Beweis für eine aktive Akkumulation von MDMA und vermuteten einen passiven Mechanismus. Auch Gehlert et al. (1985) postulierten, dass MDMA nicht aktiv in den striatalen Synaptosomen akkumuliert wird. Ebenso wie Johnson et al. (1986) vermuteten sie eine simple Blockade des Uptake-Carrier-Proteins.

Diese widersprüchlichen Angaben sollten anhand des Thrombozyten-Modells genauer untersucht werden. Durch den Einsatz von radioaktiv markiertem MDMA konnte eine mögliche MDMA-Aufnahme direkt überprüft und eine Kinetik erstellt werden.

5.6.1 Aufnahme von MDMA über den Serotonin-Transporter

Zur Überprüfung einer möglichen Aufnahme über den SERT wurde die Methode zur Bestimmung der 5-HT-Aufnahme verwendet (siehe 5.4.2). Allerdings wurde [³H]MDMA in einer Konzentration, die einer Aktivität von 200.000 statt 100.000 cpm/5 µl entsprach, eingesetzt, da mit geringeren Aufnahme-Mengen gerechnet wurde. Der Transport von 5-HT wurde parallel mitbestimmt. Zum einen, um einen direkten Vergleich zu haben, zum anderen, um Fehler, die durch interindividuelle Abweichungen der Tbz-Konzentrate entstehen könnten, auszuschließen.

Das radioaktive 5-HT wurde hierzu ebenfalls in einer Aktivität von ca. 200.000 cpm/5 µl eingesetzt.

5.6.1.1 Unspezifische Bindung

Um die unspezifische Bindung zu bestimmen und vor allem, um zu überprüfen, ob die Aufnahme des MDMA in die Tbz über den SERT erfolgt, wurden parallel Proben angesetzt, in denen

1. Natrium-Ionen-freier Puffer verwendet wurde
2. ein Überschuss unmarkiertes MDMA (0,1 µg/ml) oder
3. Paroxetin zugegeben wurde.

Somit war entweder der Transport mangels Natrium-Ionen nicht möglich (1) bzw. wurde selektiv inhibiert (3) oder das spezifisch aufgenommene [³H]MDMA wurde durch den Überschuss an „kaltem“ MDMA verdrängt (2). Wie bereits unter 5.4.2.1

beschrieben, ist es ein Beweis dafür, dass ein Transport über den SERT erfolgt, wenn die Aufnahme an Radioaktivität geringer ist als unter Kontrollbedingungen.

5.6.1.2 Zeitverlauf

Es wurde ein Zeitverlauf von 20-160 s aufgenommen. Hierbei wurden die Ansätze nach Beendigung der Inkubationszeit direkt auf die Membranfilter gegeben, sofort filtriert und 2x mit eiskalter LiCl-Stopplösung gewaschen, da ein vorheriges Stoppen in eiskalter LiCl-Lösung, wie unter 5.4.1 beschrieben, bei zeitlichen Pipettier-Abständen von 20 s nicht mehr durchführbar war.

Durch die Verringerung der aufgenommenen MDMA-Menge in den Tbz bei Inkubation in Natrium-Ionen-freiem Puffer und durch Paroxetin-Zugabe konnte bewiesen werden, dass MDMA über den selektiven Serotonin-Transporter in die Tbz gelangt.

Überraschenderweise erhöht sich die MDMA-Aufnahme nicht wie erwartet kontinuierlich bis zum Erreichen eines Plateaus. Die aufgenommene MDMA Menge steigt nur über wenige Sekunden an und stagniert dann über die übrige Inkubationszeit, nimmt sogar noch geringgradig ab (Abb. 28).

Eine mögliche Erklärung wäre ein stärkerer Anstieg der unspezifischen Bindung. Dieses ist nicht der Fall, da die unspezifische Bindung, sowohl durch die Paroxetin-Methode als auch durch Aufnahme in einem Lithium-Puffer gewonnen, ebenfalls abfällt.

Die Möglichkeit, dass das aufgenommene MDMA in den Tbz durch die Monoaminoxidase-B abgebaut wird und so der Verlust der aufgenommenen Radioaktivität zu erklären wäre, konnte ebenfalls durch Aufnahme-Versuche mit L-Deprenyl-vorinkubierten Tbz ausgeschlossen werden (Ergebnisse wurden hier nicht dargestellt).

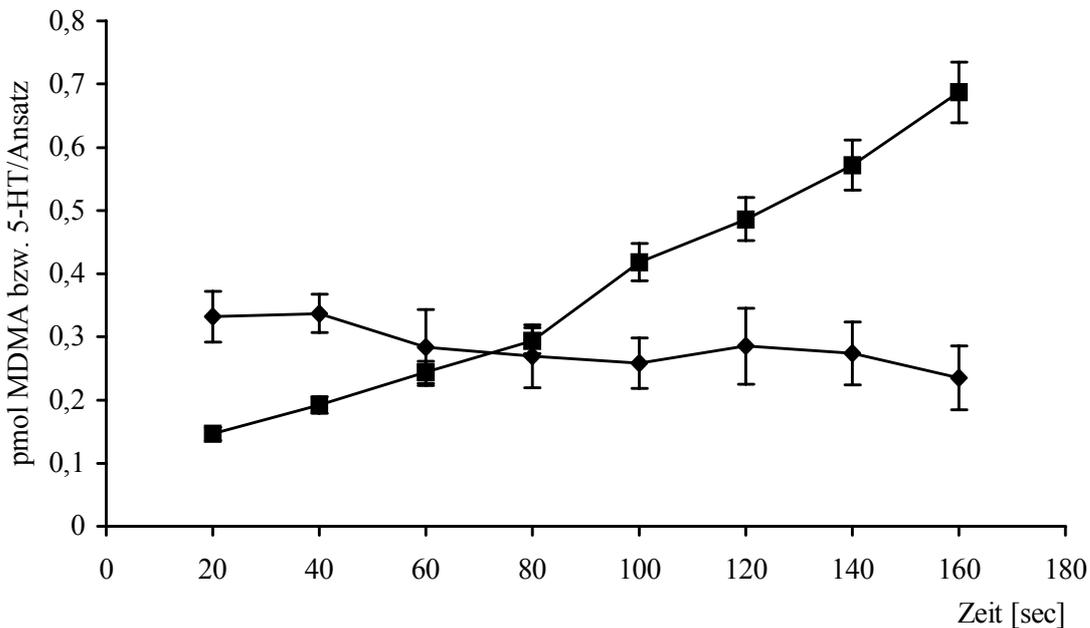


Abbildung 28 **Zeitverlauf der MDMA-Aufnahme in die Tbz (Rauten)**
 Vergleich mit der 5-HT-Aufnahme (Quadrate). Die Versuche wurden jeweils mit dem selben Tbz-Ansatz durchgeführt, die eingesetzten Konzentrationen betragen $0,5 \mu\text{mol/L}$. Die Werte wurden auf 5×10^7 Tbz bezogen

Um die MDMA-Aufnahme mit dem Transport des 5-HT und des DA vergleichen zu können, wurde ebenfalls eine Kinetik erstellt:

5.6.1.3 MDMA-Transport-Kinetik

Die Versuchsbedingungen entsprachen denen der 5-HT-Kinetik-Bestimmung (siehe Methodenteil 3.2.1.5). Da mit einer geringeren MDMA-Aufnahme zu rechnen war, wurde mit höheren MDMA-Konzentrationen gearbeitet ($0,2 - 1,6 \mu\text{mol/L}$). Als Inkubationszeit wurden allerdings nur 10 s und zum Vergleich auch 30 s gewählt, um noch in dem Bereich des MDMA-Anstieges in den Tbz zu bleiben (vergl. Zeitverlauf, Abb. 28).

Durch eine doppelt reziproke Auftragung der Aufnahme-Geschwindigkeit $[1/v]$ gegen die eingesetzte Konzentration $[1/S]$ (Lineweaver-Burk-Plot) konnten die kinetischen Konstanten aus der Graphik abgeschätzt werden.

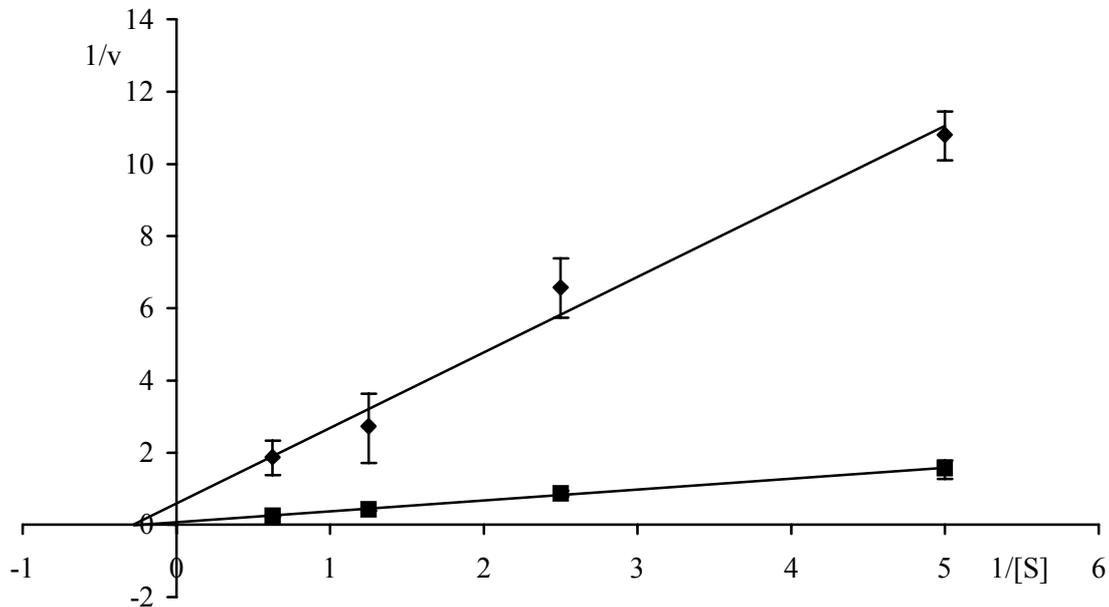


Abbildung 29

MDMA-Kinetik

Die eingesetzten Konzentrationen betragen 0,2-1,6 μmol/L, die Inkubationszeit 10 s (Quadrate) oder 30 s (Rauten). Die Aufnahmegeschwindigkeit in pmol/ 5 x 10⁷ Tbz wurde jeweils auf 1 min berechnet und dann reziprok gegen die Substratkonzentration in μmol/L aufgetragen.

Für den MDMA-Transport in die Tbz ergaben sich folgende Werte (Abb. 29):

Für eine Inkubationszeit von 10 s: $K_m = 3,4 \mu\text{mol/L}$,
 $V_{\text{max}} = 11 \text{ pmol/min}$ (bei 5×10^7 Tbz)

Für eine Inkubationszeit von 30 s: $K_m = 3,5 \mu\text{mol/L}$,
 $V_{\text{max}} = 1,5 \text{ pmol/min}$ (bei 5×10^7 Tbz)

Aus diesen Kinetiken können zwei Schlüsse gezogen werden. Zum einen zeigt es, wie auch bei der Untersuchung des DA-Transportes ersichtlich wurde, dass MDMA zwar als Substrat akzeptiert wird, aber der Transport von 5-HT wesentlich spezifischer erfolgt.

Zum anderen ergibt sich aus dem niedrigeren V_{\max} -Wert bei längerer Inkubationszeit, dass die Aufnahmegeschwindigkeit für das Substrat MDMA bereits nach sehr kurzer Zeit schon deutlich absinkt.

Im Vergleich mit DA kann man eine Reihenfolge der K_m -Werte aufstellen: 5-HT < DA < MDMA, das heißt, die Spezifität nimmt von 5-HT zu MDMA ab.

Da *in vivo* mit deutlich höheren MDMA-Konzentrationen gerechnet werden muss, wurde zur genaueren Untersuchung der MDMA-Kinetik diese zusätzlich mit MDMA-Konzentrationen von 0,3 $\mu\text{mol/L}$ bis 38,4 $\mu\text{mol/L}$ erstellt; die Inkubationszeit betrug 30 s.

Hierbei ergaben sich folgende kinetische Konstanten (Abb. 30):

$$K_m = 8,8 \mu\text{mol/L};$$

$$V_{\max} = 3 \text{ pmol/min (bei } 5 \times 10^7 \text{ Tbz).}$$

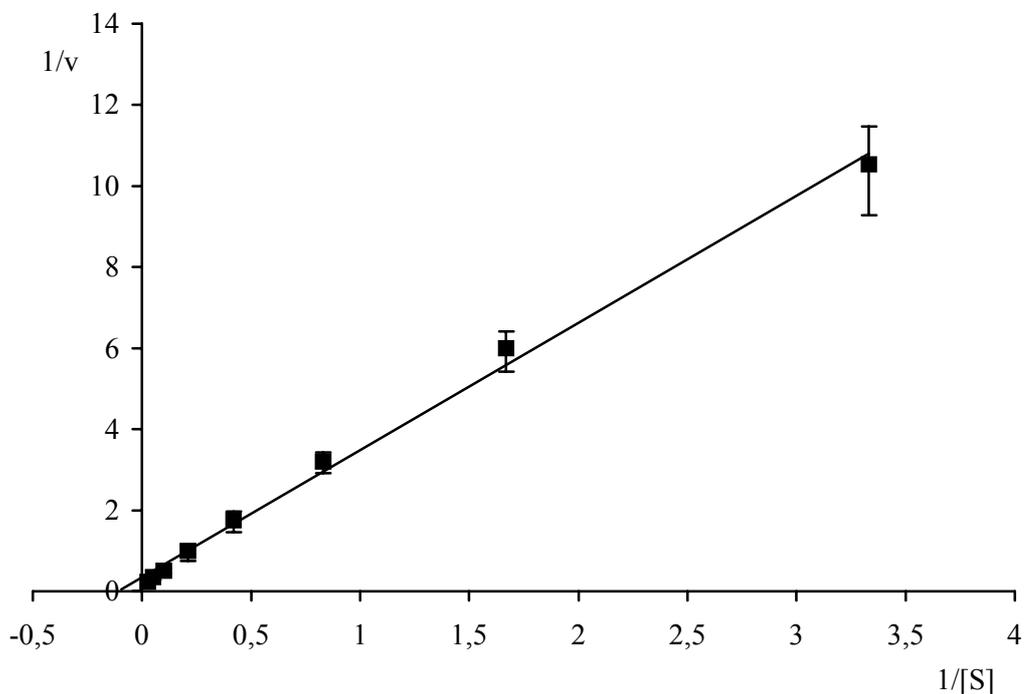


Abbildung 30 MDMA-Kinetik, eingesetzte Konzentration: 0,3 - 38,4 $\mu\text{mol/L}$
 Inkubationszeit: 30 s. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Versuchen +/- Standardabweichung als Lineweaver-Burk-Plot.

5.6.2 MDMA-Aufnahme in die Vesikel

Nachdem gezeigt werden konnte, dass MDMA auch in die Tbz transportiert wird, sollte geklärt werden, ob ebenfalls - wie bei DA und 5-HT - ein Weitertransport in die Speichervesikel erfolgt. Dies sollte ebenfalls durch Einsatz von radioaktiv markiertem MDMA untersucht werden und die Aufnahme-Rate mit den Aufnahme-Raten für DA und 5-HT verglichen werden.

Der Versuch wurde wie auch mit dem Substrat DA durchgeführt (siehe 5.5.2).

Die Aufnahme nach Reserpin-Vorinkubation betrug nur noch 34 % der Gesamt-MDMA-Aufnahme (siehe Abb. 31). Hieraus folgt, dass auch für MDMA ein aktiver Transport in die Speichervesikel über den Vesikel-Transporter stattfindet. Das Verhältnis der cytosolischen zur Gesamtaufnahme für 5-HT und MDMA ist fast gleich.

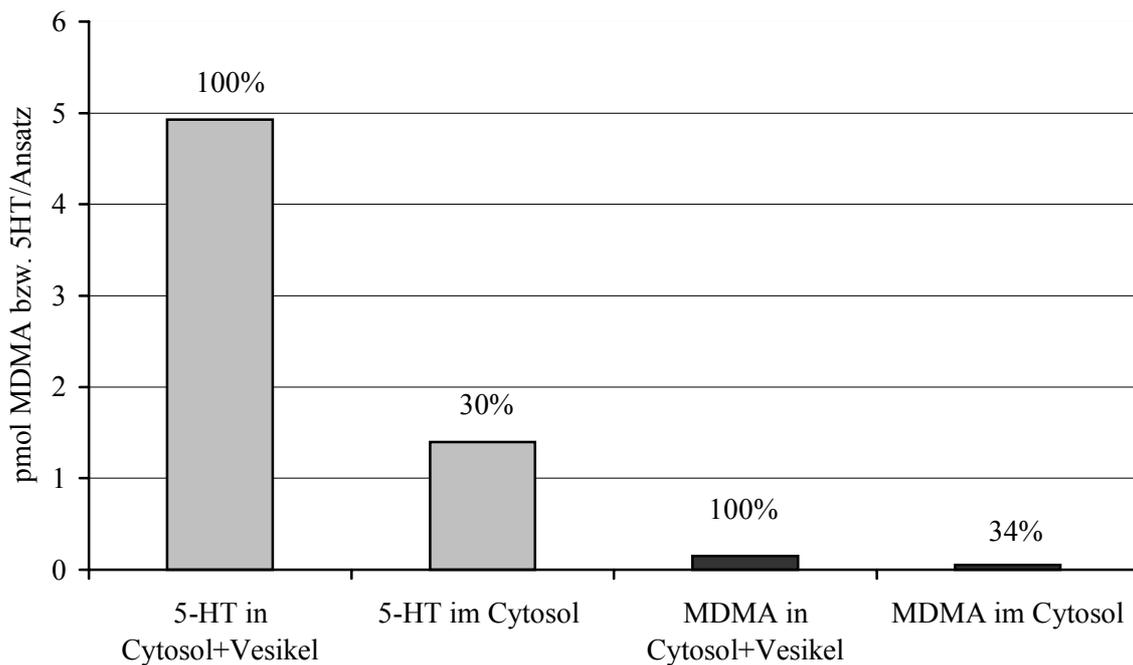


Abbildung 31

Aufnahme von 5-HT (hellgrau) oder MDMA (dunkelgrau)

Entweder in das Cytosol und die Vesikel (also ohne Reserpin-Zusatz) oder nur in das Cytosol (mit Reserpin-Vorinkubation). Die eingesetzten Konzentrationen waren 0,6 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT und 2 $\mu\text{mol/L}$ MDMA, die Inkubationszeit betrug 15 min, ein Ansatz entsprach 5×10^7 Tbz.

Obwohl eine fast dreifach höhere MDMA-Konzentration für diese Untersuchung eingesetzt wurde, war die 5-HT-Aufnahme in die Tbz ca. 30 x höher als die MDMA-Aufnahme, wodurch die Selektivität des Transporters erneut deutlich wird.

Da die MDMA-Aufnahme in die Tbz, wie bereits dargestellt, nach sehr kurzer Zeit nicht mehr ansteigt, wurde die Vesikel-Transport-Aufnahme zusätzlich mit einer Inkubationszeit von 30 s statt 15 min durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die MDMA-Aufnahme in das Cytosol ca. 1,9 x höher als nach 15 min war, die Gesamtaufnahme war 1,5 x höher als bei der deutlich längeren Reaktionszeit (nicht graphisch dargestellt). Dies deckt sich mit den Ergebnissen des Zeitverlaufes (siehe Abb. 28).

5.7 Monoaminoxidase-B-Aktivität

Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen belegt, setzt Ecstasy neben 5-HT auch große Mengen an DA aus den dopaminergen Nervenbahnen frei (Colado und Green 1994; Johnson et al. 1986; Nash 1990; Schmidt et al. 1987; Stone et al. 1987b).

Es konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass DA in die serotoninergeren Nervenendigungen gelangen kann (siehe 5.4.5). Dort kann es als primäres Amin durch die dort vorhandene Monoaminoxidase-B (MAO-B) nach der folgenden Reaktionsgleichung metabolisiert werden (Vindis et al. 2001):



Von Interesse war deshalb, ob die ebenfalls in die Nervenenden aufgenommenen Ecstasy-Substanzen als primäre oder sekundäre Amine einen Einfluss auf dieses Enzym haben.

Das Isoenzym Monoaminoxidase-A ist vorwiegend in Zellgruppen des Gehirns nachzuweisen, die Katecholamine enthalten, einschließlich Substantia Nigra, Nucleus Locus Coeruleus, Nucleus Subcoeruleus und der periventriculären Region des Hypothalamus. MAO-B kommt vor allem in den serotoninergeren Regionen,

einschließlich Nucleus Raphe Dorsalis und Nucleus Centralis Superior vor (Westlund et al. 1985).

Zur Untersuchung der MAO-B-Aktivität konnten weiterhin humane Tbz verwendet werden, da sie - ebenso wie die serotoninergeren Nervenbahnen - nur die Isoform B enthalten und die Enzyme in Tbz und Neuronen dieselben biochemischen Eigenschaften aufweisen (Brusova 1983; Christ et al. 1976; Hussein et al. 1995; Murphy und Donnelly 1974; Youdim 1988), somit also geeignete und anerkannte Modelle zur Untersuchung der MAO-B sind.

5.7.1 Entwicklung einer Methode und Optimierung der Reaktionsparameter

Um den Einfluss der Ecstasy-Substanzen auf die MAO-B der Tbz untersuchen zu können, wurde die Bestimmungsmethode nach Krajl (1965) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Weiterentwicklung des Verfahrens von Weissbach (Weissbach et al. 1960, zit. nach Krajl 1965), bei dem ebenfalls Kynuramin als MAO-B-Substrat eingesetzt wird. Es wird hier jedoch nicht die Abnahme der optischen Dichte, sondern die Fluoreszenz-Zunahme bestimmt, denn der primär durch oxidative Desaminierung gebildete Aldehyd cyclisiert in alkalischem Milieu zum 4-Hydroxyquinolin (4-HOQ), das fluorimetrisch quantifiziert werden kann (Abb. 32).

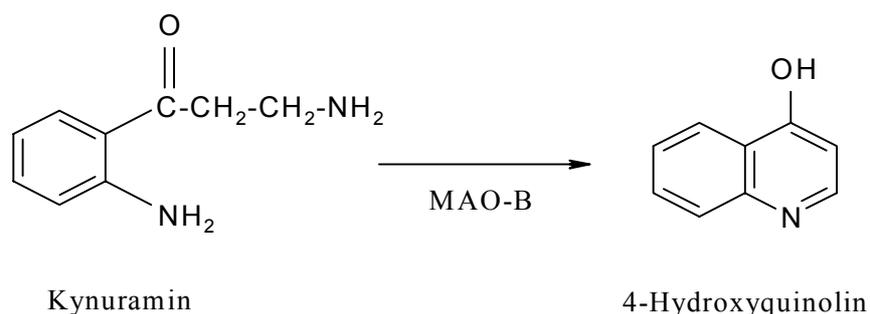


Abbildung 32 **Bildung des 4-HOQ durch MAO-B**

Folgende Methoden-Parameter wurden auf ihre Optimierungs-Möglichkeiten überprüft:

Cosubstrat

Die MAO ist ein membranständiges Enzym der Mitochondrien, das sein Cosubstrat FAD/FADH₂ kovalent gebunden hält. Aus diesem Grunde ist eine zusätzliche externe Zugabe des Cosubstrates nicht nötig (Daya et al. 1992; Hussein et al. 1995).

Aufreinigung des Enzyms

In der Literatur wurden zahlreiche Isolations-Methoden beschrieben (Collins und Sandler 1971; Corbett 1989; Daya et al. 1992). Eine Aufreinigung der MAO-B wäre sehr aufwändig, weil es sich um ein membrangebundenes Enzym handelt. Nach Collins und Sandler (1971) hat eine Aufreinigung der MAO der Tbz eine ca. 6-fache Erhöhung der Enzymaktivität zur Folge. Laut Corbett (1989) ist eine Anreicherung des Enzyms sinnvoll, eine Isolierung aber nicht notwendig. Nachdem in dieser Arbeit erste Versuche mit lysierten und gewaschenen Tbz genügend empfindlich gemessen werden konnten, wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet.

pH-Wert

Zur Testung des pH-Optimums und Prüfung der Anfälligkeit der Reaktion gegenüber pH-Wert-Änderungen wurden Messungen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass bereits kleine pH-Wert-Änderungen um 0,2 Einheiten den Umsatz an Kynuramin beeinflussten (siehe Abb. 33). Da der pH-Wert der Original-Methode von pH 7,4 im physiologischen Bereich lag, wurde dieser beibehalten.

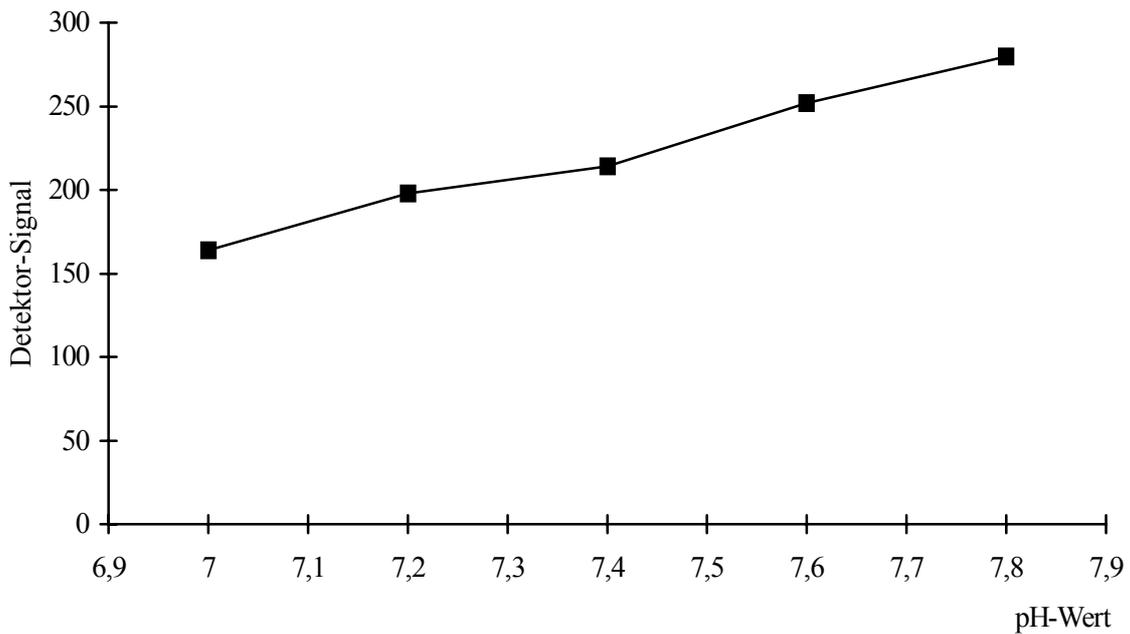


Abbildung 33 **Abhängigkeit der Kynuramin-Umsetzung vom pH-Wert**

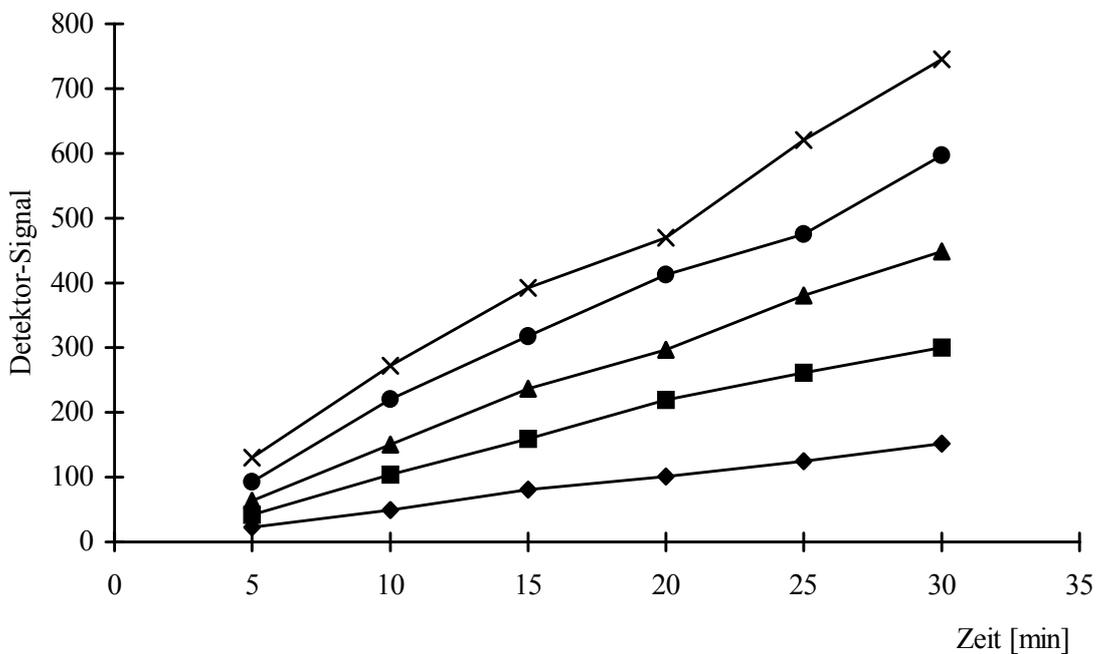


Abbildung 34 **Einfluss der Protein-Menge auf die Bildung von 4-HOQ**
 (Rauten: 0,2 mg/ml; Quadrate: 0,4 mg/ml; Dreiecke: 0,6 mg/ml;
 Kreise: 0,8 mg/ml; Kreuze: 1,0 mg/ml)

Linearität der Reaktion in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration

Es wurde mit fünf Enzym-Ansätzen, die Protein-Mengen von 0,2 - 1,0 mg/ml enthielten, die Kynuramin-Umsatzraten über 30 min bestimmt, um einen möglichen Einfluss der Enzym-Menge auf die Aktivität zu untersuchen. Alle Graphen verliefen parallel, die Umsatzraten waren unabhängig von der Protein-Menge. Somit wurde für die folgenden Versuche 0,6 mg/ml Protein eingesetzt, da die resultierenden Fluoreszenz-Werte gut im Messbereich des Detektors lagen (Abb. 33).

Inkubationszeit

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Oxidationsrate von der Inkubationszeit wurde eine Enzym-Präparation mit 0,6 mg Protein/ml mit einer hohen Kynuramin-Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ inkubiert und die gebildete 4-HOQ-Menge über 30 min gemessen. Die Kynuramin-Umsetzung verlief über 20 min linear (Abb. 35). Für die folgenden Hemmversuche wurde deshalb eine Inkubationszeit von 15 min festgelegt.

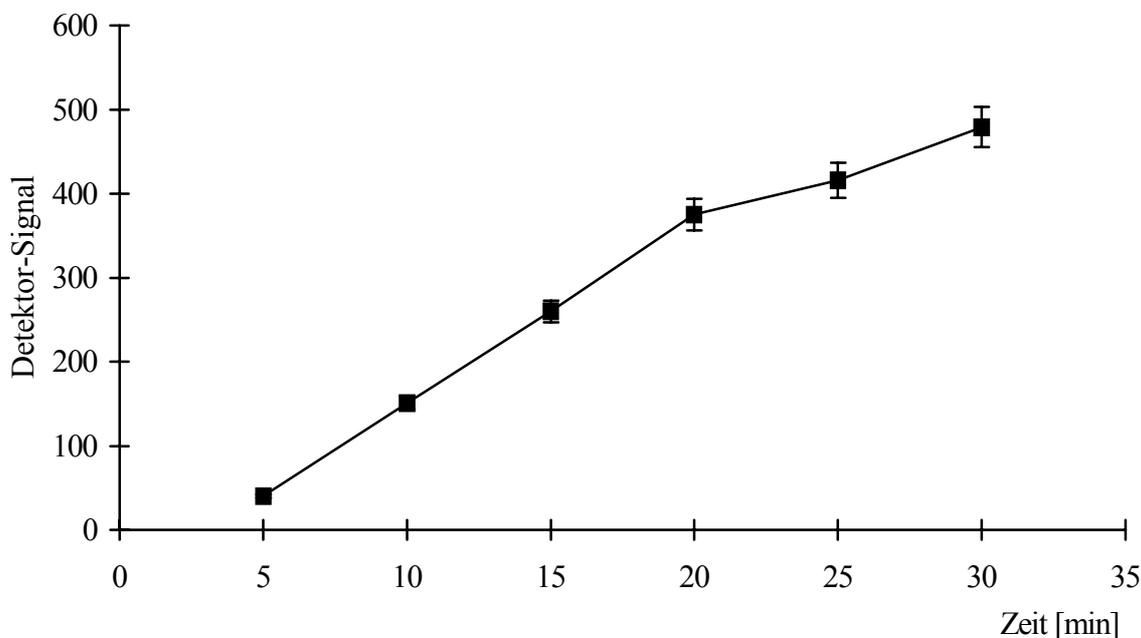


Abbildung 35

Zeitverlauf der Kynuramin-Umsetzung durch MAO-B

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei getrennten Versuchen. Eingesetzt wurden 100 $\mu\text{g/ml}$ Kynuramin.

Eichkurve

Da die Kynuramin-Umsetzung durch Zugabe von 10 %iger Trichloressigsäure (TCA) gestoppt wurde, musste deren Einfluss auf die Fluoreszenz abgeklärt werden. Es stellte sich heraus, dass die Fluoreszenz auf $\frac{1}{4}$ des ursprünglichen Wertes gequencht wird. Dies deckte sich mit den Angaben von Krajl (1965). Aus diesem Grunde wurde die Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Eichkurve genauso wie die Proben behandelt und jeweils 2 ml TCA 10 %ig zur Probe gegeben (Abb. 36). Es wurde eine Eichkurve mit 1,0 - 10,0 μg 4-HOQ/Ansatz erstellt. Der Korrelationskoeffizient war 0,999.

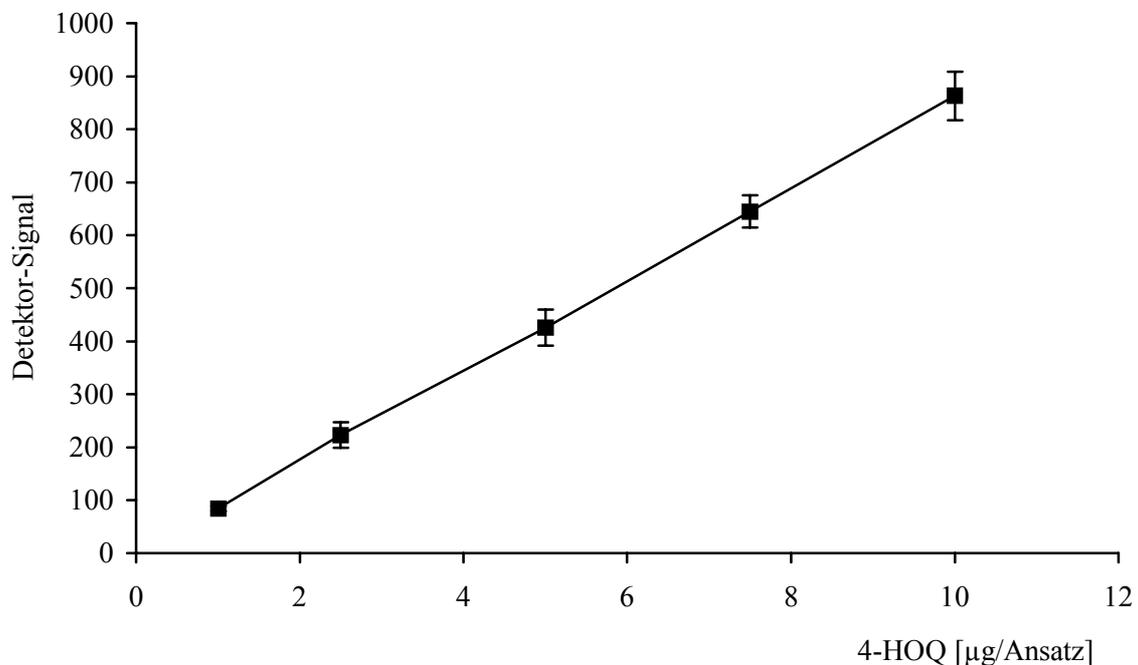


Abbildung 36 Eichkurve für 4-Hydroxyquinolin (4-HOQ), mit TCA versetzt
Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von drei getrennten Versuchen

5.7.2 Kinetische Konstanten der MAO-B in den Thrombozyten

Die kinetischen Konstanten für den Abbau von Kynuramin ergaben sich aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 37): $K_m = 19 \mu\text{mol}/\text{L}$;

$$V_{\max} = 0,5 \mu\text{g}/\text{mg Protein}/\text{min}$$

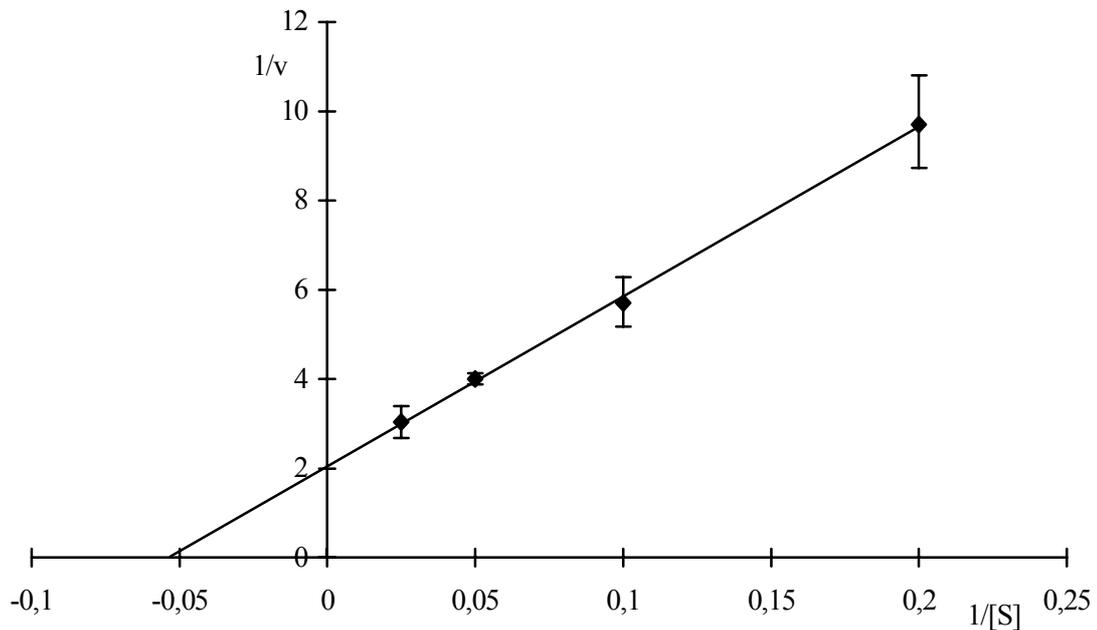


Abbildung 37 Kinetik des Abbaus von Kynuramin durch die MAO-B der Tbz Aufgetragen als Lineweaver-Burk-Plot sind die Mittelwerte +/- SD von drei getrennten Versuchen: $1/v$ ($v = 4\text{-HOQ}/\text{min}$ pro 1mg Protein gegen die reziproke Kynuramin-Konzentration in $\mu\text{mol}/\text{L}$).

Eine Überprüfung der eingesetzten Methode ergab, dass die ermittelte Michaelis-Konstante für das verwendete Substrat Kynuramin ($K_m = 19 \mu\text{mol}/\text{L}$) im Vergleich mit dem Wert von Collins und Sandler (1971) (K_m für Kynuramin = $38,5 \mu\text{mol}/\text{L}$) in einem ähnlichen Bereich lag. Dies widerspricht der Angabe der Autoren, dass Ergebnisse, die mit nicht-isolierter MAO (also mit Tbz-Lysat) gewonnen werden, nicht so genau sein sollen wie mit aufgereinigtem Enzym gewonnene Ergebnisse (da das aufgereinigte Enzym ca. 5-6 x aktiver sei). Somit stellte sich diese Methode als geeignet heraus.

Ein Vergleich des V_{\max} -Wertes war nicht möglich, da er in der Arbeit von Collins und Sandler als prozentualer Wert in Bezug auf den Abbau von Benzylamin angegeben wurde.

5.7.3 Hemmung der MAO-B-Aktivität

Der Einfluss der Ecstasy-Substanzen auf die MAO-B-Aktivität sollte untersucht werden. Hierzu wurde das jeweilige Agens in einer Konzentration von 0,08 mmol/L und 0,16 mmol/L zum Tbz-Lysat gegeben und bei 37°C 30 min vorinkubiert. Zur Bestimmung des Blindwertes wurde Puffer statt Agens eingesetzt. Nach der Vorinkubation wurde Kynuramin in einer Menge von 20 bzw. 40 µg absolut zum Ansatz gegeben und weitere 15 min inkubiert.

Zusätzlich zu den bereits zuvor eingesetzten Inhibitoren wurde DA als Vergleich mitbestimmt. Außerdem wurde eine mögliche Störung durch 5-HT abgeklärt. Des Weiteren wurde überprüft, ob das gleichzeitige Einwirken von DA zusammen mit einer Ecstasy-Substanz (MDMA) einen anderen Effekt auf die MAO-B-Aktivität hat als die Einzelsubstanzen.

Alle untersuchten Amine haben eine hemmende Wirkung auf die MAO-B-Aktivität. Die ermittelten K_i -Werte sind in Tab 5 zusammengefasst.

Tabelle 5 Hemmung der MAO-B-Aktivität

| Inhibitor | MDMA | MDA | MDEA | MBDB | AMPH | METH | DA |
|----------------------|------|-----|------|------|------|------|-----|
| K_i -Wert [µmol/L] | 58 | 150 | 90 | 47 | 84 | 96 | 159 |

Die Reihenfolge der Hemmstärken ist:

MBDB > MDMA > AMPH > MDEA > METH > DA > MDA.

Da die Unterschiede der K_i -Werte eher gering sind, scheint eine Einteilung in drei Gruppen allerdings als sinnvoller:

MBDB \approx MDMA > AMPH \approx MDEA \approx METH > DA \approx MDA.

Wie aus den folgenden Dixon-Plots ersichtlich ist, hemmen alle Substanzen das Enzym kompetitiv (Abbildungen 38 - 44).

5-HT hatte in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Enzym-Aktivität. Dies war nicht anders erwartet worden, da es kein natives Substrat für MAO-B ist und hier nur als Kontrolle diente.

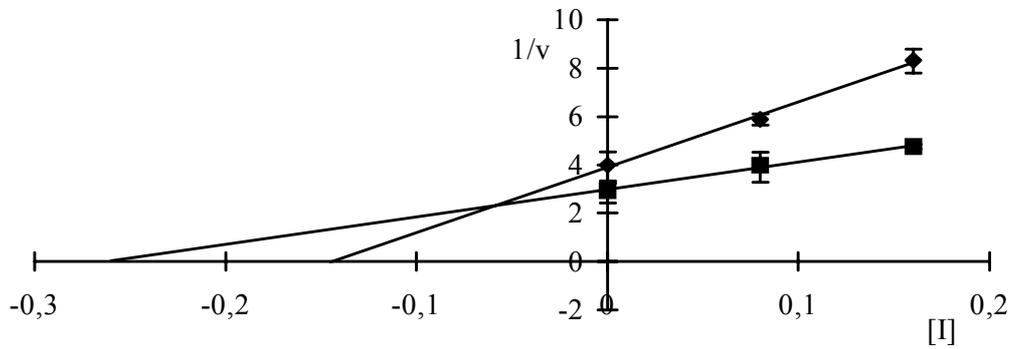


Abbildung 38 Hemmung der Monoaminoxidase-B durch MDMA

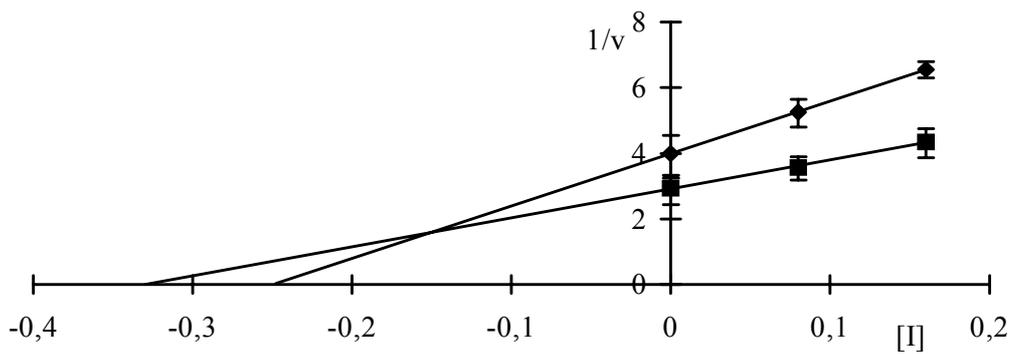


Abbildung 39 Hemmung der Monoaminoxidase-B durch MDA

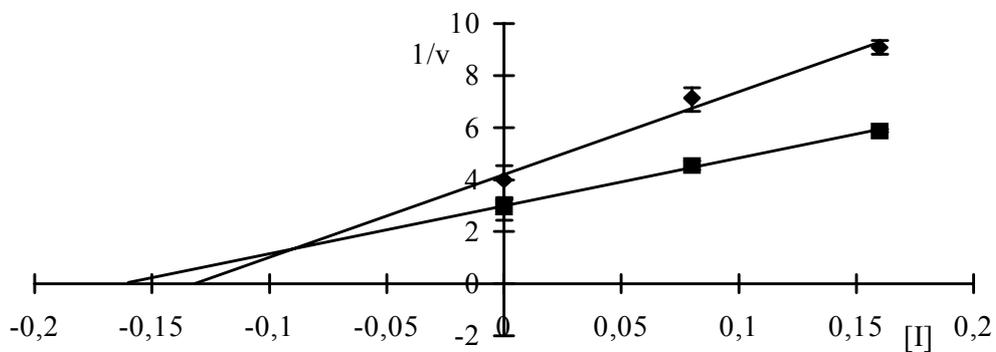


Abbildung 40 Hemmung der Monoaminoxidase-B durch MDEA

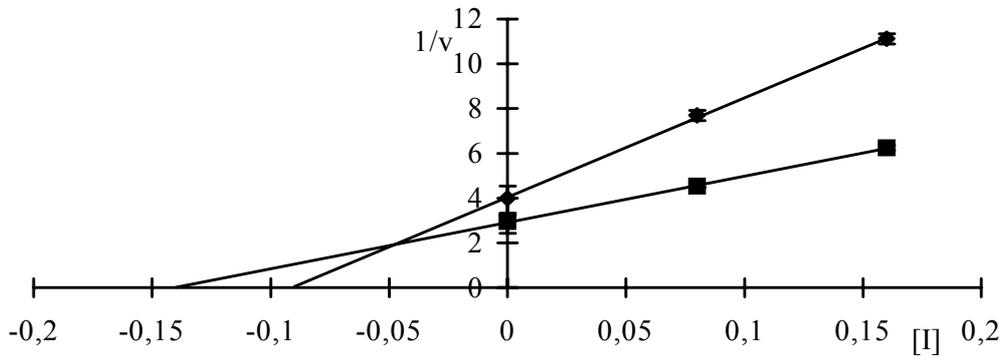


Abbildung 41 Hemmung der Monoaminoxidase-B durch MBDB

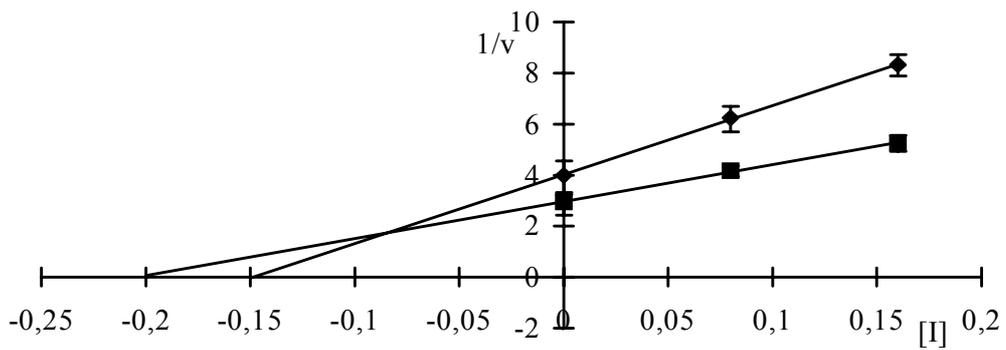


Abbildung 42 Hemmung der Monoaminoxidase-B durch Amphetamin

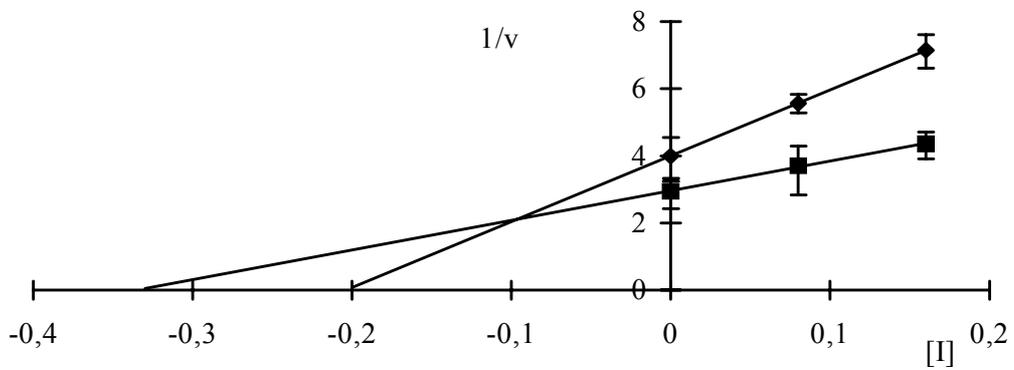


Abbildung 43 Hemmung der Monoaminoxidase-B durch Methamphetamin

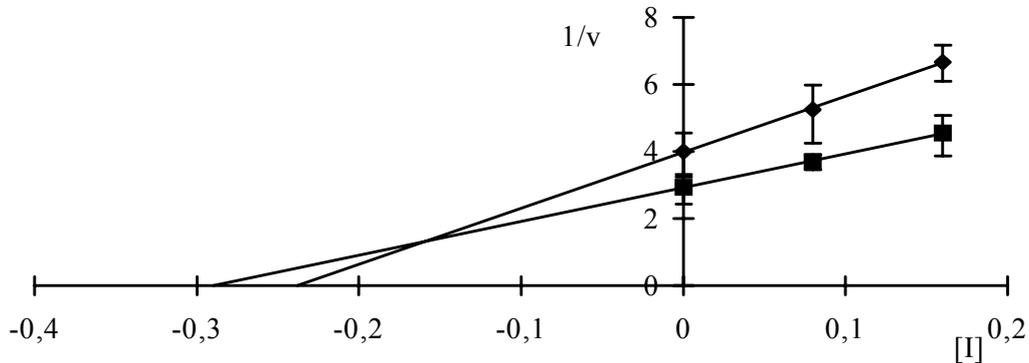


Abbildung 44 Hemmung der Monoaminoxidase-B durch Dopamin

Bei gleichzeitigem Einwirken von DA und MDMA stellte sich heraus, dass je 0,08 mmol/L der beiden Substanzen zusammen einen hemmenden Effekt haben, der im Bereich der doppelten Konzentration einer der beiden Substanzen alleine liegt. Es handelt sich somit nur um eine additive Wirkung. Eine Potenzierung der Effekte war nicht zu erkennen. Auch der kompetitive Hemm-Typ wurde ebenfalls beibehalten. Ähnliches wurde auch für das gleichzeitige Einwirken von MDMA und Fluoxetin gezeigt (Kokotos-Leonardi und Azmitia 1994).

5.7.4 Reversibilität der Hemmung

Nachdem bewiesen worden war, dass alle Ecstasy-Substanzen die MAO-B kompetitiv inhibieren und die Hemmkonstanten bestimmt worden waren, war es von Interesse, ob die Hemmung reversiblen Charakter hatte.

Hierzu wurde die Methode von Scorza et al. (1997) modifiziert: Durch Auswaschen des Inhibitors nach der Inkubation soll eine reversible Hemmung wieder aufgehoben werden.

Die Tbz-Lysate wurden mit MDMA (als Beispielsubstanz für Ecstasy), Methamphetamin (für die Gruppe der Weckamine), Deprenyl (als nicht kompetitiver Inhibitor der MAO-B ($K_i = 1$ nmol/L) (Kotokos-Leonardi und Azmitia 1994)) oder H_2O (als Vergleich) behandelt.

Es stellte sich heraus, dass die Hemmung durch MDMA und Methamphetamin im Gegensatz zur Deprenyl-Inhibition durch Waschen der Tbz-Präparationen aufgehoben werden kann (Abb. 45), beide Substanzen also kompetitive reversible Inhibitoren sind.

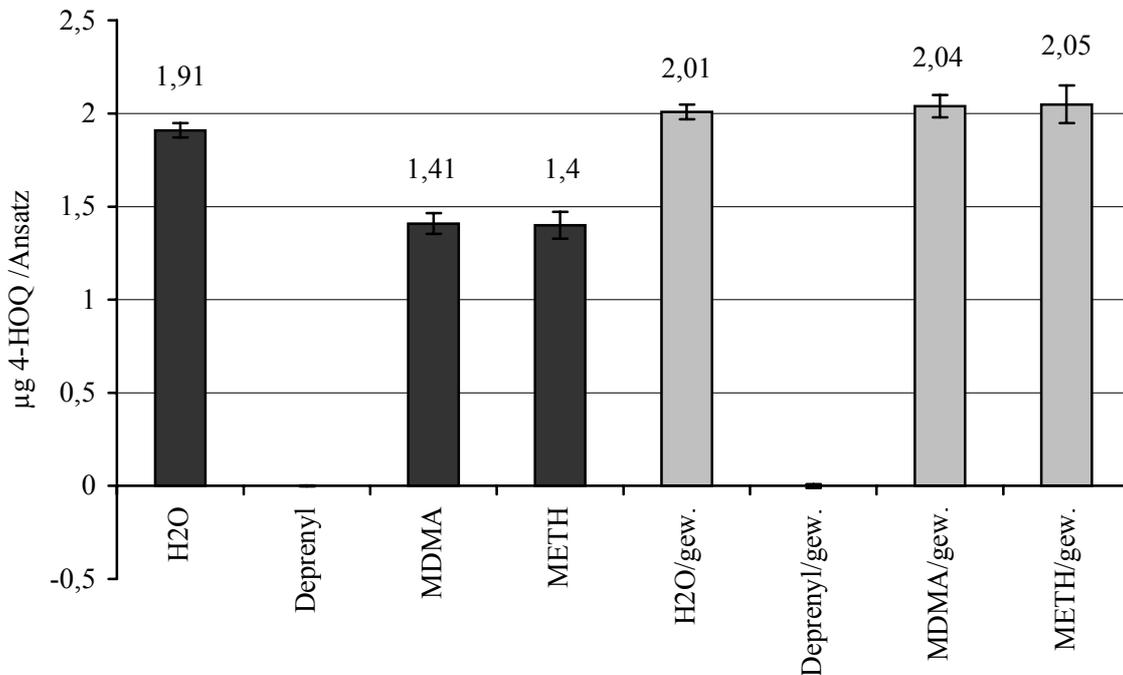


Abbildung 45 Reversibilität der MAO-Hemmung bei verschiedenen Inhibitoren

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von drei getrennten Versuchen, ein Ansatz entsprach 6 mg Protein (in 1 ml).

5.8 Integrität der Thrombozyten-Membran

Eine mögliche Erklärung für das Phänomen, dass MDMA zuerst sehr schnell in die Tbz aufgenommen wird, die aufgenommene Menge danach aber wieder abnimmt (siehe 5.6.1), wäre, dass MDMA eine Schädigung der Tbz-Membran bewirkt, die ein Austreten des Substrates aus dem Cytosol zur Folge hat.

Um die Membran-Integrität nach MDMA-Einfluss zu überprüfen, musste ein geeigneter Cytotoxizitäts-Assay gefunden werden.

5.8.1 Auswahl einer geeigneten Methode

Eine Störung der Membran-Integrität ist ein Indiz für eine Zell-Schädigung. In der Literatur finden sich verschiedene Methoden zur Bestimmung der Cytotoxizität: In dieser Arbeit wurde zur Bestimmung der Membran-Integrität der Tbz nach MDMA-Einwirkung der Lactat-Dehydrogenase-Test der Firma Roche Diagnostics (Cytotoxicity Detection Kit) eingesetzt.

Der Test beruht auf dem Verfahren, dass die Proben nach Inkubation mit der zu untersuchenden Substanz zentrifugiert werden und die Lactat-Dehydrogenase-Aktivität im Überstand bestimmt wird. Hierzu wird die enzymatische Reaktion (Umsetzung von Lactat zu Pyruvat durch die Lactat-Dehydrogenase) mit der Bildung eines roten Formazan-Farbstoffes aus einem Tetrazoniumsalz gekoppelt. Die Menge des Formazans wird photometrisch bestimmt (Mosman 1983; Vanhee et al. 1993).

In der Literatur ist belegt, dass ein erhöhtes Auftreten von Lactat-Dehydrogenase (LDH) außerhalb der Tbz ein Marker für eine Zellschädigung ist (Klener et al. 1977) und nicht durch die Tbz-Aggregation beeinflusst wird (Barber und Jamieson 1970; Knight et al. 1982; Mäkelä und Isomaa 1992); somit ist der Test auch für diese Fragestellung geeignet.

Andere Methoden, bei denen z.B. durch Zugabe von Farbstoffen geschädigte Zellen angefärbt werden können (Tiffany-Castiglioni et al. 1980) oder die Freisetzung radioaktiv markierter Substanzen, mit denen die Zellen vorher beladen wurden (z.B. ^{43}K oder ^{14}C]5-HT), bestimmt wird (Mäkelä und Isomaa 1992), wurden aufgrund einer möglichen Beeinflussung durch die Tbz-Aggregation und anderer Nachteile nicht eingesetzt.

5.8.2 Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität

Der Effekt unterschiedlicher MDMA-Konzentrationen auf die Membran der Tbz sollte überprüft werden. Dazu wurden sie mit den zu untersuchenden Substraten inkubiert und der Austritt der LDH bestimmt. Als Kontrollen wurden bei jedem Versuch folgende Ansätze mitbestimmt (siehe auch Tab. 6; Methodenteil 3.7.1):

1. Background-Kontrolle
2. Substanz-Kontrolle

3. Low-Kontrolle
4. High-Kontrolle

Die Differenz zwischen der Low- und der High-Kontrolle entspricht der maximal möglichen Freisetzung an Lactat-Dehydrogenase und wurde gleich 100 % gesetzt.

Da es sich um ein kommerzielles Test Kit handelt, bedurfte es keiner Optimierung der Methode. Allerdings musste vor Versuchbeginn die Anzahl der eingesetzten Tbz bestimmt werden, da dies jeweils vom LDH-Gehalt der Zellen abhängig ist.

Tbz-Konzentration

Zur Bestimmung der LDH-Freisetzung mittels Test Kit musste zunächst die optimale Zell-Konzentration bestimmt werden, da alle Zelltypen unterschiedlich große LDH-Mengen enthalten. Die Differenz zwischen High- und Low-Kontrolle sollte möglichst groß sein, um sensitive Messungen zu gewährleisten, die Absorption der High-Kontrolle aber noch im optimalen Messbereich des Photometers liegen. Es wurden aus drei verschiedenen Tbz-Konzentrationen Verdünnungsreihen angesetzt und jeweils als Dreifach-Bestimmung einmal mit Puffer und einmal mit Triton X-100 1 %ig inkubiert. Eine Thrombozytenmenge von ca. $70-80 \times 10^3/\mu\text{l}$ erwies sich als geeigneter Messbereich (siehe Abb. 46).

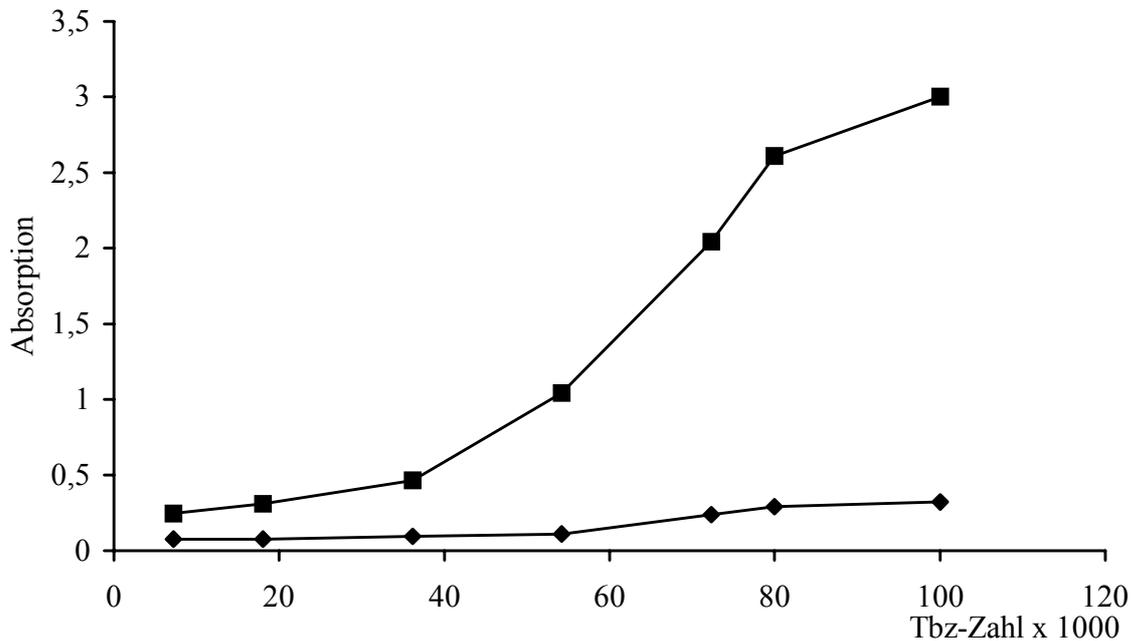


Abbildung 46 **Auswahl der geeigneten Thrombozytenmenge**
 Rauten: Inkubation mit Puffer (Low-Kontrolle),
 Quadrate: Inkubation mit Triton X-100, 1 %ig (High-Kontrolle).

Folgende Substanzen wurden auf ihre membranschädigende Wirkung untersucht: MDMA, 5-HT und DA. Außerdem wurden [³H]MDMA und Ethanol (als Lösungsmittel des radioaktiven MDMA) überprüft.

Die Substanz-Kontrollen von 5-HT, MDMA, Ethanol und [³H]MDMA zeigten, dass keine Interferenzen mit dem Assay auftraten (siehe Tab. 6).

Für die Überprüfung der Cytotoxizität wurden 5-HT und MDMA in Konzentrationen von 0,01 bis 100,0 µg/ml eingesetzt. Bei allen Ansätzen ergab sich eine Cytotoxizitätsrate von 0 %.

Ethanol hatte in der eingesetzten Menge von 2 µl/ml (die Konzentration, die in den Aufnahme-Assays durch Zugabe des radioaktiven Agens - in Ethanol gelöst - auftritt) eine vernachlässigbare minimale Membranschädigung von ca. 2 % zur Folge. [³H]MDMA, das in Ethanol gelöst ist, hatte in derselben Konzentration einen cytotoxischen Effekt von ca. 1,4 %, der somit durch den Lösungsmittel-Einfluss erklärt werden kann.

Tabelle 6**Cytotoxizitätstest**

Absorption der verschiedenen Ansätze; Dreifachbestimmungen:
Mittelwerte +/- Standardabweichung

| Ansatz | Absorption | Ansatz | Absorption |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------|
| Background (Puffer+Puffer) | 0,059 ± 0,01 | Low-Kontrolle (Puffer+Tbz) | 0,208 ± 0,02 |
| Triton-Kontrolle (Triton 1 %+Puffer) | 0,140 ± 0,07 | High-Kontrolle (Triton 1 %+Tbz) | 2,201 ± 0,01 |
| MDMA-Kontrolle (MDMA 100µg/ml+Puffer) | 0,058 ± 0,01 | MDMA (MDMA 100µg/ml+Tbz) | 0,171 ± 0,01 |
| 5-HT-Kontrolle (5-HT 100µg/ml+Puffer) | 0,061 ± 0,01 | Serotonin (5-HT 100µg/ml+Tbz) | 0,169 ± 0,01 |
| DA-Kontrolle (DA 100µg/ml+Puffer) | 3,570 ± 0,004 | Dopamin (DA 100µg/ml+Tbz) | 0,364 ± 0,04 |
| DA-Kontrolle (DA 1µg/ml+Puffer) | 0,124 ± 0,003 | Dopamin (DA 1µg/ml+Puffer) | 0,351 ± 0,05 |
| Ethanol-Kontrolle (Ethanol 2µl/ml+Puffer) | 0,078 ± 0,004 | Ethanol (Ethanol 2µl/ml+Tbz) | 0,242 ± 0,004 |
| [³ H]MDMA-Kontrolle ([³ H]MDMA 2µl/ml+Puffer) | 0,060 ± 0,010 | [³ H]MDMA ([³ H]MDMA 2µl/ml+Tbz) | 0,236 ± 0,002 |

Bei der Untersuchung von DA stellte sich heraus, dass es ab einer Konzentration von 1 µg/ml den Versuch stört, d.h., die Absorption der Substanz nur mit Puffer (= Substanz-Kontrolle) lag über dem Background-Wert, bei höheren Konzentrationen sogar über dem Wert der High-Kontrolle, der der maximalen LDH-Freisetzung entspricht.

Die Cytotoxizität von DA bei den niedrigeren Konzentrationen (0,01 und 0,1 µg/ml) entspricht 0 %. Da bis zu einer Konzentration von 1 µg/ml DA die Absorption nicht über der Absorption der Low-Kontrolle liegt, kann man davon ausgehen, dass DA *per se* nicht membranschädigend wirkt.

Es muss aus diesen Versuchen aber geschlussfolgert werden, dass der LDH-Test nicht zur Untersuchung von DA geeignet ist.

5.9 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktive Intermediäre Sauerstoffspezies (RIO) (auch: reaktive Sauerstoff-Intermediate (ROI)) (De La Harpe und Nathan 1985) sind unvollständig reduzierte Formen des Sauerstoffs, z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Superoxid (O_2^-). Sie können in Anwesenheit von redox-aktiven Metall-Ionen wie z.B. Fe^{3+} Hydroxyl-Radikale produzieren (OH^\cdot) und sind somit potentiell cytotoxisch. Andere Quellen für Sauerstoffradikale sind u.a. die mitochondriale Atmungskette oder der Katecholamin-Stoffwechsel, im Prinzip alle Enzyme, die Ein-Elektronen-Übergänge katalysieren.

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht nativ in den Zellen, wie z.B. bei der Reduktion von Sauerstoff über das Superoxid-Radikal. Es kann dann weiter zum Hydroxylionen-Radikal und schließlich zum Wasser reduziert werden (Abb. 47).

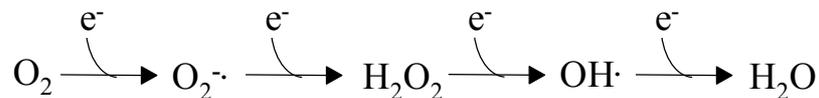


Abbildung 47 **Entstehungsweg reaktiver Sauerstoffspezies**

Die Bildung der Sauerstoffspezies steht im Gleichgewicht mit antioxidativen Schutzsystemen (z.B. dem Glutathionsystem) der Zellen. Durch eine exzessive Produktion von RIO werden jedoch die körpereigenen Redox-Mechanismen überlastet und die Sauerstoffspezies können eine Oxidation der Membranlipide verursachen. Gerade das Gehirn ist besonders vulnerabel für oxidative Schäden, da es große Mengen an Sauerstoff verbraucht und relativ große Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren aufweist. Zudem sind dort viele oxidative Enzyme, wie z.B. MAO-A und MAO-B, die zu den stärksten H_2O_2 -bildenden Enzymen gehören, lokalisiert (Youdim und Lavie 1994).

Viele jüngere Studien vermuten deshalb oxidative Schäden als einen wichtigen Faktor auch bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen (Mohanty et al. 1997; Pizzinat et al. 1999).

Wie eingangs in der Schädigungs-Hypothese dargestellt, wird vermutet, dass DA in die 5-HT-Nervenendigungen gelangt und dort durch die DA-Oxidation (Autoxidation und Deamination) H_2O_2 entsteht, dies weiter zum besonders reaktiven OH^\cdot reagiert, wodurch es dann zu einer Lipoperoxidation in den serotoninerger Neuronen kommt.

Da bereits bewiesen wurde, dass DA in die Nervenendigungen gelangen kann (siehe 5.4.5), sollte in diesem Teil der Arbeit untersucht werden, ob durch die Oxidation von DA durch die dort vorhandene MAO-B Wasserstoffperoxid entsteht. Außerdem sollte der Einfluss von MDMA auf die H_2O_2 -Generation überprüft werden. Zum einen war hier interessant, ob MDMA selbst RIO generiert (z.B. durch Entkopplung der MAO-B) (da es die MAO-B inhibiert (siehe 5.7.3), liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei ebenfalls um ein Substrat für dieses Enzym handelt), zum anderen sollte ein möglicher Effekt auf die H_2O_2 -Entstehung aus dem DA-Abbau untersucht werden.

5.9.1 Auswahl einer geeigneten Methode

Von den intrazellulär entstehenden Oxidantien ist H_2O_2 das stabilste und kann somit am besten gemessen werden.

Die bei Mohanty et al. (1997) beschriebene Methode beruht auf dem Prinzip, dass ein Wasserstoff-Donator in Gegenwart von H_2O_2 durch eine Peroxidase (Horseradish Peroxidase (HRP)) oxidiert wird und die Konzentration des entstandenen Produktes gemessen wird.

Das hier eingesetzte Substrat N-Acetyl- 3,7-Dihydroxyphenoxazin (A6550, Amplex®) wird in Anwesenheit von H_2O_2 und HRP zu einem stark fluoreszierenden stabilen Produkt (Resorufin) umgesetzt (siehe Reaktionsgleichung Abb. 48).

Die Entstehung des Resorufins ist proportional zur H_2O_2 -Menge, vorausgesetzt, dass das Verhältnis von A6550: H_2O_2 größer als 5 ist. Ist mehr H_2O_2 vorhanden, so erfolgt ein zweiter Oxidationsschritt, der das fluoreszierende Resorufin zu einem nicht fluoreszierenden Produkt weiter oxidiert (Resazurin).

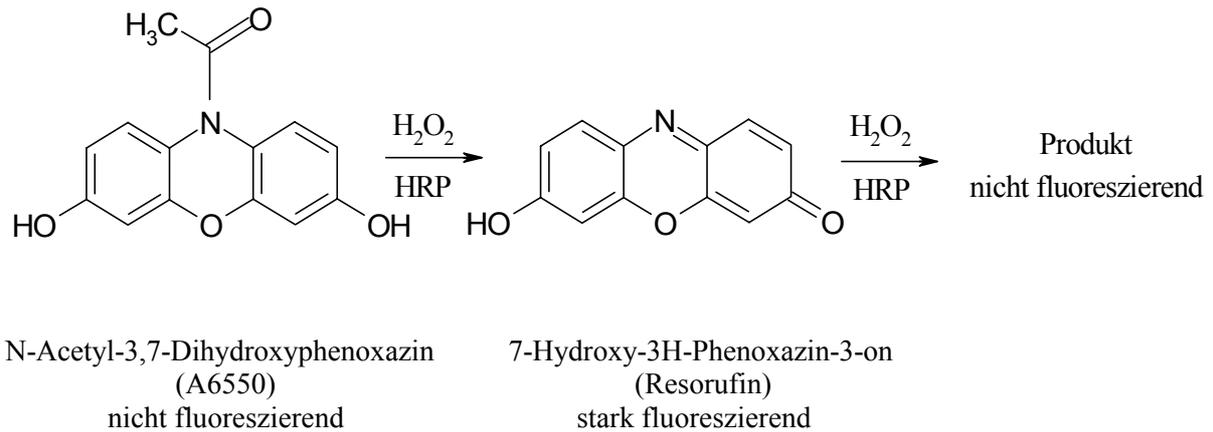


Abbildung 48 Reaktionsmechanismus des A6550 mit H_2O_2

Bei Mohanty et al. (1997) ist der Versuch als Mikrotiterplatten-Test konzipiert. In dieser Arbeit wurden die Proben direkt in einen Fluoreszenz-Detektor eingespritzt. Dies ist problemlos möglich - allerdings nur bei begrenztem Probenaufkommen.

5.9.2 Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen

Aufreinigung des Enzyms

Hier gilt das gleiche, was bereits für die Methode der MAO-B-Aktivitäts-Bestimmung erläutert wurde (siehe 5.7.1).

Eingesetzte Proteinmenge

Es wurden höhere Protein-Mengen als für den Kynuramin-Test eingesetzt, da die Umsatzrate für DA ca. 4-5 x geringer als für Kynuramin ist (Collins und Sandler 1971), deshalb wird weniger H_2O_2 im Vergleich zum 4-HOQ gebildet. Um die Sensitivität des Versuches zu steigern, wurde die Protein-Menge auf 6 mg/ml erhöht (siehe auch Abb. 51).

Inkubationszeit

Es wurde eine Inkubationszeit von 15 min bei 37°C gewählt, da dies der Inkubationszeit des MAO-Aktivitätstestes (siehe 5.7) entspricht und dadurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verbessert wird. Die Autoxidation des DA durch zu lange Inkubationsintervalle musste möglichst gering gehalten werden.

Vorinkubation

Eine Vorinkubation der Ansätze ohne Substrat von 10 min erfolgte grundsätzlich, damit endogene Substanzen vor Reaktionsbeginn oxidiert wurden (Swaroop und Ramasarma 1981).

Dopamin-Menge

Die eingesetzte DA-Menge wurde unter anderem so ausgewählt, dass die entstehenden H_2O_2 -Mengen in einem günstigen Mess-Bereich des Detektors lagen. Dies war bei den eingesetzten DA-Konzentrationen (0,1 bis 1,0 mmol/L) gegeben.

Stoppen der Reaktion

Nach der Inkubationszeit von 15 min sollte die Umsetzung gestoppt werden, da die Proben nicht wie beim Mikrotiterplatten-Test gleichzeitig gemessen werden konnten. Hierzu wurden verschiedene Präzipitations-Agenzien getestet, die aber entweder die Entstehung fluoreszierender Produkte störten (z.B. Perchlorsäure), oder aufgrund möglicher Radikalfänger-Eigenschaften nicht in Betracht kamen (z.B. Ethanol). Aceton erwies sich als geeignetes Stopp-Reagenz; die Fluoreszenz blieb über mehr als 1 h stabil.

Eichkurve

Bei Mohanty et al. (1997) wird angegeben, dass eine Eichkurve mit 0-2 nmol absolut/Ansatz linear ist. Bei Konzentrationen darüber ist eine Linearität nicht mehr gegeben. In dieser Arbeit wurde eine Eichkurve von 0,1-1,0 nmol H_2O_2 erstellt. Bei Zugabe von Aceton (Stopplösung s.o.) zur Eichkurve ergab sich, dass es die Fluoreszenz-Werte sogar etwas erhöhte (Abb. 49). Die Zugabe von Tbz bewirkte wiederum ein Quenchen der Fluoreszenz. Im Folgenden wurden die Eichkurven grundsätzlich unter Zugabe von Aceton und Tbz-Lysat erstellt (Korrelationskoeffizient = 0,999) (Abb. 50).

Die tatsächliche Konzentration der Wasserstoffperoxidlösung wurde vor Gebrauch photometrisch bestimmt (siehe Methodenteil 3.8.1.1).

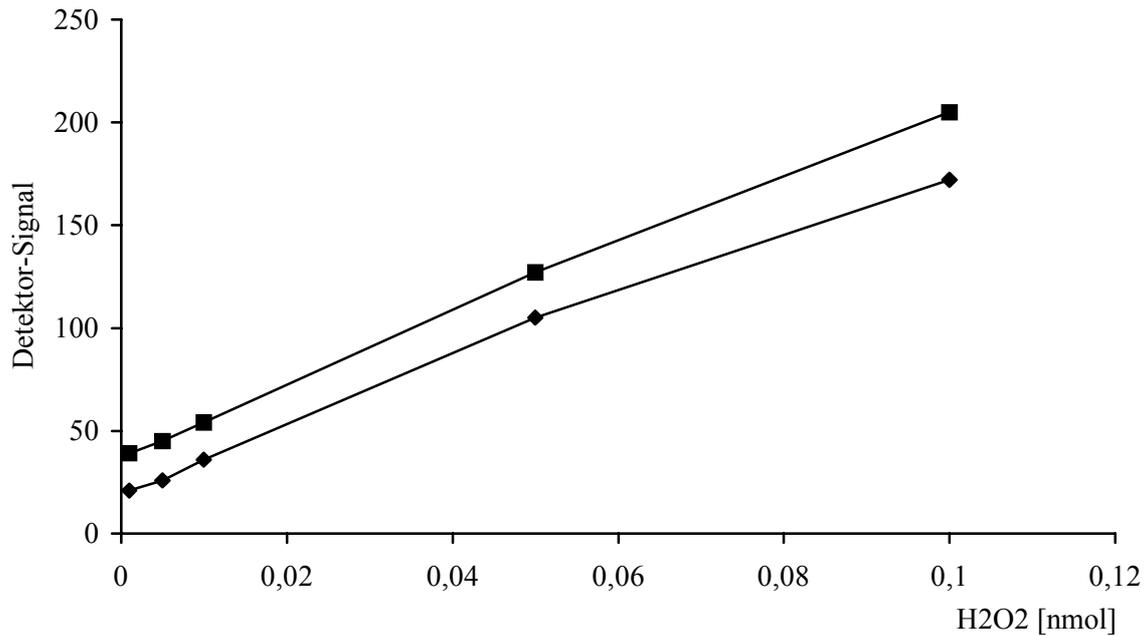


Abbildung 49 Vergleich zweier Eichkurven mit H₂O₂
 Detektorsignal bei Eichkurve ohne (Rauten) oder mit (Quadrate) Acetonzusatz und mit Tbz. Der Blindwert wurde bereits abgezogen.

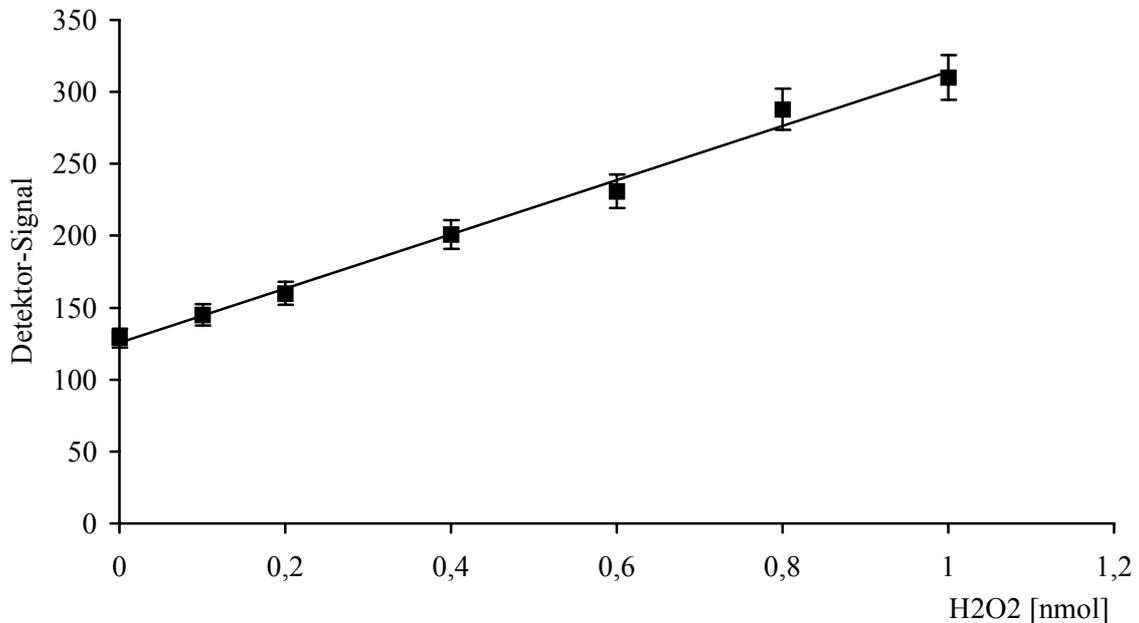


Abbildung 50 Eichkurve für H₂O₂; 0-1,0 nmol/Ansatz
 Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei verschiedenen Versuchen.

Puffer

Der Einfluss unterschiedlicher Puffer wurde überprüft: In der Original-Methode (Mohanty et al. 1997) wurde ein Krebs-Ringer-Glucose-Puffer eingesetzt. Mit dem für die Kynuramin-Versuche verwendeten MAO-Puffer wurde nach Zugabe von DA mehr H_2O_2 gebildet als mit dem ursprünglich vorgesehenen Puffer. Aus diesem Grunde wurde für die folgenden Versuche ebenfalls der MAO-Puffer verwendet, was außerdem den Vorteil einer besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen aus den MAO-B-Aktivitätsversuchen mit sich brachte. Der pH-Wert wurde wie bei den vorhergehenden Versuchen auf 7,4 eingestellt, was auch mit den Versuchsbedingungen der meisten Arbeiten übereinstimmt (Collins und Sandler 1971: pH 7,4; Mohanty et al. 1997: pH 7,35).

Störungen der Methode

Es wurde untersucht, ob das Lösungsmittel für die A6550-Stammlösung, DMSO, die MAO-B-Aktivität stört. Dies wurde mit Hilfe der MAO-Methode, wie unter 5.7 beschrieben, überprüft.

Es konnte festgestellt werden, dass DMSO in der eingesetzten Konzentration die Aktivität nicht beeinflusst.

Des Weiteren wurde abgeklärt, ob die eingesetzten Agenzien wie L-Deprenyl, MDMA und DA selbst einen Einfluss auf die Fluoreszenz haben, wie bei eigenen Voruntersuchungen für L-Deprenyl, das auf den Scopoletin-Ansatz fluoreszenzmindernd wirkte, festgestellt worden war.

Hierzu wurden Proben mit H_2O_2 versetzt und entweder H_2O oder eine der Substanzen in später einzusetzender Konzentration zugegeben. Hierbei konnte bei keinem der Stoffe eine Störung der Fluoreszenzintensität beobachtet werden.

Blindwert

Zur Bestimmung des Blindwertes werden häufig gekochte Mitochondrien (Swaroop und Ramasarma 1981) eingesetzt. Diese Methode hat aber folgende Nachteile: Zum einen sollte danach ein zweites Mal die Proteinmenge gemessen werden, um

sicherzustellen, dass sie durch die Behandlung nicht beeinflusst worden ist, zum anderen wird damit der mögliche Einfluss anderer Enzyme ebenfalls aufgehoben, so dass dieser Blindwert nicht die zusätzliche Information bietet, ob die gemessene H_2O_2 -Menge nur durch die MAO-B gebildet wird. Dies kann dadurch erreicht werden, dass die zu untersuchende MAO-B mit L-Deprenyl selektiv inhibiert wird. Wie unter „Störungen der Methode“ beschrieben, wurde ein möglicher Einfluss der Substanz auf die Fluoreszenz vorher abgeklärt.

Autoxidation

Es wurde auf zwei Arten untersucht, ob das nach Zugabe von DA entstehende H_2O_2 durch Autoxidation entsteht oder durch den oxidativen Abbau durch die MAO-B der Tbz:

1. Zur gleichen DA-Menge (0,1 mmol/L) wurden verschiedene Mengen an Protein, also Enzym-Präparation gegeben (1,3 mg/ml – 7,7 mg/ml Protein).
2. Die MAO-B wurde durch Zugabe von L-Deprenyl spezifisch inhibiert.

Es stellte sich heraus, dass die gebildete H_2O_2 -Menge bei gleicher DA-Konzentration proportional zur Proteinmenge zunahm.

Nach Zugabe von Deprenyl verringerte sich die Bildung sehr deutlich, sie lag aber immer noch leicht über dem Blindwert. Diese Differenz entspricht somit der Autoxidation des DA (Abb. 51). Hierfür spricht ebenfalls, dass nach Zugabe von MDMA in den Reaktionsansatz, das wesentlich weniger autoxidations-empfindlich ist, die Differenz deutlich geringer ist.

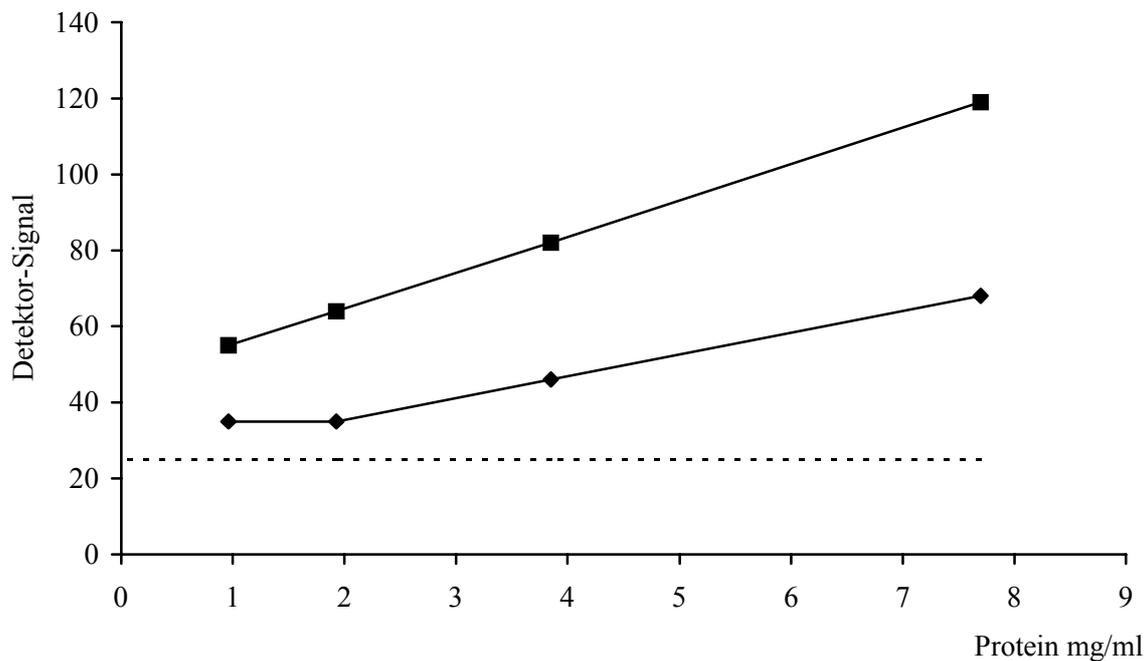


Abbildung 51 **Abhängigkeit der H_2O_2 -Bildung von der Protein-Menge**
Bildung von H_2O_2 nach Zugabe von 0,1 mmol/L DA, Inkubation ohne Deprenyl (Quadrate) oder mit Deprenyl (Rauten). Die gestrichelte Linie entspricht dem Leerwert, d.h. dem Signal nach Zugabe von H_2O statt DA.

5.9.3 Durchführung

Es wurde eine sehr wichtige Änderung der ursprünglichen Methode vorgenommen: Bei Mohanty et al. (1997) wurden die Reagenzien HRP und A6550 erst nach Beendigung der H_2O_2 -Bildung zum Ansatz gegeben. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Inkubation von 15 min bei 37°C war diese Vorgehensweise nicht praktikabel. Wurde die Reaktionslösung erst nach der Reaktion von DA mit der MAO-B zugegeben, so entstand keine Fluoreszenz. Es wurde vermutet, dass die entstandenen reaktiven Sauerstoff-Spezies bereit neutralisiert oder zerstört wurden, oder bereits durch erfolgte Lipidoxidation reduziert wurden. Eine Zugabe der Reaktionslösung nach der Vorinkubationszeit von 10 min zusammen mit dem jeweiligen Agens verhinderte den Verlust des gebildeten H_2O_2 , indem es sofort nach der Bildung durch die HRP abgefangen wurde. So konnte die Entstehung der reaktiven Sauerstoff-Spezies durch die Oxidation des DA untersucht werden.

5.9.4 Ergebnisse

Aus den durchgeführten Versuchen war ersichtlich, dass schon durch die Inkubation ohne DA bei 37°C für insgesamt 25 min eine H₂O₂-Bildung stattfindet (Abb. 51). Diese Menge wurde gleich 100 % gesetzt. Die Zugabe von L-Deprenyl bewirkte keine deutliche Veränderung der H₂O₂-Menge (+2,5 %) im Vergleich zum Leerwert, der Inhibitor konnte somit zur Bestimmung des Blindwertes eingesetzt werden.

Durch die Zugabe von DA (0,1 mmol/L) wurde die H₂O₂-Konzentration um 94 % erhöht. Gab man zum DA-Ansatz zusätzlich Deprenyl, um die MAO-B zu hemmen, zeigte sich, dass 22 % durch Enzym-unabhängige Autoxidation entstanden waren. DA erhöht also unter diesen *in-vitro*-Bedingungen die H₂O₂-Bildung um 72 % (Abb. 52). Die H₂O₂-Bildung nahm mit zunehmender DA-Konzentration (nicht dargestellt) und zunehmender Protein-Menge zu (Abb. 51). Letzteres zeigt ebenso wie die Inhibition durch Deprenyl, dass es sich um eine Enzym-abhängige Reaktion handelt.

Eine Zugabe von MDMA zum Reaktionsansatz erhöhte die H₂O₂-Bildung nicht. Auch eine Zugabe des MDMA zusätzlich zum DA-Ansatz hatte keine Erhöhung oder Hemmung der Oxidation zur Folge. Eine Steigerung der MDMA-Konzentration auf 0,2 mmol/L zeigte ebenfalls keinen Effekt.

Der Versuch, die MAO-B-Ansätze mit MDMA 10 min vorzuinkubieren und anschließend DA zuzugeben, hatte auch keine Änderung der oxidativen H₂O₂-Bildung zur Folge.

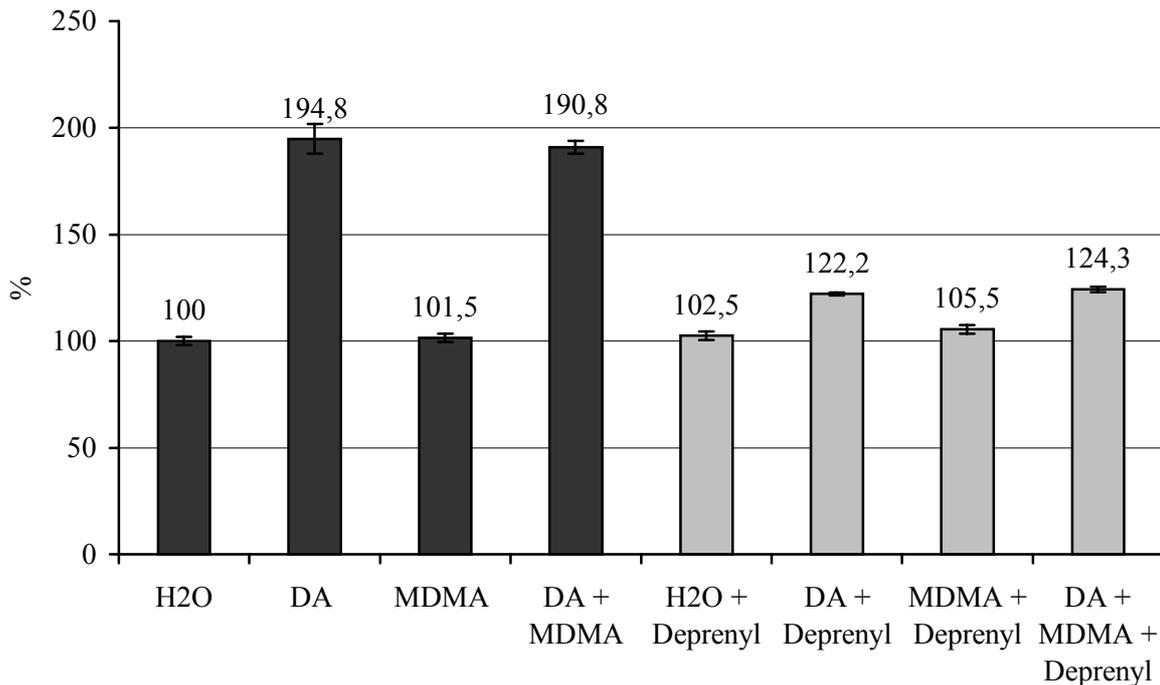


Abbildung 52 H₂O₂-Bildung mit unterschiedlichen Agenzien
(H₂O oder DA 0,1 mmol/L oder MDMA 0,1 mmol/L), mit (hellgrau) oder ohne (dunkelgrau) Zugabe von L-Deprenyl.

5.10 Standardabweichungen

Bei den SERT-Versuchen fällt auf, dass die Standardabweichung zum Teil verhältnismäßig hoch ist. Dies hat vor allem den Grund, dass innerhalb von verschiedenen Populationen bei bestimmten Parametern starke interindividuelle Schwankungen herrschen können. Werden dagegen Studien mit Versuchstieren durchgeführt, so handelt es sich meist um eine einzelne, sehr homogene Population.

Wenn wie hier humane Thrombozyten-Konzentrate verwendet werden, so sind die Lebensführung und mögliche psychiatrische Erkrankungen zusätzlich zur genetisch bedingten interindividuellen Schwankung weitere Faktoren, die die Aktivität des Transporters beeinflussen können. Diese Schwankungen werden z.B. schon bei der Untersuchung des 5-HT-Gehaltes in den Tbz deutlich (siehe Ergebnisse 5.3.2), wo Schwankungen (Variationskoeffizient, VK%) von 15 % festgestellt wurden (Christ et

al. (1976) ermittelten in ihrer Arbeit je nach Parameter sogar Variationskoeffizienten von ca. 30 %).

In der vorliegenden Arbeit sollte jeder Versuch als Dreifachbestimmung durchgeführt werden, jeweils in drei voneinander unabhängigen Versuchen. Problematisch war, dass sich aufgrund der naturgemäßen interindividuellen Unterschiede höhere Standardabweichungen ergeben, sobald Ergebnisse, die mit drei Tbz-Präparationen von verschiedenen Spendern gewonnen wurden, gemittelt werden.

Um die Abweichungen etwas zu verringern, wäre es möglich gewesen, jeweils drei Tbz-Konzentrate zu poolen und damit die Untersuchungen durchzuführen. Dagegen sprachen einerseits die Befürchtung, es könnte zu Inkompatibilitäten der einzelnen Spenderblute kommen, wodurch die Aktivität der intakten Tbz beeinflusst würde, andererseits stand pro Tag nur selten mehr als ein Tbz-Konzentrat, das nach Ablauf der Verwendbarkeit noch nicht ausgegeben worden war, für unsere Untersuchungen zur Verfügung.

Aus diesen Gründen wurden die Assays mit jeweils einem Konzentrat durchgeführt und die daraus resultierenden höheren Standardabweichungen in Kauf genommen.

Relevant ist in diesem Punkt außerdem, dass bei den Transporter-Versuchen sehr viele Pipettierschritte nötig sind, die jeweils eine Fehlermöglichkeit bedeuten. Problematisch ist ebenfalls das Vorliegen der Tbz als Suspension. Es kann deshalb im Laufe der Inkubationszeit trotz Schütteln der Proben zur Sedimentation kommen. Ein homogenes Resuspendieren soll durch zweimaliges Mischen gewährleistet sein, kann aber diese zusätzliche Fehlerquelle nicht ganz eliminieren.

Bei der Betrachtung der anderen Versuche ist zu bemerken, dass bei den MAO-Versuchen eine viel kleinere Standardabweichung auftritt. Dies ist vor allem damit zu erklären, dass durch das Poolen von vier Tbz-Konzentraten die interindividuellen Schwankungen vermindert worden sind (da hierbei nicht mit intakten Tbz, sondern mit weniger empfindlichem Lysat gearbeitet wurde, war ein Poolen der Konzentrate möglich.)

Bei den Cytotoxizitäts-Versuchen ist ebenfalls eine kleinere Standardabweichung zu verzeichnen. Hier werden zwar auch nicht-gepoolte Einzelkonzentrate verwendet, da aber weniger Pipettierschritte nötig sind und der klare Überstand der Probe und keine Suspension vermessen wird, spielen zwar die interindividuellen Faktoren eine Rolle, sehr viel weniger aber die Sedimentations- und Pipettierfehler.

Bei den Reserpin-Versuchen tritt eine höhere Standardabweichung auf als bei den Aufnahme-Versuchen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Inkubationszeit 15 min beträgt und somit die Sedimentation der Tbz stärker zu Buche schlägt. Außerdem wird hier die Gesamt-Speichermenge in den Tbz bestimmt. Sie hängt u.a. von der vorher gespeicherten Menge ab: Wenn bereits viel 5-HT in den Tbz gespeichert ist, gelangt nicht so viel markiertes 5-HT hinein, bzw. der Austausch dauert länger. Diese Faktoren bewirken die beobachtete höheren Abweichungen.

Außerdem ist darauf hinzuweisen, dass die Auftragung reziproker Werte die Standardabweichungen ungünstig darstellt, indem sie optisch größer wirken, als sie sind.

Abschließend ist folgendes anzumerken: In der Statistik wird gefordert, dass der Variationskoeffizient VK% ($SD/MW \times 100$) bei *in vitro*-Versuchen zwischen 5 und 15 liegt, bei Versuchen, in denen die biologische Variabilität mit erfasst wird, zwischen 10 und 30 und in der Analytik zwischen 1 und 3. Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde der VK% für die Ergebnisse berechnet. Sie erfüllen ohne Ausnahme diese Forderung.

6 Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit wird der Frage nachgegangen, ob die Neuronenschädigung serotoninerger Nerven auf der Aufnahme von Dopamin (DA) beruht, das dann von der interzellulären mitochondrialen Monoaminoxidase-B (MAO-B) desaminiert wird, wobei reaktive intermediäre Sauerstoffspezies (RIO) gebildet werden. Diese RIO können dann die terminalen serotoninerger Axone schädigen.

Ziel war es, unterschiedliche Teilaspekte dieses fraglichen Pathomechanismus näher zu untersuchen, um schließlich Rückschlüsse auf den Verlauf *in vivo* zu ziehen.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde zunächst untersucht, ob und unter welchen Bedingungen DA über den Serotonin-Transporter aufgenommen werden kann und in welcher Weise MDMA dies bewirken kann. Dazu war es sinnvoll, die Kinetik der Transportvorgänge beim Menschen zu untersuchen.

Im Folgenden werden die Aussagen aus dem Ergebnisteil noch einmal aufgegriffen und im Hinblick auf ihre Bedeutung für das Ziel dieser Arbeit und zukünftiger Forschungsprojekte bewertet.

6.1 Thrombozyten als Modell

Um die Untersuchungen unter möglichst physiologischen Bedingungen durchführen zu können, war es wünschenswert, die Transportvorgänge nicht an postmortal entnommenem Nervengewebe zu messen, sondern an lebenden Zellen, die ebenfalls über einen Serotonin-Membran-Transporter verfügen. Hierfür boten sich Thrombozyten (Tbz) an.

Wie bereits im Ergebnisteil (5.2.1) erläutert, stellen Tbz ein geeignetes und anerkanntes Modell zur Untersuchung der serotoninerger Nervenendigungen dar.

So besitzen sie ebenfalls - wie die serotoninerger Nervenendigungen - einen Serotonin-Membran-Transporter, Speichervesikel mit Vesikel-Transporter und MAO-B in den Mitochondrien. Zu bemerken ist allerdings, dass sie nur im begrenztem Maße

als Modell dienen können, da sie bestimmte Enzyme (z.B. Tryptophanhydroxylase, Decarboxylase) nicht enthalten und keine nervale Erregbarkeit vorhanden ist.

Trotz allem liegt mit humanen Thrombozyten im Vergleich zu tierischem Material das geeignetere Material vor: Gerade in Bezug auf chemische Agenzien zeigt sich häufig, dass unterschiedliche Spezies unterschiedlich empfindlich auf die untersuchten Substanzen ansprechen. Ratten und Meerschweinchen reagieren z.B. im Vergleich zu Mäusen sensitiver auf Ecstasy (Battaglia et al. 1988; Hashimoto et al. 1993). O'Shea et al. (2001) berichten ebenfalls von großen Unterschieden im neurotoxischen Profil von MDMA bei Ratten und Mäusen. Primaten reagieren sehr viel empfindlicher als Ratten (Ricaurte et al. 1988c) und es wird angenommen, dass Menschen noch sensitiver auf Ecstasy reagieren, wie dies auch bei anderen Neurotoxinen, wie z.B. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), der Fall ist (Ricaurte et al. 1988b).

Es musste entschieden werden, ob mit intakten Thrombozyten (Tbz) oder mit isolierten Membranen und isolierten Speichervesikeln gearbeitet werden sollte.

In der Literatur wurden sowohl Versuche mit intakten Tbz (Affolter und Pletscher 1982; Gespach et al. 1986; Rudnick und Humphreys 1992; Rudnick et al. 1981; Wölfel und Graefe 1991) als auch mit isolierten Tbz-Membranen (Cozzi 1999; Gronier und Jeanningros 1995; Mellerup et al. 1983; Rudnick und Humphreys 1992) beschrieben.

Mehrere Gründe sprechen für den Einsatz intakter Tbz:

Sie besitzen sowohl einen Membran- als auch einen Vesikel-Transporter und spiegeln damit die Gegebenheiten in den Synapsen wider. Die intakten Tbz ermöglichen so eine gleichzeitige Untersuchung beider Transport-Systeme. Die Methode, die Tbz zu lysieren und an den isolierten Membranen den Serotonin- (5-HT-) Transporter zu untersuchen, hat zwar den Vorteil der einfacheren Handhabung der Membranen, aber mehrere Nachteile: In jeder Membran-Präparation sind immer auch noch unlysierte Tbz enthalten, die die Ergebnisse in Bezug auf die Protein-Menge verfälschen und zu hohe Werte bei den SERT-Bindungsversuchen verursachen (Friedl et al. 1983).

Ca. 30 % der Membranvesikel lagern sich nach Präparation der Membranen mit der Innenseite nach außen wieder zu „inside-out-Vesikeln“ zusammen; außerdem können sich in diesen Tbz-Lysaten ebenfalls Membranen der Speichervesikel befinden, die zu falschen Ergebnissen führen können. In den Präparationen des Vesikel-Transporters verbleiben immer signifikante Mengen des Na^+ -abhängigen Membrantransporters und so müsste mit Na^+ -freiem Puffer gearbeitet werden, um dessen Einfluss zu minimieren (Fishkes und Rudnick 1982), was nicht den physiologischen Bedingungen entspricht. Eine Isolation ist auch deshalb schwierig, da Tbz nur in relativ geringer Menge im Blut vorkommen und somit größere Mengen Frischblut benötigt würden. Aufgrund der Empfindlichkeit der Tbz gegenüber osmotischem Stress und Scherkräften ist es schwer, reproduzierbare Präparationen herzustellen (Harmon et al. 1992; Rudnick et al. 1981). Nicht zuletzt ist es wesentlich aufwändiger und weniger gut reproduzierbar, in diesen isolierten Membran-Präparationen den notwendigen Ionen-Gradienten herzustellen (Rudnick und Humphreys 1992).

Für die Verwendung isolierter Membranen spricht u.a. ein Ausschluss möglicher Störungen der Versuche durch Metabolisierung des Substrates durch die MAO (Rudnick und Humphreys 1992). Dies wäre ein weiteres Argument für die Verwendung isolierter Membranen, da ein Abbau des Substrates sicher Konsequenzen auf dessen Transport hat. Allerdings enthalten die Tbz – wie die serotoninergeren Nervenendigungen auch – nur MAO-B. Da 5-HT durch die Isoform A des Enzyms metabolisiert wird, sind hier keine Veränderungen zu erwarten. Eine Möglichkeit, um diesen Effekt auszuschließen, wäre eine Vorinkubation mit einem MAO-A-Inhibitor (z.B. Pargylin), wie bei Wölfel und Graefe (1991) durchgeführt. In diesem Falle ist es nicht nötig, da nur MAO-B in den Tbz vorkommt.

Zwei weitere Vorteile der isolierten Membranen im Vergleich zu den intakten Tbz sind zum einen die geringere Empfindlichkeit in Bezug auf das Handling, zum anderen die Möglichkeit, die vorbereiteten Präparationen einzufrieren, so dass die Versuche nicht abhängig von der täglichen Tbz-Verfügbarkeit und somit besser planbar sind.

Ein großer Vorteil der intakten Tbz ist, dass die Verhältnisse nah an den physiologischen Gegebenheiten liegen. Die initiale Rate der Aufnahme ist eine Reflektion des Plasma-Membrantransporters, das Maß der Aufnahme ist mitbestimmt durch die Aufnahme in die Vesikel, so dass beide Transport-Mechanismen zusammen widerspiegelt werden (Rudnick et al. 1981).

Als einziger Nachteil bleibt somit, dass für die Kinetik des Vesikel-Transporters die Konzentration an 5-HT nicht der zugesetzten Konzentration entspricht, sondern abhängig ist von der SERT-Aktivität bei der jeweiligen Konzentration.

Nach Abwägen der Vor- und Nachteile wurden in dieser Arbeit intakte humane Tbz verwendet.

6.2 Aufnahme von Serotonin über den selektiven Serotonin-Transporter

Zur Bestimmung der 5-HT-Aufnahme in die Tbz standen mehrere Methoden zur Auswahl. Eine Möglichkeit war die Bestimmung des aufgenommenen 5-HT mit einer HPLC-Anlage mit elektrochemischem (Sanchez et al. 2001) oder Fluoreszenz-Detektor (Tsukada et al. 1994). Bei Hashimoto et al. (1993) wird zunächst das radioaktiv markierte 5-HT von seinen Metaboliten per HPLC/UV abgetrennt und dann die Aktivität in den einzelnen Fraktionen per Flüssigszintillations-Zähler (LSC) gemessen. Hierbei liegt der Nachteil vor allem darin, dass die Versuche sehr zeitaufwändig sind, was bei größerem Probeaufkommen, wie zum Beispiel zur Bestimmung von Kinetiken, nicht mehr praktikabel ist. Außerdem liegen die aufgenommenen 5-HT-Mengen im pmol-Bereich, so dass nur eine besonders empfindliche Methode in Frage kam.

Sprague und Nichols (1995b) bewiesen eine Abnahme der Anzahl der 5-HT-Transporter im Rattenhirn durch [³H]Paroxetin-Bindungsversuche. Nachteilig ist hier, dass die Erstellung einer Aufnahme-Kinetik mit dieser Methode nicht möglich ist. Bei Cozzi (1999); Rudnick und Humphreys (1992) und Rudnick et al. (1981) wurde der 5-HT-Transport mit Hilfe von radioaktiv markiertem 5-HT und anschließender Flüssigszintillationszählung bestimmt. Da diese Methode zwar einerseits den Nachteil der Radioaktivität hat, andererseits aber sehr schnell und sensitiv ist und keine größeren Aufarbeitungsschritte erfordert, wurde sie für diese Arbeit eingesetzt.

Um zu überprüfen, ob das gewählte Tbz-Modell für die zu klärende Fragestellung geeignet ist, wurde zunächst die 5-HT-Aufnahme über den selektiven 5-HT-Transporter (SERT) charakterisiert.

Wie im Ergebnisteil dargestellt (5.4.2.2), verlief die 5-HT-Aufnahme bei 0,8 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT und den gegebenen Versuchsbedingungen über ca. 2 min linear und erreichte nach ca. 10 min ein Plateau.

Im Vergleich mit den wenigen Daten in der Literatur liegen die Ergebnisse in einem ähnlichen Bereich: Rudnick et al. (1990) erreichten mit 0,3 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT steady state-Bedingungen nach 6 min. Rudnick und Wall (1992a) und Rudnick et al. (1981) setzten 0,1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT ein und fanden einen steady-state bei 10 min. In der Arbeit von Rudnick (1977) lag das Maximum des Transportes bei 2 min (37°C) bzw. 25 min (25°C). Bei Berndsén (1983) wurde vom Erreichen des Sättigungsbereiches nach 8 min berichtet, wobei nur eine Konzentration von 0,8 pmol/L eingesetzt worden war. Die für die Versuche eingesetzten 5-HT-Konzentrationen lagen ebenfalls in ähnlichen Dimensionen: Bei Rudnick and Humphreys (1992) wurden 0,1 $\mu\text{mol/L}$ - 0,2 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT eingesetzt, bei Gespach et al. (1986) 1 $\mu\text{mol/L}$ [^3H]5-HT.

Zur Beurteilung der Kinetik wurde jeweils die Anfangsgeschwindigkeit gemessen.

Die hier ermittelte Konstante für die 5-HT-Aufnahme über den Tbz-Membran-Transporter betrug $K_m = 0,6 \mu\text{mol/L}$. Die maximale Aufnahmegeschwindigkeit betrug: $V_{\text{max}} = 4 \text{ pmol} / 5 \times 10^7 \text{ Tbz/min}$.

In der Literatur finden sich einige Angaben zu diesen Werten, die in Tabelle 7 dargestellt sind.

Ein Vergleich der kinetischen Konstanten aus unterschiedlichen Arbeiten ist problematisch, da die Tbz-Aktivität allein schon aufgrund unterschiedlicher Gewinnung, Lagerung oder des Alters des Konzentrates sehr stark schwanken kann.

Trotzdem ist bei einem Vergleich der K_m -Werte für den Tbz-SERT zu sehen, dass bis auf zwei Ausnahmen (4,3 und 45,5 $\mu\text{mol/L}$) die Werte alle in einem engen Bereich liegen (0,13 - 1,0 $\mu\text{mol/L}$).

Tabelle 7 Kinetische Daten zur Serotonin-Aufnahme über den SERT

| Quelle | K_m [$\mu\text{mol/L}$] | V_{max} | Material |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------------------|
| Born und Gillson (1959) zit. nach Sneddon (1973) | 0,13 | | Humane Thrombozyten |
| Gespach et al. (1986) | 0,15 | 680 pmol/mg/min | Humane Thrombozyten |
| Gordon und Olvermann (1978) | 0,7 1,0 | | Thrombozyten, Ratte Humane Thrombozyten |
| Rudnick (1977) | 0,5 | 750 pmol/mg/min | Membran-Vesikel, hum. |
| Rudnick und Wall (1993) | 4,3 | 28 pmol/mg/min | Membran-Vesikel, hum. |
| Schmitz und Böhnisch (1998) | 0,58 | 6,10 pmol/ 10^7 Tbz/min | Humane Thrombozyten |
| Sneddon (1969) zit. nach Sneddon (1973) | 0,48 | | Humane Thrombozyten |
| Solomon (1969) zit. nach Sneddon (1973) | 45,5 | | Humane Thrombozyten |
| Vorliegende Arbeit | 0,6 | 4 pmol/ 10^7 Tbz/min | Humane Thrombozyten |

Die in dieser Arbeit ermittelte Michaelis-Konstante (0,6 $\mu\text{mol/L}$) stimmt sehr gut mit diesen Werten überein, v.a. mit dem in der Arbeitsgruppe Böhnisch erhaltenen Wert (0,58 $\mu\text{mol/L}$). Auch die in der vorliegenden Arbeit errechnete maximale Geschwindigkeit (V_{max}) von 4 pmol/ 5×10^7 Tbz/min liegt in dem Bereich des dort bestimmten Wertes (6,10 pmol/ 10^7 Tbz/min).

Generell ist anzumerken, dass die V_{max} -Werte schlecht verglichen werden können. Zum einen werden sie oft auf die Proteinmenge bezogen, da meistens mit isolierten Membranen gearbeitet wurde und somit eine Zählung der Tbz nicht mehr möglich war. Zum anderen ist der V_{max} -Wert im Gegensatz zum K_m -Wert sehr stark von den herrschenden Inkubationsbedingungen abhängig. So ist es auch zu erklären, warum selbst aus einer Arbeitsgruppe sehr unterschiedliche Ergebnisse mitgeteilt wurden (siehe Rudnick (1977) und Rudnick und Wall (1993), siehe Tab. 7).

6.2.1 Messung der 5-HT-Konzentration

Die entwickelte HPLC-Methode zur 5-HT-Bestimmung liefert gut reproduzierbare Ergebnisse (zur Optimierung der Methode siehe Ergebnisteil 5.3.1). Abgesehen von der geringen Stabilität der präzipitierten Tbz bei Raum-Temperatur ist sie wenig störanfällig. Die Nachweisgrenze von 0,1 $\mu\text{mol/L}$ (ca. 18 ng/ml) entspricht in etwa der, die Aymard et al. (1994) angegeben hat. Hier liegt sie bei 25 ng/ml, was ca. 0,14 $\mu\text{mol/L}$ entspricht. Eine empfindlichere Methode einzusetzen, wie z.B. von Pussard et al. (1996) beschrieben, erübrigte sich, da der 5-HT-Gehalt im Vollblut und vor allem in den Tbz damit sicher erfasst werden konnte.

Wie bereits im Ergebnisteil dargestellt (5.3.3), lagen die 5-HT-Gehalte der untersuchten Tbz-Konzentrate zwischen 2,44 und 3,79 $\mu\text{mol/L}$, im Mittel bei 3,02 $\mu\text{mol/L}$ (berechnet auf 10^6 Tbz/ μl), also bei 24,4 – 37,9 pmol/ 10^7 Tbz.

Sollen die erhaltenen 5-HT-Konzentrationen mit denen anderer Veröffentlichungen verglichen werden, so muss festgestellt werden, dass fast nur Angaben für Vollblut-Konzentrationen in der Literatur zu finden sind, die sich zudem sehr unterscheiden. Folgende Konzentrationen im Vollblut werden angegeben: 1 $\mu\text{mol/L}$ (Huether und Schuff-Werner 1996), 258 ng/ml (entspricht ca. 1,5 $\mu\text{mol/L}$) (Aymard et al. 1994), Anderson et al. (1981) (zit. nach Aymard et al. 1994) ermittelten 156-400 ng/ml (entsprechend ca. 0,9 – 2,3 $\mu\text{mol/L}$) 5-HT im Vollblut. Manz et al. (1985) fanden bei Frauen 1,39 $\mu\text{mol/L}$, bei Männern 1,18 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT im Serum.

Die in dieser Arbeit bestimmten 5-HT-Gehalte in den Tbz lagen im Mittel ca. doppelt so hoch wie die Gehalte im Vollblut. Auf die Tbz-Anzahl berechnet ergibt sich eine Konzentration von 3 nmol/ 10^9 Tbz, die sehr gut mit der von Pussard et al. (1996) von 3,5 +/- 1,3 nmol/ 10^9 Tbz übereinstimmt.

Diese Messungen waren erforderlich, um den Substratbereich so wählen zu können, dass ein möglicher Hemm-Mechanismus erkannt, eine reine Substrathemmung aber vermieden wird.

6.3 MDMA-Aufnahme in die Thrombozyten

Um einen direkten Beweis zu erhalten, ob die Ecstasy-Substanzen über den SERT in das Cytoplasma gelangen können, wurden Aufnahme-Untersuchungen mit einem radioaktiven Substrat unternommen. Hierfür wurde MDMA als Leitsubstanz der Ecstasy-Gruppe ausgewählt.

Bei der Betrachtung der Strukturformeln der drei Substanzen 5-HT (als natives Substrat), Paroxetin (als Vertreter der Reuptake-Inhibitoren) und MDMA sind große strukturelle Ähnlichkeiten zu erkennen:

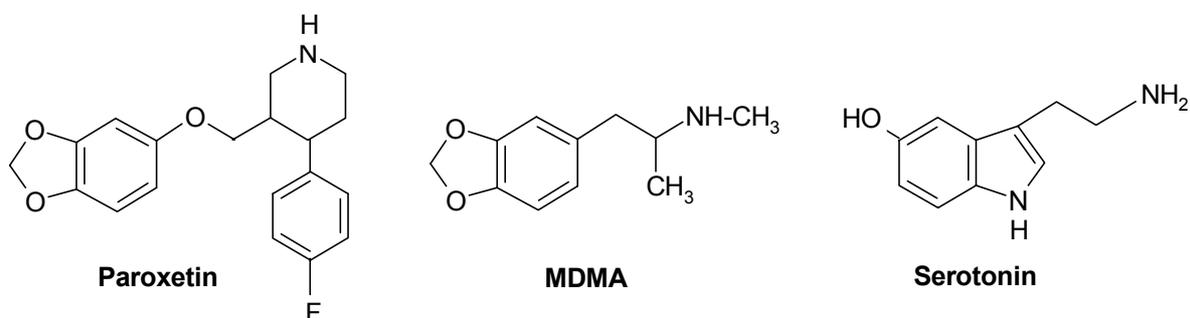


Abbildung 53 Strukturformeln von Paroxetin, MDMA und Serotonin

Aufgrund der chemischen Strukturen wäre ein Transport des MDMA über den SERT in die Tbz denkbar.

In anderen Arbeiten zu dieser Fragestellung finden sich sehr widersprüchliche Ergebnisse:

Bei [³H]MDMA-Aufnahme-Versuchen mit Rattenhirn-Synaptosomen kamen Schmidt et al. zu dem Ergebnis, MDMA werde nicht in größeren Mengen akkumuliert, sondern könne möglicherweise durch Diffusion in die Zellen gelangen (Schmidt et al. 1986b, zit. aus Schmidt 1987).

Die Arbeitsgruppe um Gehlert vermutete eine MDMA-Bindungsstelle im Rattenhirn, da die [³H]MDMA-Bindung z.B. durch Methamphetamin gehemmt werden konnte, aber nur wenig durch Citalopram oder 5-HT. MDMA wurde hier in den Nervenzellen nicht angereichert (Gehlert et al. 1985). Auch Schmidt et al. (1986, 1987) untersuchten

die [³H]MDMA-Aufnahme in Ratten-Synaptosomen und stellten nur eine passive Aufnahme von MDMA fest. Sie gehen von einer MDMA-Bindungsstelle aus, die sich offensichtlich vom SERT unterscheidet. Johnson et al. vermuten eine simple Blockade des Uptake-Carriers und keine spezifische Aufnahme (Johnson et al. 1986).

Rudnick und Wall (1992b, 1993) dagegen postulieren, dass MDMA ein Substrat und nicht nur ein Ligand für den SERT ist. Sie werten ihre Ergebnisse, dass MDMA eine höhere Potenz besitzt, den Transporter zu inhibieren, als die Imipramin-Bindung zu hemmen, als deutlichen Hinweis darauf. Dies kann allerdings nicht als Beweis gesehen werden. Schuldiner et al. (1993) vermuteten nach Untersuchungen mit [³H]5-HT an Tbz-Membranen ebenfalls, MDMA stelle ein Substrat für den Transporter dar.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse wäre, dass z.T. ungeeignete Methoden gewählt wurden. Zum Beispiel erfolgten die [³H]MDMA-Aufnahme-Versuche mit Ratten-Hirn-Homogenat bei Gehlert et al. (1985) bei 4°C. Bei diesen Temperaturen findet eine aktive Aufnahme über den SERT nicht mehr statt, und es verwundert so nicht weiter, dass nur eine Bindung, aber kein Transport nachgewiesen werden konnte. In derselben Studie wurde die unspezifische Aufnahme durch Zugabe von 150-fachem Überschuss an unmarkiertem MDMA bestimmt. Gerade bei dieser Fragestellung wäre eine selektive Verdrängung vom Transporter mittels eines SSRI sinnvoller gewesen.

Auffällig bei der Betrachtung der Ergebnisse ist vor allem, dass in allen Arbeiten, in denen Rattenhirn-Homogenat oder -Synaptosomen eingesetzt wurde, keine aktive Aufnahme von MDMA über den SERT festgestellt wurde, die Studien, die humane Tbz verwendeten, aber zu einem anderen Ergebnis kamen. Hieraus ergibt sich die Frage, ob die Aufnahme von MDMA unter Umständen von der Spezies oder dem untersuchten Material abhängig ist.

Ogleich die erhaltenen Befunde bereits dafür sprachen, dass das MDMA als kompetitiver Inhibitor der 5-HT-Aufnahme (6.4) selbst in die Tbz aufgenommen wird,

konnte erst durch die Experimente mit radioaktiv markiertem MDMA der endgültige Beweis angetreten werden (siehe Ergebnisteil 5.6).

Die Aufnahme erfolgt in die Tbz erstaunlicherweise aktiv über den Transporter und nicht passiv durch die Zellmembran. Die Aufnahmegeschwindigkeit ist im Vergleich zum 5-HT deutlich geringer.

Die passive Diffusion konnte dadurch ausgeschlossen werden, dass bei Hemmung des SERT - in Abwesenheit von Na^+ (Ersatz durch Li^+) oder in Gegenwart des Transporter-Inhibitors Paroxetin - keine Aufnahme von MDMA nachweisbar war. Dies ist erstaunlich, da das Molekül ausreichend lipophil (etwa wie Methamphetamin) ist und eine Diffusion durch die Membran möglich wäre.

Somit konnte der Beweis erbracht werden, dass MDMA ein Substrat-Typ-Inhibitor für den Membran-Transporter darstellt. Den oben genannten Autoren muss also widersprochen werden, aber auch denjenigen, die bereits eine Aufnahme postulierten, ohne sie zu beweisen.

Eine Zugabe eines spezifischen Inhibitors des Vesikel-Transporters ergab, dass MDMA ebenfalls in die Speichervesikel aufgenommen wird.

Auffällig bei diesen Aufnahme-Versuchen war, dass MDMA offenbar nur begrenzt in die Tbz aufgenommen wird. Die aufgenommene Menge nimmt nach ca. 40 s nicht mehr zu, sondern sogar etwas ab (siehe Abb. 28).

Verschiedene Erklärungen für den beobachteten Effekt wären denkbar:

1. Die unspezifische Bindung steigt stärker an als die spezifische. Diese Möglichkeit kann ausgeschlossen werden, da die unspezifische Bindung ebenfalls abnimmt.
2. Die Membranen werden zerstört, MDMA wirkt cytotoxisch. Die Membran-Integrität wurde, wie unter 5.8 im Ergebnisteil beschrieben, überprüft und eine Schädigung durch MDMA kann ausgeschlossen werden.
3. Das aufgenommene MDMA wird in den Tbz sofort durch MAO-B abgebaut. Diese Möglichkeit konnte durch Hemmung der MAO-B mit Deprenyl ausgeschlossen werden.

4. Es findet ein Heteroaustausch statt: Ein Molekül 5-HT wird gegen ein Molekül MDMA ausgetauscht. Zunächst gelangt schnell das gespeicherte 5-HT aus den Zellen, so dass im Austausch MDMA hineingelangt. Danach befindet sich der Austausch im Gleichgewicht, die Menge an MDMA nimmt nicht mehr zu.
5. Es kommt durch die schnelle MDMA-Aufnahme zu einem massiven Na^+ -Einstrom, der zu einer Transporter-Umkehr führt. Dieser Mechanismus kann nicht ausgeschlossen werden.
6. MDMA hat evtl. eine Calcium-Kanal-Öffnung zur Folge, die einen Auswärts-Transport des MDMA durch Exozytose bewirkt. Hierfür gibt es aber bisher keine Anhaltspunkte.
7. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass MDMA aufgrund seiner Lipophilie in seiner unprotonierten Form zurück durch die Speichervesikel-Membran „ausleckt“. Dieses Phänomen ist z.B. für Tyramin, das lipophilere Analogon zu DA, beschrieben worden (Johnson et al. 1982; Scherman und Henry 1980; zit. nach Knoth et al. 1984). So wäre es durch die Überlagerung der Aufnahme durch den Auswärtsfluss zu erklären, dass trotz der schnellen MDMA-Aufnahme keine großen Mengen an MDMA akkumuliert werden.

Um die Erklärungsansätze endgültig beurteilen zu können, sind weiterführende Untersuchungen nötig.

Eine Kinetik des MDMA-Transportes sollte die Aufnahme genauer charakterisieren. Um gute Vergleichsmöglichkeiten zu erhalten, wurde MDMA in den gleichen Konzentrationen wie DA eingesetzt.

Da der MDMA-Transport sehr schnell abnahm, wurde eine Inkubationszeit von nur 10 s gewählt, weil danach (ab ca. 30 - 40 s) die Aufnahme nicht mehr linear verläuft. Der graphisch bestimmte K_m -Wert lag bei $3,4 \mu\text{mol/L}$, V_{max} bei $11 \text{ pmol}/5 \times 10^7 \text{ Tbz/min}$. Die Selektivität der Substrate zum Transporter kann also folgendermaßen beschrieben werden: $5\text{-HT} > \text{DA} > \text{MDMA}$. Die Kinetik wurde zusätzlich mit einer Inkubationszeit von 30 s gemessen, um zu überprüfen, ob die Kinetik gegen Ende des linearen Bereiches bereits verändert war. Hier zeigte sich, dass die Spezifität fast

gleichgeblieben war ($K_m = 3,5 \mu\text{mol/L}$), die Aufnahme-Geschwindigkeit aber bereits deutlich abgenommen hatte ($1,5 \text{ pmol}/5 \times 10^7 \text{ Tbz/min}$).

Es wurde nun eine Kinetik mit höheren Konzentrationen (bis $38,6 \mu\text{mol/L}$) und ebenfalls einer Inkubationszeit von 30 s erstellt. Hier war der K_m -Wert um ca. 2,6 mal höher ($K_m = 8,8 \mu\text{mol/L}$), die maximale Aufnahmegeschwindigkeit verdoppelte sich ($3 \text{ pmol}/5 \times 10^7 \text{ Tbz/min}$).

Ein Erklärungsansatz für die veränderte Kinetik wäre das Vorliegen einer biphasischen Kinetik: Bei der Betrachtung der Dixon-Auftragung liegen die Werte sehr gut auf einer Geraden. Werden die Werte jedoch nicht doppelt-reziprok aufgetragen (siehe Abbildung 54) so könnte das Abflachen der Kurve bei höheren Konzentrationen entweder als Erreichen einer Sättigung, aber auch als eine zweiphasige Aufnahme interpretiert werden und somit wäre das Ziehen einer Ausgleichsgeraden durch alle Punkte (wie im Dixon-Plot) nicht zulässig.

Es muss offen bleiben, wie die Aufnahme-Kinetik des MDMA zu erklären ist.

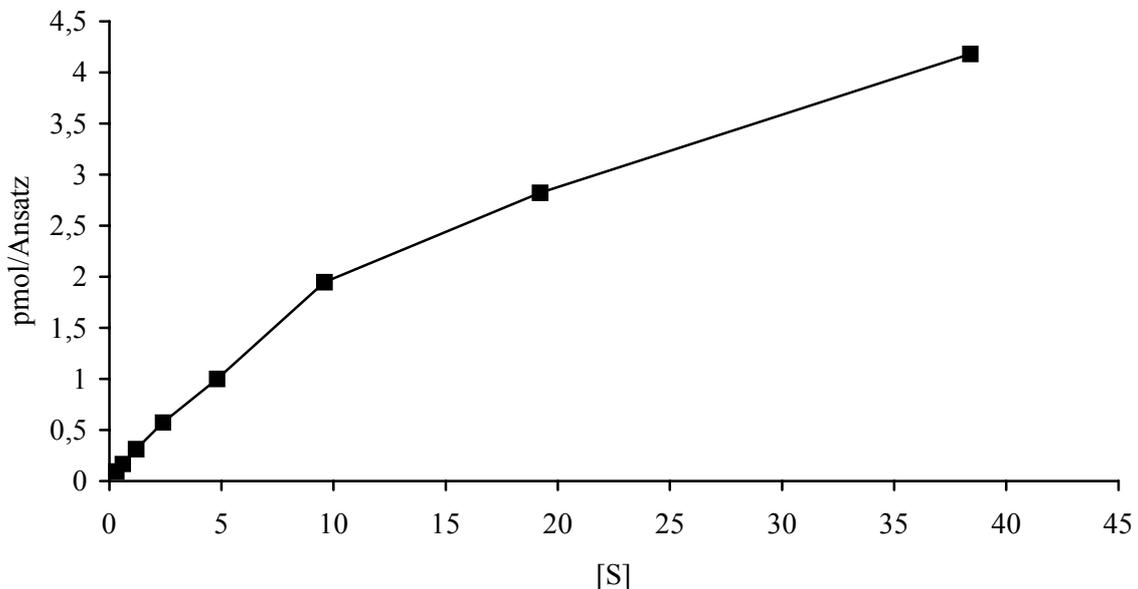


Abbildung 54

Aufnahme von MDMA in die Thrombozyten

Eingesetzte Konzentrationen waren $0,3 - 38,4 \mu\text{mol/L}$, die Inkubationszeit betrug 30 s. Die Werte wurden auf $5 \times 10^7 \text{ Tbz/min}$ berechnet. Es wurden Mittelwerte von vier getrennten Versuchen dargestellt.

6.4 Inhibition des SERT durch Ecstasy

Zahlreiche Arbeiten haben sich mit dem Einfluss von MDMA auf den 5-HT-Efflux beschäftigt. Da die 5-HT-Ausschüttung durch MDMA deutlich gesteigert ist, wird von einer Wechselwirkung der Ecstasy-Substanz mit dem 5-HT-Transporter ausgegangen. Hierzu finden sich in der Literatur auch Angaben zur Hemmqualität des MDMA. Wie schon in der Einleitung erwähnt (1.6), wurden die meisten Untersuchungen mit MDMA durchgeführt, zum Teil auch mit MDA, nur sehr wenige mit MDEA und fast keine mit MBDB.

Dieser Teilabschnitt der vorliegenden Arbeit sollte einen Vergleich der pharmakologischen Eigenschaften aller vier Ecstasy-Substanzen miteinander ermöglichen und eventuelle Unterschiede zu den Weckaminen aufzeigen.

Erstmals wurden in einer Arbeit anhand des Tbz-Transporter-Modells für alle vier Ecstasy-Substanzen, AMPH und METH vergleichende Hemmkinetiken aufgestellt.

Die Inhibitoren wurden in den Konzentrationen 2 und 20 $\mu\text{mol/L}$ eingesetzt. Diese Konzentrationen liegen in den Dimensionen anderer Forschungsgruppen: Rudnick und Wall (1992), Johnson et al. (1986), Schmidt et al. (1991) und Nichols et al. (1982) setzten jeweils 1 und 10 $\mu\text{mol/L}$ in ihren Arbeiten ein.

Werden diese Plasma-Konzentrationen mit ihrer pharmakologischen Wirkung *in vivo* verglichen, so zeigt sich ein signifikanter 5-HT-Efflux schon bei 1 $\mu\text{mol/L}$ MDMA, eine DA-Freisetzung jedoch erst bei 10 $\mu\text{mol/L}$ (Johnson et al. 1986). Diese Plasma-Konzentrationen werden auch physiologisch nach üblichem Ecstasy-Konsum erreicht; so bestimmten Esteban et al. (2001) nach oraler Gabe von 10 bzw. 15 mg/kg KG MDMA bei Ratten cerebrale extrazelluläre Konzentrationen von 11 bzw. 20 $\mu\text{mol/L}$.

Um die Hemmstärken der sechs Substanzen vergleichen zu können, sollte der jeweilige K_i -Wert und die Hemmtypen ermittelt werden.

Man unterscheidet bekanntlich drei Arten der Hemmung, die kompetitive, die nicht-kompetitive und die unkompetitive, wobei die kompetitive Hemmung durch steigende Substrat-Konzentrationen verringert werden kann, die anderen Hemmarten nicht. Für die bei gleichbleibenden Bedingungen konstante Geschwindigkeit v einer Reaktion gilt die Michaelis-Menten-Gleichung. Unter der Annahme einer reversiblen

Wechselwirkung zwischen Inhibitor und Transporter-Protein, die letzteres an einer Verbindung mit dem Substrat behindert, kann die Michaelis-Menten-Gleichung für eine kompetitive Inhibition wie folgt geschrieben werden:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Hier stellt [I] die Inhibitorkonzentration, [S] die Substratkonzentration und K_i die Dissoziationskonstante der Transporter-Inhibitor-Verbindung dar. V_{\max} stellt die maximale Geschwindigkeit bei hohen Substratkonzentrationen und K_m die Michaelis-Konstante in Abwesenheit des Inhibitors dar. K_m entspricht der Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit und gilt als Maß für die Affinität einer Substanz zum Enzym oder Transporter.

Der K_i lässt sich aus dieser umgeformten Gleichung berechnen. Er gibt die Inhibitorkonzentration an, die benötigt wird, um die Reaktionsgeschwindigkeit eines Substrates zu halbieren und wird als Maß für die Hemmstärke einer Substanz angesehen.

Wie bereits im Ergebnisteil aufgeführt (5.4.4), liegen die experimentell bestimmten Hemmkonzentrationen (K_i) der Ecstasy-Substanzen für die Hemmung des SERT in etwa im selben Bereich:

MDMA: 2,8 $\mu\text{mol/L}$; MDA: 2,4 $\mu\text{mol/L}$; MDEA: 3,2 $\mu\text{mol/L}$ und MBDB: 3,0 $\mu\text{mol/L}$.

Die Werte der zur Gruppe der Weckamine gehörenden Substanzen Amphetamin und Methamphetamin liegen ca. 5-fach höher: Amphetamin: 14,5 $\mu\text{mol/L}$; Methamphetamin: 11,9 $\mu\text{mol/L}$. Die K_i für die Hemmung der 5-HT-Aufnahme durch DA liegt um ein Zehnfaches höher, bei 34 $\mu\text{mol/L}$.

Anhand dieser Ergebnisse kann eine Rangfolge mit fallender Hemmstärke aufgestellt werden:

MDA > MDMA > MBDB > MDEA > METH > AMPH > DA

In der Literatur sind für einige dieser Substanzen K_i bzw. IC_{50} beschrieben (siehe Tabelle 8). Werden die in dieser Arbeit ermittelten Werte mit den in der Tabelle dargestellten verglichen, so ist zum Teil eine sehr gute Übereinstimmung zu erkennen.

Tabelle 8 In anderen Arbeitsgruppen ermittelte Hemmkonstanten für den Serotonin-Transporter in $\mu\text{mol/L}$

| Quelle | MDMA | MDA | AMPH | METH | Material |
|------------------------|----------------|------------|----------------|----------------|----------------------|
| Cozzi et al. 1999 | $IC_{50}=2,14$ | | | $IC_{50}=11,6$ | Tbz-Membranen, human |
| Crespi et al. 1997 | $IC_{50}=0,35$ | | $IC_{50}=4,51$ | | Synaptosomen, Ratte |
| Rudnick & Wall 1992b | $K_i=0,54$ | $K_i=0,82$ | $K_i=7,4$ | $K_i = 8,7$ | Tbz-Membranen, human |
| Schuldiner et al. 1993 | $K_i=2,7$ | | | | Tbz-Membranen, human |
| Vorliegende Arbeit | $K_i=2,8$ | $K_i=2,4$ | $K_i=14,5$ | $K_i=11,9$ | Thrombozyten, human |

Bringt man die oben aufgestellte Reihenfolge der Hemmstärken mit der in der Literatur beschriebenen Stärke ihrer pharmakologischen Wirkung bzw. ihrer Neurotoxizität in Verbindung, so zeigen sie die gleichen Tendenzen auf.

Die Reihenfolge in der 5-HT-Freisetzung-Potenz ist: MDMA > MDEA > METH > AMPH (Schmidt et al. 1991; Rothman und Baumann 2002). Nach Stone et al. (1987a) soll MDEA in der 5-HT- Senkung nicht so potent sein wie MDA und MDMA, wobei letztere nahezu äquipotent sein sollen. METH soll ein potenterer 5-HT-Releaser als AMPH sein (Stone et al. 1988).

Die Feststellung von Rudnick und Wall (1993), MDMA habe einen Effekt sowohl auf den 5-HT-Transporter als auch auf den DA-Transporter (DAT), Amphetamin aber fast nur auf den DAT, kann nicht bestätigt werden. Allerdings ist der Amphetamin-Effekt auf den SERT um ein Fünffaches schwächer als der MDMA-Effekt.

Auch über den Hemm-Charakter der Ecstasy-Substanzen finden sich in der Literatur vereinzelt Angaben: Rudnick und Wall (1992b) stellten eine kompetitive Hemmung fest und auch Schuldiner et al. (1993) gehen davon aus. Cozzi et al. (1999) und Crespi et al. (1997) (siehe Tabelle 8) äußerten sich nicht zum Hemm-Mechanismus. Battaglia et al. (1987) fanden in Studien mit Rattenhirn-Homogenat durch MDMA nur K_d (die Bindungskonstante) verändert, nicht aber V_{max} , und schlossen daraus eine kompetitive Hemmung.

Schmidt (1987) hingegen stellte eine Woche nach MDMA-Gabe in Rattenhirn-Synapotosomen eine Verringerung sowohl des K_m für 5-HT als auch der V_{max} , welches mit einer kompetitiven Inhibition nicht übereinstimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde für alle untersuchten Inhibitoren ein kompetitiver Hemmtyp festgestellt, wie im Ergebnisteil unter 5.4.4 auch graphisch dargestellt ist.

Eine Untersuchung, ob die Inhibition reversibel ist, konnte mit intakten Tbz als Modell nicht durchgeführt werden, da diese einen zusätzlichen Waschschriff nicht tolerieren und durch diese Traumatisierung aggregieren und ihre Aktivität verlieren würden.

Es soll im Folgenden diskutiert werden, welche weiteren Schlüsse aus den oben dargelegten Ergebnissen gezogen werden können.

Substanzen, die an den Transporter-Proteinen angreifen, können in zwei Klassen eingeteilt werden:

1. Reuptake-Inhibitoren: Die Substanzen binden an den Transporter und blockieren allosterisch den Transport; sie werden selbst nicht transportiert (Beispiel Paroxetin). Sie können die extrazelluläre Konzentration des nativen Substrates im synaptischen Spalt erhöhen.
2. Substrat-Typ Releaser: Sie binden kompetitiv an das Transporter-Protein und werden selbst in das Cytoplasma transportiert. Diese Inhibitoren erhöhen die extrazelluläre Konzentration auf zwei Weisen: Zum einen verstärken sie den Efflux der Transmitter durch einen Transporter-bedingten Austausch und zum anderen erhöhen sie die cytoplasmatische Konzentration der Transmitter durch

Hemmung der Vesikel-Speicherung, so dass die „Leckagen“ aus den Vesikeln nicht behoben werden können. Die Transmitter werden stattdessen vermehrt über den Transporter aus dem Cytoplasma hinaus transportiert (Rudnick 1977; Rudnick und Clark 1993). Die Wirkung dieser Substanzklasse kann durch Reuptake-Inhibitoren gehemmt werden, da die Substanzen erst in die Zellen gelangen müssen, um zu wirken.

Die Stimulation inhibitorischer Rezeptoren (auch Autorezeptoren) kann den Effekt der Reuptake-Inhibitoren weitgehend verhindern (Autorezeptor-mediated feedback inhibition), aber nicht den Effekt der Substrat-induzierten Neurotransmitter-Freisetzung. Weil ihr Effekt unabhängig von der Nervenregung bzw. von der Aktivierung des Calcium-Ionen-Einstroms auftritt, ist der Effekt von Substrat-Typ-Releasern größer als von Reuptake-Inhibitoren (Rothman und Baumann 2002).

Aufgrund der vorangegangenen Versuche kann auf einen Substrat-Typ der Ecstasy-Inhibition geschlossen werden. Um diese Annahme zu bestätigen, sollten weitere Ergebnisse gewonnen werden, so z.B. darüber, ob die Substanzen einen Einfluss auf den Vesikel-Transporter haben (siehe 6.5). Dass Ecstasy in das Cytoplasma aufgenommen werden kann, konnte bereits direkt bewiesen werden (siehe 6.3).

6.5 Hemmung des Vesikel-Transporters durch Ecstasy

Um die Hemm-Qualitäten der Ecstasy-Substanzen genau bestimmen zu können, musste geklärt werden, ob diese Substanzen eine inhibierende Wirkung auf beide in den serotoninergen Nervenendigungen vorkommenden Transporter-Arten ausüben, oder ob nur einer der beiden Mechanismen beeinflusst wird. Als Amine könnten die Amphetamin-Derivate potentielle Substrate und Inhibitoren auch des vesikulären Transporters sein. Der Vesikel-Transporter hat eine geringere Spezifität als der SERT; so werden z.B. Noradrenalin (NA), Adrenalin (A), DA und 5-HT über denselben Transporter transportiert (Da Prada et al. 1975, zit. nach Knoth et al. 1984).

Aus diesem Grunde wurden Versuche mit Reserpin, einem Inhibitor des Vesikel-Transporters, durchgeführt. Sie sind im Ergebnisteil (5.5) ausführlich erläutert. Im

Vergleich zu früheren Arbeiten fällt hinsichtlich des Versuchsdesigns die mit 70 $\mu\text{mol/L}$ verhältnismäßig hohe Reserpin-Konzentration auf (zum Vergleich: Rudnick et al. (1990) setzten 1-8 nmol/L Reserpin ein; Rudnick et al. (1981) 2,5 $\mu\text{mol/L}$).

Reserpin soll ein kompetitiver (Kanner et al. 1979) und reversibler (Scherman und Henry 1984) Inhibitor des Vesikel-Transporters sein, wobei aufgrund der sehr langen Dissoziationshalbwertszeit (ca. 16 h, Rudnick et al. 1990) die Bindung als irreversibel angesehen werden könnte. Die hohe Reserpin-Konzentration wurde v.a. deshalb gewählt, damit eine Verdrängung des Reserpins durch die untersuchten Substanzen ausgeschlossen werden kann. In einigen anderen Arbeitsgruppen wurde Reserpin ebenfalls in höheren Konzentrationen verwendet (z.B. Knoth et al. (1984): 5-10 mmol/L).

Wie im Ergebnisteil dargelegt, war durch die untersuchten Substanzen die 5-HT-Aufnahme auch nach Vorinkubation mit Reserpin vermindert. Hieraus konnte geschlossen werden, dass sie einen inhibitorischen Effekt auf den Membran-Transporter ausüben. Um Schlussfolgerungen auf eine mögliche Inhibition des Vesikel-Transporters ziehen zu können, musste die Hemmstärke mit und ohne Reserpin verglichen werden. Die Hemmung ohne Reserpin war bei den Ecstasy-Substanzen stärker als mit Reserpin (siehe Ergebnisteil, Tab. 3), wodurch eine Hemmung beider Transporter-Systeme belegt werden konnte. Amphetamin und Methamphetamin hatten insgesamt eine schwächere Hemmung der 5-HT-Aufnahme zur Folge, was auch durch den fünf- bzw. vierfach höheren K_i -Wert belegt ist (siehe 6.4), waren aber auch in der Lage, den Vesikel-Transporter zu hemmen.

In der Literatur finden sich nur vereinzelt Aussagen über eine Hemmung des Amin-Transporters. Folgende Arbeiten, die humane Tbz eingesetzt haben, kamen zu ähnlichen Ergebnissen: Eine Hemmung der [^3H]Reserpin-Bindung durch MDMA ($K_i = 235 \mu\text{mol/L}$) wurde von Schuldiner et al. (1993) gefunden, auch Cozzi et al. (1999) konnten nachweisen, dass MDMA und METH den Vesikel-Transporter hemmen. Rudnick und Wall (1993) gewannen in ihrer Arbeit für MDMA die gleichen Ergebnisse. Sie stellten eine Stimulation des 5-HT-Efflux durch MDMA bei beiden Transportern fest: Zum einen findet an den Plasma-Membran-Vesikeln eine direkte Interaktion mit dem Na^+ -abhängigen Membran-Transporter statt, zum anderen hemmt

MDMA die ATP-abhängige 5-HT-Akkumulation und stimuliert den Efflux am vesikulären Amin-Transporter. Gu und Azmitia (1993) bewiesen mit Reserpin-Versuchen in Neuronen-Kulturen von Ratten eine indirekte Beeinflussung des Vesikel-Transporters.

Auf welche Weise die Hemmung des vesikulären Amin-Transporters stattfindet, kann durch den durchgeführten Versuch nicht ermittelt werden. Zwei Möglichkeiten, wie Amphetamin-Derivate den ATP-abhängigen [³H]5-HT-Transport hemmen können, sind denkbar:

Ein Aufheben der pH-Differenz durch passive nichtionische Diffusion der Amphetamin-Derivate (der Influx von einem Amin-Molekül bewirkt einen Efflux von zwei H⁺-Ionen), wodurch die treibende Kraft für den Transport verloren geht.

Die Amphetamin-Derivate können möglicherweise auch direkt mit der Substratbindungsstelle interagieren und den Transporter kompetitiv inhibieren (Schuldiner et al. 1993), wobei sie ebenfalls in die Vesikel gelangen und H⁺ verbrauchen (Rudnick und Wall 1993).

Aus den Hemmversuchen am Membran-Transporter (siehe 6.4) ist nicht ersichtlich, ob die untersuchten Substanzen in das Cytoplasma der Tbz gelangen können. Aus den Reserpin-Versuchen kann dies aber geschlussfolgert werden. Die Substanzen könnten keinen Effekt auf den Vesikel-Transporter ausüben, wenn sie nicht in das Cytoplasma gelangen würden.

Diese Annahme konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch den bereits diskutierten MDMA-Aufnahme-Versuch (6.3) erstmals direkt bewiesen werden.

6.6 Aufnahme von Dopamin in die Thrombozyten

Die dieser Arbeit vorangestellte Hypothese geht davon aus, dass durch die nach Ecstasy-Einfluss erhöhte extrazelluläre Konzentration an Dopamin (DA) (einerseits durch die gesteigerte Freisetzung, andererseits durch den reduzierten DA-Abbau, da die MAO gehemmt ist) dessen Verfügbarkeit erhöht wird (Waldmeier 1985) und es über die 5-HT-Transporter in benachbarte Nerven-Terminals aufgenommen werden kann (Schmidt und Lovenberg 1985; Stone et al. 1988).

Um diesen wichtigen Schritt des vermuteten Pathomechanismus zu klären, musste überprüft werden, ob DA in der Lage ist, als falscher Transmitter in die Tbz zu gelangen. Außerdem sollten die Versuche Aufschluss darüber geben, auf welche Weise eine Aufnahme in die Tbz erfolgt.

Wie in dieser Arbeit bewiesen werden konnte, ist DA in der Lage, in die Tbz zu gelangen (siehe Ergebnisteil 5.4.5). Die Aufnahme erfolgt über den SERT mit einer Michaelis-Konstante von 2,6 $\mu\text{mol/L}$ und einer V_{max} von 0,8 $\text{pmol}/5 \times 10^7 \text{Tbz}/\text{min}$.

Dieses Ergebnis deckt sich mit mehreren Angaben und Vermutungen aus anderen Publikationen:

Sprague und Nichols (1995b) stellten eine signifikante Fraktion der [^3H]DA-Aufnahme in Synaptosomen (Ratte) fest, die durch Fluoxetin gehemmt werden konnte. Faraj et al. (1994) fanden heraus, dass der 5-HT-Transporter eine relativ hohe Affinität zu DA hat.

Battaglia et al. (1988), Dean und Copolov (1991), Nash et al. (1990), Schmidt (1987) und Schmidt und Lovenberg (1985) diskutierten ähnliche Hypothesen.

Angaben über kinetische Konstanten waren nur vereinzelt zu finden:

Solomon et al. (1970) ermittelten eine K_m für [^{14}C]DA in die Tbz von 67 $\mu\text{mol/L}$; Gordon und Olverman (1978) bestimmten ebenfalls eine relativ langsame DA-Aufnahme in Tbz mit $K_m = 70 \mu\text{mol/L}$ (Ratte) bzw. $K_m = 100 \mu\text{mol/L}$ (Mensch).

Diese K_m -Werte sind um Größenordnungen höher als die in dieser Arbeit gefundenen Werte. Sie könnten dazu beigetragen haben, den DA-vermittelten Pathomechanismus als bedeutungslos abzuwerten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben Inkubationsversuche mit und ohne Reserpin ergeben, dass DA wie auch 5-HT über den Monoamin-Transporter in die Speichervesikel aufgenommen werden kann (siehe auch Ergebnisteil 5.5.2).

Andere Arbeitsgruppen untersuchten diese Fragestellung nur selten. Es wurden meistens nur 5-HT-Effluxversuche durchgeführt, die keine Rückschlüsse auf den Vesikel-Transporter zulassen.

Dean und Copolov (1991) kamen zu dem Schluss, dass DA nicht in die Vesikel aufgenommen wird. Allerdings postulierten sie auch, dass es nicht über den SERT in das Cytoplasma gelangt, sondern über einen DA-sensitiven, Imipramin-insensitiven Mechanismus, weshalb sie eine Diffusion vermuteten.

Eine mögliche Hemmung des DA-Transportes wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Die DA-Aufnahme konnte erwartungsgemäß durch 5-HT ($K_i = 0,33 \mu\text{mol/L}$) und durch MDMA ($K_i = 0,46 \mu\text{mol/L}$) gehemmt werden. DA war in der Lage, die 5-HT-Aufnahme zu hemmen, aber erst bei hohen Konzentrationen ($K_i = 34 \mu\text{mol/L}$).

Sollen die gewonnenen Ergebnisse nun interpretiert werden, so kann festgehalten werden, dass DA wie 5-HT über den Membrantransporter in die Tbz gelangen kann, wobei der Transport des DA aber wesentlich langsamer erfolgt. Die beiden Substrate können sich gegenseitig in ihrer Aufnahme inhibieren und auch MDMA hat einen hemmenden Effekt auf die DA-Aufnahme. DA kann ebenso wie 5-HT über den Vesikel-Transporter in die Speichervesikel der Tbz aufgenommen werden.

6.7 Kalkulation und Interpretation der Kinetik-Ergebnisse

Sollen diese Ergebnisse in Bezug auf ihre Relevanz *in vivo* betrachtet werden, müssten die 5-HT-Konzentrationen im Bereich des synaptischen Spalts bekannt sein.

Okada et al. (1999) bestimmten mittels Mikrodialyse eine basale extrazelluläre Konzentration von 2 nmol/L bei der Ratte, Feuerstein et al. (1987) geben eine höhere 5-HT-Konzentration von 10 nmol/L an den präsynaptischen 5-HT_{1B}-Rezeptoren von Kaninchen an. Diese Konzentration wird in den folgenden Berechnungen als basale extrazelluläre 5-HT-Konzentration angesehen.

Für DA finden sich in der Literatur keine entsprechenden Werte für den synaptischen Spalt. Da aber die Gewebkonzentrationen ca. um den Faktor 20 höher liegen als die für 5-HT (Ricaurte et al. 1988c; Waldmeier 1985), könnte man dies auch für den synaptischen Spalt annehmen und mit entsprechend höheren Konzentrationen rechnen.

Dies deckt sich mit weiteren Angaben in der Literatur, die ebenfalls höhere Basal-Level von DA als von 5-HT beschrieben haben (Bankson und Cunningham 2001; White et al. 1997), so dass für die folgenden Berechnungen eine basale extrazelluläre DA-Konzentration von 200 nmol/L festgesetzt wird.

Um Kalkulationen in Bezug auf die MDMA-Wirkung durchführen zu können, muss auch die extrazelluläre MDMA-Konzentration bekannt sein. Hier fand sich eine Arbeit, in der bei der Ratte die extrazelluläre MDMA-Menge nach oraler Gabe mittels Mikrodialyse bestimmt wurde: Nach oraler Gabe von 10 bzw. 15 mg/kg KG ergab sich eine cerebrale extrazelluläre Konzentration bei der Ratte von 11 bzw. 20 $\mu\text{mol/L}$ (Esteban et al. 2001). Da beim Menschen die halluzinogene Wirkung bereits bei geringeren Dosen eintritt und eine übliche Konsumeinheit zwischen 1,5 und 3 mg/kg liegt (Ricaurte et al. 1985), soll hier mit einer Dosis von 2 mg/kg KG gerechnet werden. Dies würde einer einmaligen Einnahme einer Tablette mit 100 mg bei einem Körpergewicht von 50 kg entsprechen.

Wird davon ausgegangen, dass die extrazellulären Spiegel beim Menschen ähnlich wie bei der Ratte sind, dann würden die MDMA-Spiegel im Gehirn nach einer Tablette rechnerisch bei 2 $\mu\text{mol/L}$ liegen.

Diese Konzentration liegt in einem Bereich, in dem bereits ein 5-HT-Efflux verursacht ($\text{EC}_{50} = 2,92 \mu\text{mol/L}$, Kokotos-Leonardi und Azmitia 1994; $\text{EC}_{50} = 1 \mu\text{mol/L}$, Johnson et al. 1986) und der Reuptake über den SERT gehemmt wird ($K_i = 2,8 \mu\text{mol/L}$, vorliegende Arbeit). Bei dieser Konzentration kann auch bereits eine MDMA-Aufnahme über den SERT stattfinden ($K_m = 3,4 \mu\text{mol/L}$, vorliegende Arbeit). Die MAO-B wird allerdings erst bei höheren Konzentrationen inhibiert (58 $\mu\text{mol/L}$, vorliegende Arbeit). Hierzu müsste es zu einer Akkumulation des MDMA im Cytosol kommen oder größere Mengen eingenommen werden.

Um einen Einblick in die Vorgänge an den serotoninergen Nervenendigungen nach Ecstasy- oder Amphetamin-Konsum zu erhalten, wird zunächst mittels der experimentell bestimmten Hemmkonstanten für die untersuchten Amphetamin-Derivate (siehe Tab. 9 und Ergebnisteil 5.4.4) deren Einfluss auf die 5-HT-Aufnahme über den SERT berechnet und als Diagramme dargestellt (siehe Abb. 55).

Tabelle 9 **Hemmung der Serotonin-Aufnahme über den SERT**
K_i-Werte für die eingesetzten Inhibitoren

| Inhibitor | MDMA | MDA | MDEA | MBDB | AMPH | METH |
|------------------------------------|------|-----|------|------|------|------|
| K_i-Wert [µmol/L] | 2,8 | 2,4 | 3,2 | 3,0 | 14,5 | 11,9 |

Dazu werden die Werte in die umgeformte Michaelis-Menten-Gleichung (siehe 6.4) eingesetzt, so dass die Geschwindigkeit des Transportes für jedes Substrat bei jeder beliebigen Substrat- und Inhibitor-Konzentration berechnet werden kann. Aus den resultierenden Aufnahme-Geschwindigkeiten können Rückschlüsse auf die Hemmung durch die jeweilige Substanz gezogen werden. Zur Illustration der Effekte wurde mit unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen gerechnet: ungehemmt (0 µmol/L), 1 Tablette (2 µmol/L), 5 Tabletten (10 µmol/L), 10 Tabletten (20 µmol/L) und 50 Tabletten (100 µmol/L).

Anhand der Graphiken (Abb. 55) ist ersichtlich, dass bereits eine Konzentration eines Ecstasy-Wirkstoffes von 2 µmol/L, also entsprechend ca. einer Tablette, eine deutliche Reduktion um ca. 40 % auf 54,8 bis 61,8 % der ursprünglichen Aufnahme-Geschwindigkeit verursacht. Bereits eine Steigerung der Konzentration auf 10 µmol/L (entsprechend ca. 5 Tabletten) hat eine Reduktion der Geschwindigkeit um knapp 80 % durch die Ecstasy-Substanzen auf ca. 20 % der ungehemmten Aufnahme (19,6 – 24,1 %) zur Folge. Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 20 µmol/L (ca. 10 Tabletten) bewirkt nur noch eine geringe Steigerung der Hemmung auf 10,6 – 14,1 %. Nach der Einnahme einer unrealistischen Menge von 50 Tabletten (100 µmol/L) wäre die Aufnahme-Geschwindigkeit nahe Null (2,4 – 3,1 %).

Es wird gut sichtbar, dass die Weckamine AMPH und METH weniger potente Inhibitoren sind: Sie reduzieren die Aufnahme-Geschwindigkeit bei 2 µmol/L nur um knapp 15 % auf 85,4 bzw. 87,9 %. Bei der höheren Konzentration von 20 µmol/L erreichen sie nur eine Reduktion der Aufnahme um ca. 60 % auf 37,5 bzw. 42,4 % der ungehemmten Geschwindigkeit und erst bei 50 Tabletten eine Reduktion von knapp 90%.

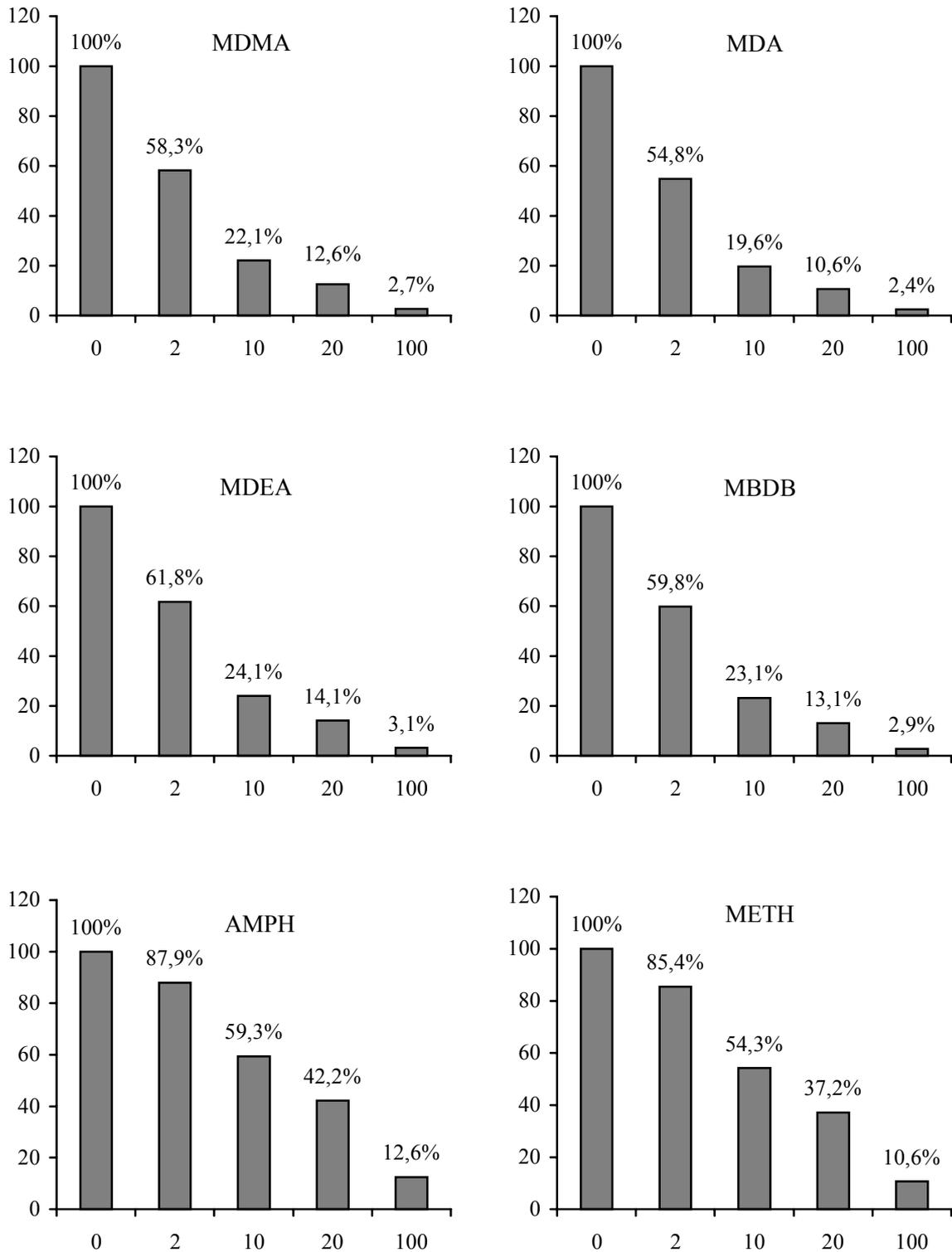


Abbildung 55 Hemmung der Serotonin-Aufnahme (10 nmol/L) durch Ecstasy oder Amphetamine

Darstellt ist die Aufnahmegeschwindigkeit des 5-HT über den SERT unter dem Einfluss von 0, 2, 10, 20, 100 μmol/L Inhibitor. Die ungehemmte Aufnahme entspricht 656 pmol/min/L (=100%).

Bei diesen Berechnungen wurde einheitlich die oben festgelegte basale 5-HT-Konzentration von 10 nmol/L eingesetzt. Dabei wurde ein möglicher Effekt des Ecstasy-Wirkstoffes auf die extrazelluläre 5-HT-Konzentration durch eine Steigerung des Effluxes nicht berücksichtigt:

Laut White et al. (1996) wird die extrazelluläre 5-HT-Konzentration bei Ratten durch Einwirkung von MDMA (1 µmol/L) um ca. 30 % erhöht. Das heißt also, dass im Falle einer MDMA-Wirkung mit einer extrazellulären 5-HT-Konzentration von ca. 13 nmol/L statt 10 nmol/L gerechnet werden könnte.

Die extrazelluläre Konzentration des DA wird ebenfalls durch MDMA beeinflusst: Sie erhöht sich bei einer Konzentration von 1 µmol/L MDMA auch um ca. ein Drittel (entsprechend ca. 260 nmol/L). Die DA-Konzentrationen werden von MDMA aber deutlich stärker als die 5-HT-Konzentrationen beeinflusst: Bei sehr hohen MDMA-Konzentrationen (100 µmol/L) steigt die DA-Konzentration auf das 10-fache des basalen Wertes an, die 5-HT-Konzentration verdoppelt sich nur (White et al. 1996). In Abbildung 56 wurde dieser Effekt, basierend auf 10 nmol/L 5-HT und 200 nmol/L DA, dargestellt.

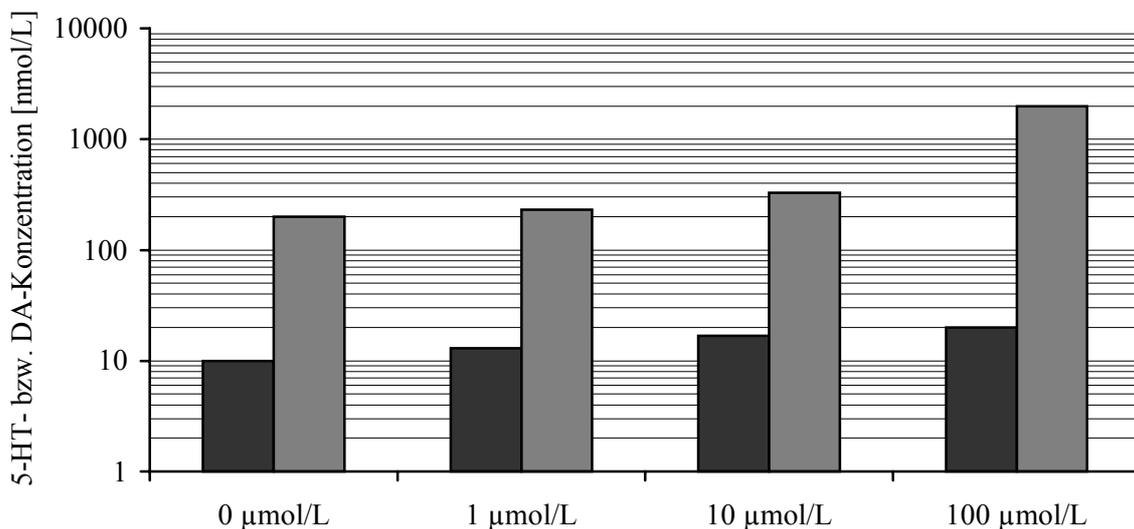


Abbildung 56 Einfluss von MDMA auf die extrazelluläre 5-HT- (dunkelgrau) und DA-Konzentration (hellgrau), modifiziert nach White (1996)

Dargestellt ist die berechnete extrazelluläre Konzentration bei Anwesenheit von 0 – 100 µmol/L MDMA, modifiziert nach White et al. (1996); die Konzentration in nmol/L ist logarithmisch aufgetragen.

In Tabelle 10 sind die Konzentrationen für MDMA, DA und 5-HT aufgeführt, mit denen im Folgenden exemplarisch gerechnet werden soll, um die Bedeutung der bisher präsentierten Ergebnisse deutlicher zu machen. Hierbei wurden die Ergebnisse von White et al. (1996) berücksichtigt (siehe auch Abb. 56). Außerdem sind die zur Berechnung nötigen kinetischen Konstanten aufgetragen, wobei hier die an Tbz gewonnenen Ergebnisse als auf die serotoninergeren Neuronen übertragbar angesehen werden.

Tabelle 10 Extrazelluläre Konzentrationen und kinetische Konstanten modifiziert nach White et al. (1996)

| [nmol/L] | 5-HT | DA | MDMA |
|----------------------------------|------|--------|---------|
| ohne MDMA-Einfluss | 10 | 200 | 0 |
| 1 Tablette: 2 µmol/L MDMA | 13 | 260 | 2.000 |
| 5 Tabletten: 10 µmol/L MDMA | 16,7 | 330 | 10.000 |
| 10 Tabletten: 20 µmol/L MDMA | 18,3 | | 20.000 |
| 50 Tabletten: 100 µmol/L MDMA | 20 | 2000 | 100.000 |
| K_m | 600 | 2600 | 3500 |
| V_{max} [nmol/min/L] | 40 | 8 | 110 |
| K_i (5-HT-Aufnahme-Inhibition) | – | 34.000 | 2.800 |
| K_i (DA-Aufnahme-Inhibition) | 330 | – | 460 |

Zu bedenken ist allerdings, dass die zur Berechnung verwendeten Konzentrationen wahrscheinlich nicht genau mit den tatsächlichen *in vivo*-Bedingungen nach MDMA-Einfluss übereinstimmen. Vermutlich werden die 5-HT-Konzentrationen im synaptischen Spalt höher und die DA-Konzentrationen im synaptischen Spalt der serotoninergeren Synapsen geringer sein, da die Werte die angenommene DA-Konzentration im Striatum widerspiegeln. Bis das dort freigesetzte DA an die serotoninergeren Terminals gelangt ist, wird wahrscheinlich ein DA-Verlust aufgetreten sein.

Da diese Kalkulationen aber nur eine Vorstellung der Vorgänge liefern soll, sind die geschätzten Konzentrationsangaben ausreichend.

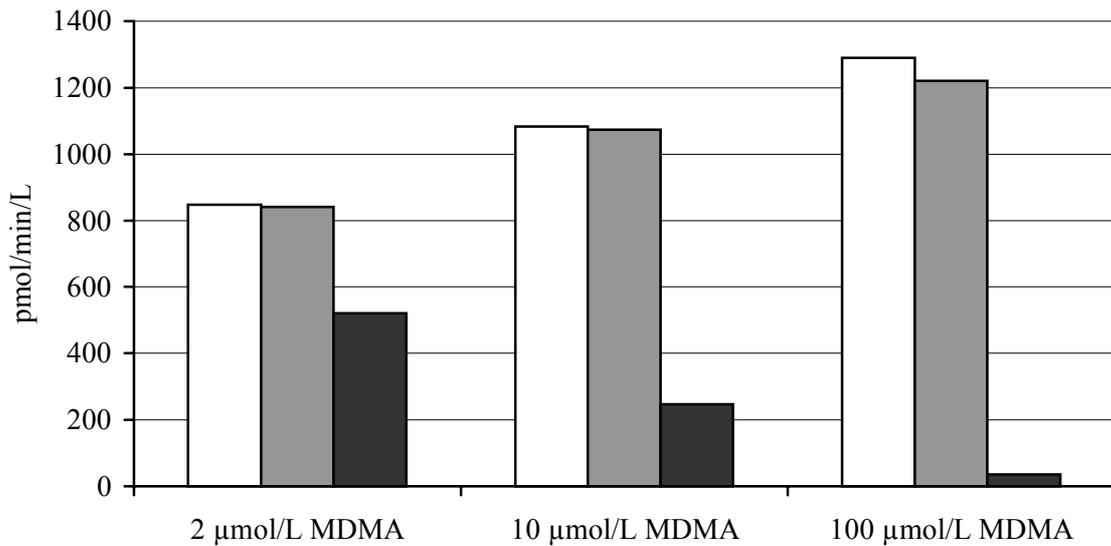


Abbildung 57 **Aufnahmegeschwindigkeit von 5-HT unter Einfluss von DA und MDMA.**

Dargestellt ist die Aufnahme in pmol/min/L von 5-HT: ungehemmt (weiß), inhibiert durch DA (hellgrau) und MDMA (dunkelgrau). Der Berechnung zugrunde gelegt sind die Konzentrationen, die in Gegenwart von 2, 10 oder 100 μmol/L MDMA extrazellulär angenommen werden, also 13, 17 und 20 nmol/L 5-HT und 260, 330 und 2000 nmol/L DA (siehe Tabelle 10).

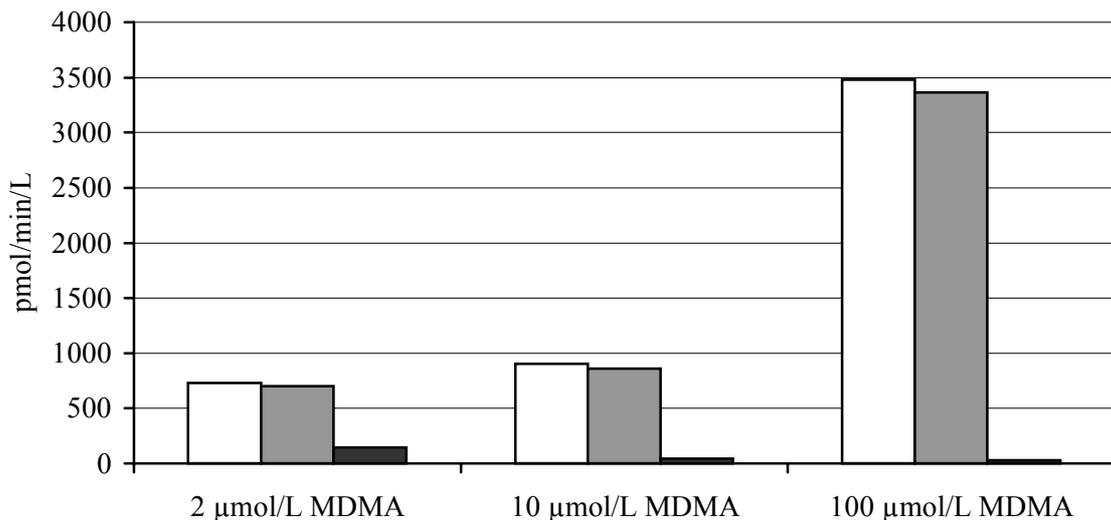


Abbildung 58 **Aufnahmegeschwindigkeit von DA unter Einfluss von 5-HT und MDMA.**

Dargestellt ist die Aufnahme in pmol/min/L von DA: ungehemmt (weiß), inhibiert durch 5-HT (hellgrau) und MDMA (dunkelgrau); Konzentrationen siehe Abb. 57.

Anhand dieser Berechnungen ist zu erkennen, dass MDMA die Aufnahme sowohl des 5-HT, als auch des DA über den SERT bereits in niedrigen Dosierungen (1 Tabl., entspr. 2 µmol/L) um 40 % bzw. 80 % hemmt. Bei höheren MDMA-Konzentrationen (10 µmol/L) wird eine Hemmung von 80 % bzw. 95 % und bei der höchsten Konzentration von 100 µmol/L eine fast vollständige Aufnahme-Hemmung über den SERT erreicht (siehe auch Tab. 11 und 12).

DA vermag die 5-HT-Aufnahme bei niedrigeren Konzentrationen nicht zu hemmen. Erst bei einem Einfluss von 100 µmol/L MDMA und dadurch bedingt einer DA-Konzentration von 2000 nmol/L ist eine Hemmung um 5 % erreicht. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich dann allerdings bereits 100 mal mehr DA als 5-HT im synaptischen Spalt (siehe Tab. 10).

5-HT hat bei diesen Konzentrationsverhältnissen so gut wie keinen Effekt auf die DA-Aufnahme. Dies hängt aber vor allem mit den deutlich höheren DA-Konzentrationen zusammen: Bei einem Einfluss von 10 µmol/L MDMA befindet sich ca. 20 mal mehr DA als 5-HT im synaptischen Spalt; bei 100 µmol/L MDMA ca. 100 mal mehr (siehe Tab. 10).

Wird der Effekt des MDMA auf die 5-HT-Aufnahme bei gleichbleibender 5-HT-Konzentration (10 nmol/L, Abb. 55) mit dem Effekt bei steigender Konzentration (13 – 20 nmol/L, Abb. 57) verglichen, so zeigt sich, dass die prozentuale Hemmung in beiden Rechenmodellen übereinstimmt: Die Aufnahme konnte jeweils auf 58 %, 22 % und 2,8 % reduziert werden. Da MDMA in einem deutlichen Überschuss vorhanden ist, hat eine geringe Konzentrationserhöhung des Substrates 5-HT keinen Einfluss auf dessen Hemmung.

Soll nun der Einfluss zweier Inhibitoren gleichzeitig untersucht werden, so kann die Michaelis-Menten-Gleichung wie folgt erweitert werden:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I_1]}{K_{i1}} + \frac{[I_2]}{K_{i2}} \right)}$$

Wird die prozentuale Hemmung durch zwei Inhibitoren (MDMA zusammen mit DA oder 5-HT) berechnet, so zeigt sich, dass die Anwesenheit eines weiteren Inhibitors in den festgesetzten Konzentrationen (siehe Tab. 10) keine deutliche Steigerung der Aufnahme-Hemmung im Vergleich zur Hemmung durch MDMA alleine bewirken kann (siehe Tabellen 11 und 12).

Tabelle 11 Hemmung der 5-HT-Aufnahme durch MDMA, DA und MDMA gleichzeitig mit DA
(dargestellt ist die prozentuale Aufnahme unter Inhibitor-Einfluss, die ungehemmte Aufnahme entspricht 100 %)

| Dosis | 1 Tablette | 5 Tabletten | 50 Tabletten |
|---------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| herrschende Konzentrationen [nmol/L] | 5-HT: 13 DA: 260 MDMA: 2000 | 5-HT: 17 DA:330 MDMA: 10.000 | 5-HT: 20 DA: 2000 MDMA: 100.000 |
| ungehemmt | 100 % | 100 % | 100% |
| DA | 99,2 % | 99,08 % | 94,7 % |
| MDMA | 58,4 % | 22,7 % | 2,8 % |
| MDMA + DA | 58,4 % | 22,5 % | 2,6 % |

Tabelle 12 Hemmung der DA-Aufnahme durch MDMA, 5-HT und MDMA gleichzeitig mit 5-HT
(dargestellt ist die prozentuale Aufnahme unter Inhibitor-Einfluss, die ungehemmte Aufnahme entspricht 100 %)

| Dosis | 1 Tablette | 5 Tabletten | 50 Tabletten |
|---------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| herrschende Konzentrationen [nmol/L] | DA: 260 5-HT: 13 MDMA: 2000 | DA: 330 5-HT: 17 MDMA: 10.000 | DA: 2000 5-HT: 20 MDMA: 100.000 |
| ungehemmt | 100 % | 100 % | 100 % |
| 5-HT | 96,6 % | 95,6 % | 96,7 % |
| MDMA | 20,1 % | 4,9 % | 0,81 % |
| MDMA + 5-HT | 19,4 % | 4,7 % | 0,76 % |

Die vorangegangenen Berechnungen verdeutlichen die in der Arbeit gewonnenen Ergebnisse und zeigen ihre Auswirkungen auf: So ließ sich darstellen, dass bei Einnahme von 5 Tabletten Ecstasy (10 $\mu\text{mol/L}$) eine Hemmung der 5-HT-Aufnahme um ca. 80 % erreicht wird. Eine Erhöhung der aufgenommenen Ecstasy-Menge auf zehn oder mehr Tabletten kann die Hemmung der 5-HT-Aufnahme-Geschwindigkeit nur noch wenig steigern (Abb. 55).

Des Weiteren konnte ermittelt werden, dass ein Vorhandensein von 5-HT im serotoninergeren synaptischen Spalt – anders als bisher angenommen – die Aufnahme von DA über den SERT in den Konzentrationen, die bei einer Ecstasy-Wirkung für die beiden Monoamine angenommen werden (siehe Tab. 10), nicht verhindern kann.

Die Anwesenheit von MDMA in den vermuteten Konzentrationen kann die DA-Aufnahme jedoch deutlich vermindern.

Um weiteren Aufschluss über die Verhältnisse zwischen den möglichen SERT-Substraten zu erhalten, wurde exemplarisch Folgendes kalkuliert:

1. Konzentration an 5-HT, die nötig wäre, die DA-Aufnahme nach 1 Tbl. MDMA (entspr. 260 nmol/L DA) um 20 %, 50 % oder 80 % zu hemmen.
2. Konzentration an DA, die höchstens im synaptischen Spalt erreicht werden darf, damit die dort herrschende 5-HT-Konzentration (entspr. 10 nmol/L) die DA-Aufnahme deutlich (um 20 %) zu hemmen vermag.
3. Konzentration an MDMA, die im synaptischen Spalt herrschen darf, ohne die Aufnahme von 200 nmol/L DA zu inhibieren.

Folgende Konzentrationen wurden berechnet:

1. Es wären 100 nmol/L 5-HT nötig, um die DA-Aufnahme um 20 % zu reduzieren, 330 nmol/L, um sie auf 50% zu senken und 1500 nmol/L, also fast ein Fünffaches des K_i -Wertes, um sie zu 80 % zu hemmen.
2. Es ist bei der niedrigen 5-HT-Konzentration von 10 nmol/L im synaptischen Spalt nicht möglich, die DA-Aufnahme zu hemmen, da der K_i -Wert deutlich höher (bei 0,33 $\mu\text{mol/L}$) liegt. Selbst bei einer DA-Konzentration, die um den

Faktor 10.000 unter der 5-HT-Konzentration liegt (0,001 nmol/L), haben 10 nmol/L 5-HT keinen Einfluss auf den DA-Transport über den SERT.

3. Eine Reduktion der MDMA-Konzentration um den Faktor 1000 (auf 2 nmol/L) wäre nötig, damit die DA-Aufnahme in Gegenwart von 200 nmol/L nicht mehr beeinflusst würde.

Zusätzlich wird der Einfluss von MDMA auf die humanen Tbz berechnet: Der Effekt auf den 5-HT-Transport über den SERT in die humanen Tbz.

Hierbei wird eine 5-HT-Plasmakonzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ (siehe 6.2.1) und eine MDMA-Konzentration von 2 $\mu\text{mol/L}$ angenommen. Es zeigt sich, dass die ungehemmte 5-HT-Aufnahme bei 2,5 nmol/min/L liegt. Die Anwesenheit von MDMA (2 $\mu\text{mol/L}$) reduzierte die Aufnahme um ca. 20 % auf 1,97 nmol/L. In den Tbz sind die Hemm-Effekte sehr viel geringer ausgeprägt, da die extrazelluläre Konzentration an 5-HT um ein Vielfaches höher ist als im synaptischen Spalt.

6.8 Einfluss von Ecstasy auf die Monoaminoxidase-B

Es wurde postuliert, dass die Anwesenheit von MAO-B in den serotoninergeren Nervenendigungen – obwohl 5-HT ausschließlich von MAO-A abgebaut wird (O'Carroll et al. 1983) – eine protektive Rolle spielt, indem das Enzym die Menge an fremden Monoaminen oder potentiellen falschen Transmittern durch Abbau verringert (Levitt et al. 1982; Pintar et al. 1983, zit. aus Sprague und Nichols 1995b).

In der Literatur finden sich mehrere Arbeiten zur Inhibition der Monoaminoxidase durch Amphetamin oder Ecstasy. Fast ausschließlich wurde der Effekt auf die MAO-A untersucht. Hier haben die Ecstasy-Substanzen MDMA und MDA einen hemmenden Effekt (siehe Tabelle 13), welcher unter anderem mitverantwortlich für den Anstieg der 5-HT- und der DA-Konzentrationen nach Ecstasy-Gabe sein soll (Gu und Azmitia 1993).

Bei Untersuchungen der MAO-B konnte in den meisten Arbeiten keine Hemmung der Aktivität durch die eingesetzten Substanzen festgestellt werden: So haben z.B. nach Scorza et al. (1997) MDA und MDMA bei 100 $\mu\text{mol/L}$ keinen Effekt auf die MAO-B der Ratte. Auch Kokotos-Leonardi et al. (1992) stellten bei Versuchen mit Rattenhirn-

Homogenat eine Hemmung durch MDMA bei MAO-A, aber nicht bei MAO-B fest. Dies wird unter anderem damit erklärt, dass die Isoform B engere Vorgaben bezüglich der Struktur der akzeptierten Substrate haben soll und somit Substanzen, die aufgrund ihrer Struktur als primäre oder sekundäre Amine theoretisch als Substrate für MAO-B geeignet wären, trotzdem keine Affinität zu dem Enzym besitzen.

Um einen möglichen Effekt der Ecstasy-Substanzen auf die MAO-B beim Menschen endgültig zu klären, wurden im Rahmen dieser Arbeit eigene Untersuchungen unternommen.

Diese Versuche zeigten nun klar, dass alle untersuchten Substanzen unter den herrschenden Versuchsbedingungen die menschliche MAO-B aus Tbz hemmen: Die K_i -Werte lagen im Bereich von 47 bis 159 $\mu\text{mol/L}$. Nach der Hemmstärke sortiert, zeigt sich hier ein völlig anderes Bild als bei der Reihenfolge der SERT-Inhibition: MBDB = MDMA > AMPH = MDEA = METH > MDA = DA.

Die einzige Arbeit, in der ebenfalls eine Hemmung von MAO-B bewiesen wurde, ist die von Kokotos-Leonardi und Azmitia (1994): Sie ermittelten für MDMA einen IC_{50} von 370 $\mu\text{mol/L}$ und einen gemischten Hemmtyp (Hirn, Ratte). In der Literatur finden sich allerdings einige Angaben zur MAO-A-Hemmung:

Tabelle 13 Hemmung der Monoaminoxidase-A [$\mu\text{mol/L}$]

| Quelle | MDMA | AMPH | MDA | METH | Material |
|-------------------------------------|-----------------|------------|-------------|----------------|-------------|
| Kokotos-Leonardi und Azmitia (1994) | $K_i = 44 - 56$ | | | | Hirn, Ratte |
| Kokotos-Leonardi et al. (1992): | | | | $IC_{50} = 25$ | Hirn, Ratte |
| Scorza et al. (1997) | $K_i = 30$ | $K_i = 11$ | $K_i = 9,3$ | | Hirn, Ratte |

Weshalb die Untersuchung der MAO-B-Hemmung in dieser Arbeit zu anderen Ergebnissen als in anderen Studien geführt hat, kann mehrere Gründe haben. Zum

einen können Spezies-Unterschiede eine Rolle spielen, da die meisten Untersuchungen mit Ratten-Hirn-Homogenat durchgeführt wurden, in dieser Arbeit aber MAO-B aus humanen Tbz eingesetzt wurde. Zum anderen haben die hier eingesetzten hohen Inhibitor-Konzentrationen 80 und 160 $\mu\text{mol/L}$ (in anderen Quellen wurde oft nur bis 100 $\mu\text{mol/L}$ eingesetzt) darauf einen Einfluss. Die genetischen Unterschiede in der Aktivität der humanen MAO-B (Murphy und Donnelly 1974) spielen in dieser Arbeit bei der Bestimmung der MAO-B-Aktivität keine große Rolle, da die untersuchten Proben aus vier verschiedenen Tbz-Chargen gepoolt worden waren. Vor allem ist auch die Wahl des Substrates ein wichtiger Faktor für die Ergebnisse: Bei Scorza et al. (1997) wurde z.B. 4-Dimethylaminophenethylamin, bei Kokotos-Leonardi und Azmitia (1994) Phenethylamin eingesetzt, in dieser Arbeit stattdessen Kynuramin als MAO-B-Substrat gewählt.

Wie sich durch die exemplarisch mit MDMA und Methamphetamin durchgeführten Reversibilitätsversuche zeigen ließ (siehe Ergebnisteil 5.7.4), sind diese Substanzen reversible Inhibitoren der MAO-B. Da die in dieser Arbeit untersuchten Ecstasy-Substanzen chemisch sehr ähnlich sind und bisher sehr ähnliche Ergebnisse erbrachten, kann davon ausgegangen werden, dass MDA, MDEA und MBDB ebenfalls kompetitive reversible Inhibitoren sind. Gleiches kann aufgrund der mit METH erhaltenen Ergebnisse auch für Amphetamin als wahrscheinlich angenommen werden.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit können für die MAO-B-Hemmung durch Ecstasy zwei Schlüsse gezogen werden:

- Die untersuchten Stoffe sind alle reversible kompetitive Inhibitoren der humanen MAO-B. Sie hemmen die Enzym-Aktivität aber erst bei höheren Konzentrationen (47-159 $\mu\text{mol/L}$, siehe Ergebnisteil 5.7.3).
- Die ermittelten Hemm-Konstanten liegen in ähnlichen Dimensionen wie die K_i - bzw. IC_{50} -Werte für die Isoform A des Enzyms in der Literatur (siehe Tabelle 13), die Hemmstärke von MDMA für MAO-A und -B ist fast gleich, die Hemmstärke von MDA ist ca. um den Faktor 15, für METH um den Faktor 5

höher für MAO-A als für MAO-B (wobei Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Spezies gewonnen wurden, nur unter Vorbehalt verglichen werden dürfen).

6.8.1 Kalkulation und Interpretation der MAO-B-Ergebnisse

Zur Verdeutlichung der gewonnenen Ergebnisse soll mit Hilfe der umgeformten Michaelis-Menten-Gleichung (siehe 6.7) berechnet werden, inwieweit der Abbau von DA durch MAO-B tatsächlich durch MDMA gehemmt werden würde.

Zunächst musste festgelegt werden, mit welchen Konstanten diese Berechnungen durchgeführt werden sollten. In dieser Arbeit wurden nur für Kynuramin die kinetischen Konstanten bestimmt: Hier betrug K_m 19 $\mu\text{mol/L}$ und V_{\max} 0,5 $\mu\text{g/min/mg}$. Der Arbeit von Collins und Sandler (1971) kann entnommen werden, dass der K_m -Wert der humanen Tbz-MAO-B für DA ca. halb so groß ist, wie für Kynuramin, die V_{\max} ca. ein Drittel so groß.

Mit der Übertragung der Werte auf diese Arbeit soll ein theoretischer Einblick auf die Vorgänge an der MAO-B ermöglicht werden. Die Konstanten für DA wurden auf $K_m(\text{DA}) = 9,6 \mu\text{mol/L}$ und $V_{\max}(\text{DA}) = 0,167 \mu\text{g/min/mg}$ (auf die Molekülmasse des DA berechnet entspricht dies ca. 1 nmol DA/min/mg) geschätzt. Für die folgenden Berechnungen wurden als extrazelluläre Konzentrationen 100 $\mu\text{mol/L}$ MDMA (entspr. ca. 50 Tbl.) und daraus resultierend 2000 nmol/L DA angenommen (siehe auch Tab. 10). Aus Berechnungen mit den kinetischen Konstanten für den SERT (siehe auch 6.7) konnte ermittelt werden, dass die DA-Aufnahme in das Cytosol 3,5 nmol/min/L und für MDMA 106,3 nmol/min/L betrug.

Werden diese Werte zur Berechnung eingesetzt, stellt sich Folgendes dar:

In den ersten Minuten der Aufnahme werden ca. 3,5 nmol/min/L DA aufgenommen, davon werden ca. 0,4 pmol/min/mg DA durch die MAO-B abgebaut. Diese Reaktion wird durch das zur gleichen Zeit aufgenommene MDMA nicht gehemmt. Ab einer Aufnahmezeit von ca. 10 min kumuliert die MDMA-Menge im Cytosol zu Konzentrationen, die den DA-Abbau geringfügig (2 %) hemmen könnten, nach 20 min wäre der Abbau erst um 4 % gehemmt. Selbst eine Aufnahme über 100 min hätte nur eine Hemmung von ca. 15 % zur Folge. Wird mit niedrigeren Konzentrationen gerechnet, wie sie z.B. nach 1 Tablette MDMA auftreten (DA = 260 nmol/L; MDMA

= 2000 nmol/L), so resultieren ähnliche Ergebnisse: Nach einer Inkubationszeit von 100 min könnte der Abbau über MAO-B nur um 7 % reduziert werden.

Wird die Tatsache mit berücksichtigt, dass nicht nur der Abbau des DA durch die MAO-B, sondern bereits vorher die DA-Aufnahme über den SERT durch vorhandenes MDMA gehemmt werden könnte, so muss mit einer deutlich geringeren DA-Menge gerechnet werden. Aus Tab. 12 ist ersichtlich, dass die Aufnahme von 2000 nmol/L DA durch 100.000 nmol/L MDMA auf ca. 1 % gesenkt wird. Wird nun mit einer DA-Aufnahme von 0,035 statt 3,5 nmol/min/L kalkuliert, ergibt sich aber das gleiche Bild: Bei einer theoretischen Inkubationszeit von 100 min könnte nur eine Abbau-Hemmung um 15 % erreicht werden.

Dies resultiert vor allem aus dem hohen K_i -Wert von 58 $\mu\text{mol/L}$ für die Hemmung der MAO-B durch MDMA. Um den Abbau hemmen zu können, müssten deutlich höhere MDMA-Konzentrationen im Cytosol erreicht werden.

Bei der Untersuchung der MDMA-Aufnahme über den SERT (6.3) konnte bereits gezeigt werden, dass nur eine begrenzte Akkumulation des MDMA in den Tbz stattfindet. Gilt dies auch für die serotoninerger Nervenendigungen, so könnte daraus gefolgert werden, dass die DA-Konzentration im Cytosol im Laufe der Zeit weiter ansteigt, die MDMA-Konzentration aber nie Dimensionen erreicht, in denen eine Hemmung der MAO-B erfolgt.

Eine Hemmung durch endogenes 5-HT ist ebenfalls nicht zu erwarten: 5-HT ist kein Substrat für die MAO-B, der K_m -Wert liegt nach Kokotos-Leonardi et al. (1992) bei 1170 $\mu\text{mol/L}$; diese Konzentration wird im Cytosol nicht annähernd erreicht, da das in den Nervenendigungen vorhandene 5-HT durch Ecstasy ausgeschüttet wird.

6.9 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Eine Oxidation von Membranlipiden durch reaktive Sauerstoffspezies kann die Bindung vieler spezifischer Liganden an Rezeptoren beeinflussen und die Neurotransmission verändern, also eine Neurodegeneration verursachen (Van den Vliet und Bast 1992, zit. aus Page et al. 1998). Die bei der Lipoperoxidation entstehenden Aldehyde, wie z. B. Malondialdehyd, sind selbst ebenfalls geno- und

cytotoxisch und können mit Biomolekülen wie Proteinen und Nukleinbasen reagieren (Yeo et al. 1994).

Sprague und Nichols (1995b) haben in ihrer Arbeit festgestellt, dass nach MDMA-Gabe vermehrt Malondialdehyd, ein Marker für die Lipidoxidation, im Hirngewebe (Ratte) entsteht. Ob die Radikale, die die Lipidmembranen angreifen, durch DA oder MDMA entstanden sind, wurde nicht untersucht. Zur Klärung wurden eigene Untersuchungen durchgeführt:

Zwei verschiedene Methoden, die auf dem Einsatz von Peroxidasen basieren, können hierfür eingesetzt werden:

1. Formation eines Peroxidase-H₂O₂-Enzymkomplexes und die Messung eines Intermediates oder der Abnahme des Substrates,
2. Messung der Oxidation von Wasserstoff-Donatoren in Reaktionen, die mit der H₂O₂-Bildung gekoppelt sind (Boveris 1984).

Eine verbreitete Methode zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid gehört zur zweiten Gruppe: Sie beruht auf einer Peroxidase-katalysierten Oxidation des fluoreszierenden Scopoletins (7-Hydroxy-methoxy-coumarin) durch H₂O₂ und wird seit vielen Jahren verwendet (Brusova 1983; De La Harpe und Nathan 1985; Hesford et al. 1987; Übersicht bei Corbett 1989). Diese Methode kann für unterschiedliche Matrices eingesetzt werden: Tbz: Brusova (1983); Monozyten und Makrophagen: De La Harpe und Nathan (1985); Leber-Mitochondrien: Swaroop und Ramasarma (1981).

Diese Scopoletin-Methode weist allerdings mehrere Nachteile auf. So ist die H₂O₂-Menge proportional zur Fluoreszenz-Löschung, die Messung einer Fluoreszenz-Abnahme aber meistens deutlich unempfindlicher als die Messung einer Fluoreszenz-Entstehung. Dazu kommt, dass die Eigenfluoreszenz des Scopoletins nicht sehr hoch ist und dieser Versuch somit einen recht hohen Background hat. Die Scopoletin-Fluoreszenz ist zudem stark pH- und Temperatur- abhängig und fällt außerdem im Laufe der Zeit ab. Reduzierende Substanzen, wie z.B. NADPH, können ebenfalls Interferenzen mit der Methode verursachen (Mohanty et al. 1997).

In dieser Arbeit wurde zunächst der Scopoletin-Test eingesetzt. Da aber die Linearität der Eichkurve nicht zufriedenstellend war und die Methode sich als zu störanfällig herausstellte, da z.T. die eingesetzten Agenzien bereits mit der Fluoreszenz interferierten, wurde die Fluoreszenz-Methode nach Mohanty et al. (1997) als eine weniger störanfällige Methode ausgewählt.

Folgende Vorteile bietet diese Methode im Vergleich zur Scopoletin-Methode: Die Fluoreszenz-Entstehung kann sehr viel sensitiver detektiert werden als die Fluoreszenz-Löschung, wodurch der Assay laut Quelle ca. 10-fach empfindlicher als der Scopoletin-Test ist. Der Background ist ebenfalls niedriger und die Fluoreszenz des umgesetzten Substrates (A6550) ist länger stabil und weniger temperatursensibel als die Scopoletin-Fluoreszenz.

Es konnte weiterhin mit Monoaminoxidase aus humanen Tbz gearbeitet werden. Dies hatte unter anderem den Vorteil, dass darin nicht so viel Vitamin C und Eisen wie z.B. im Hirn-Homogenat enthalten sind, wodurch freie Radikale entstehen könnten, die die Messungen verfälschen würden (Page et al. 1998).

In Gegenwart von einem Substrat und Sauerstoff können durch die Monoaminoxidase reaktive Sauerstoffspezies entstehen: $\text{MAO-B}_{(\text{red})} + \text{O}_2 \rightarrow \text{MAO-B}_{(\text{ox})} + \cdot\text{O}_2^-$.

Das als Produkt entstandene $\cdot\text{O}_2^-$ ist der Precursor von H_2O_2 und kann spontan dismutieren. Das gebildete H_2O_2 wird durch eine Metall-Ionen-katalysierte Haber-Weiss Reaktion zu $\cdot\text{OH}$ abgebaut, das der reaktivste und somit toxischste Vertreter der RIO ist (siehe auch Abb. 47 im Ergebnisteil). Da dieser zweite Abbauweg langsamer verläuft als der erste, kann eine geringe Menge H_2O_2 unter bestimmten Bedingungen akkumulieren, die dann detektiert werden kann (Zang und Misra 1993).

Da DA sehr leicht der Autoxidation unterliegt (Page et al. 1998), musste durch das Versuchsdesign sichergestellt sein, dass das durch die MAO-B entstandene Wasserstoffperoxid von den Autoxidations-Produkten unterschieden werden kann. Dies wurde gewährleistet, indem bei jeder Versuchsreihe jeweils ein Blindwert bestimmt wurde, d.h. eine Probe, in der die MAO-B durch Deprenyl gehemmt war. Die Menge des hier gebildeten H_2O_2 war höher als die des Leerwertes, bei dem DA durch H_2O ersetzt wurde, und entsprach der Autoxidation. Dieser Wert wurde jeweils

von den DA-Proben subtrahiert und die Differenz entsprach dem nur durch die Enzymaktivität gebildeten H_2O_2 .

Die Behauptung, Deprenyl habe *per se* einen Einfluss auf die Radikal-Bildung (Thomas et al. 1997), konnte unter diesen Reaktionsbedingungen nicht bestätigt werden. Die H_2O_2 -Bildung in den Leerproben mit Deprenyl unterschied sich nicht von den ungehemmten Leerproben. Für Deprenyl konnten also weder Radikalfänger- noch Autoxidations-Eigenschaften festgestellt werden, die die Untersuchung hätten beeinträchtigen können.

Es konnte nachgewiesen werden, dass durch den Abbau von DA durch die Monoaminoxidase-B der humanen Tbz H_2O_2 entsteht. Der Anteil des durch die Autoxidation entstandenen H_2O_2 ist wesentlich geringer (siehe Ergebnisteil 5.9.4).

Jacobsson und Fowler (1999) führten eine Studie zur DA-Neurotoxizität (an Neuronen-Zellkulturen vom Huhn) durch und kamen zu dem Ergebnis, dass DA oxidativen Stress produziert, der durch Catalase und Glutathion vermindert werden kann, aber nicht durch MAO verursacht wird, da keine Effektminderung durch Clorgylin oder Deprenyl zu beobachten war. Dies konnte mit diesen Versuchen an humanem Material widerlegt werden.

Wie bereits im Ergebnisteil dargelegt, steigert eine Inkubation mit MDMA die Bildung von Wasserstoffperoxid nicht. Bei gleichzeitiger Zugabe von MDMA und DA steigert MDMA die Bildung von H_2O_2 durch DA ebenfalls nicht.

Hiermit konnte bewiesen werden, dass die in anderen Arbeiten beobachtete Zunahme von Lipidoxidations-Markern auf einer Bildung von H_2O_2 durch den Abbau von DA beruht. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der vorgestellten Neurotoxizitäts-Hypothese.

Ein interessanter Aspekt ist die Erkenntnis, dass 5-HT als lokales Antioxidans fungiert (Mockus und Vrana 1998). Es reagiert als Radikalfänger und wird zu einem Dimer oxidiert (Huether und Schuff-Werner 1996), so dass die Lipidmembranen vor der Peroxidation durch reaktive Sauerstoffspezies bewahrt bleiben. Nach dem Einwirken von Ecstasy und dem damit erhöhten DA-Aufkommen in den Nervenenden sind nicht

nur die reduktiven Kapazitäten möglicherweise erschöpft, die Nerven terminals verlieren zusätzlich durch den Ecstasy-vermittelten Efflux des 5-HT ein potentes Antioxidans, wodurch die Vulnerabilität wahrscheinlich noch stärker erhöht ist.

Wie bereits gezeigt wurde, ist DA eine potentielle Quelle für freie Radikale und dafür bekannt, auch *per se* cytotoxische Effekte zu verursachen. Nach Stone et al. (1988) wirkt DA als Cytotoxin: DA-Autooxidationsprodukte, wie z.B. DA-O-Quinon, interagieren mit intrazellulären Sulfhydrylgruppen, die in Zell-Enzymen und neuronalen Membranen vorkommen. Dies lässt eine zweifache Schädigung durch DA vermuten: Zum einen die direkte Schädigung durch die DA-Oxidationsprodukte und zum anderen durch die RIO (O_2^- , H_2O_2 und $OH\cdot$) die zu einem geringeren Teil als Nebenprodukte bei der Autoxidation und zu einem deutlich größeren Anteil beim DA-Abbau durch die Oxidase entstehen.

6.10 Das Problem der Stereoselektivität

Da es sich bei allen untersuchten Amphetaminen und Amphetamin-Derivaten um optisch aktive Substanzen handelt, musste vor Beginn der Arbeit festgelegt werden, ob diese als Racemate oder Enantiomere untersucht werden sollten.

Bei der Durchsicht der Literatur finden sich für einige dieser Substanzen Angaben über unterschiedliche Wirkungen oder Wirkstärken der verschiedenen Enantiomere.

Allerdings widersprechen sich die Ergebnisse zum Teil (vergl. Schmidt et al. 1987; Johnson et al. 1986) oder die Effekte waren konzentrationsabhängig (Johnson et al. 1988). Teilweise war je nach beobachtetem Phänomen ein anderes Enantiomer stärker wirksam (vergl. Schmidt und Taylor 1987; Johnson et al. 1986, 1988; Nichols et al. 1982; Schmidt et al. 1987). Darüber hinaus gibt es Quellen, die bei bestimmten Effekten keine Stereoselektivität der Substanzen nachweisen konnten (Johnson et al. 1986; Steele et al. 1987).

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Tatsache, dass über eine mögliche Stereoselektivität von MBDB und MDEA in der Literatur nur vereinzelt berichtet

wurde (die 5-HT-Freisetzung durch MBDB soll z.B. nicht stereoselektiv sein (Johnson et al. 1986; Steele et al. 1987)).

Außerdem sind in den im Handel befindlichen Ecstasy-Tabletten aus Kostengründen fast ausschließlich die Racemate enthalten. Somit können Ergebnisse, die mit den Enantiomeren gewonnen wurden, nicht ohne weiteres direkt auf die Ecstasy-Konsumenten übertragen werden.

Schließlich wäre die Untersuchung aller Diastereomere zwar sehr umfangreich gewesen, aber ohne größeren Nutzen in Hinsicht auf die untersuchte Fragestellung.

In dieser Arbeit wurden aus oben genannten Gründen die Racemate verwendet.

Bei Amphetamin und Methamphetamin wurden im Zuge der Vergleichbarkeit ebenfalls die Racemate eingesetzt, obwohl auch für METH eine Stereoselektivität bekannt ist.

6.11 Diskussion der Hypothese

Ziel dieser Arbeit war es, den Pathomechanismus der durch Ecstasy vermittelten Neuro-Degeneration näher zu untersuchen, um Aufschluss über einen möglichen Schädigungshergang zu gewinnen. Hierzu wurde eine Übereinstimmung der gewonnenen Ergebnisse mit der entwickelten Hypothese überprüft.

Generell muss vor einer kritiklosen Übertragung von Ergebnissen, die an Modellen gewonnen werden, auf *in vivo*-Bedingungen gewarnt werden. Auch die Ergebnisse, die am Tbz-Modell ermittelt wurden, können nur mit Vorsicht übertragen werden, da die Tbz zwar ein geeignetes und bewährtes Modell für die serotonergen Nervenbahnen darstellen, aber nicht in allen Aspekten den Synaptosomen gleichen. Ebenso werden, wie bereits diskutiert, mit humanem Material zum Teil andere Ergebnisse erzielt als in Versuchen, die mit Material anderer Spezies gewonnen wurden, wodurch der Vergleich der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse mit anderen Studien erschwert, bzw. unmöglich ist.

Andererseits können durch den Einsatz unterschiedlicher Modelle auch Rückschlüsse auf den Schädigungsmechanismus gezogen werden, wie z.B. an folgender Arbeit deutlich wird:

Nash et al. (1991) stellten fest, dass sieben Tage nach MDMA-Gabe die maximale Bindung (B_{max}) für 5-HT-uptake-sites im frontalen Cortex vermindert war, in den Tbz der Versuchstiere (Ratten) aber nicht. Hieraus schlossen die Autoren, Tbz seien weniger empfindlich.

Diese Beobachtung könnte aber auch so interpretiert werden, dass DA (das in den Tbz nicht vorliegt) eine wichtige Rolle bei der Neurotoxizität spielt; dies würde die Hypothese sogar unterstützen.

6.11.1 Überprüfung der Hypothese

Im Folgenden soll diskutiert werden, inwieweit die gewonnenen Ergebnisse mit der zuvor postulierten Schädigungs-Hypothese übereinstimmen. Zusätzlich werden sie mit weiteren Angaben in der Literatur verglichen.

Zur Verdeutlichung ist der vermutete Pathomechanismus graphisch dargestellt (Abbildung 59):

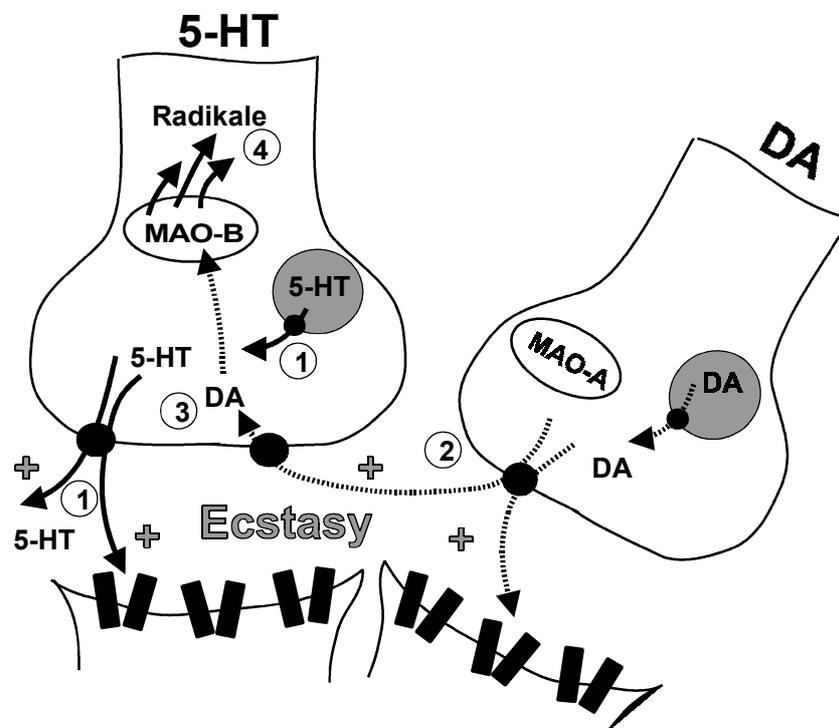


Abbildung 59 Hypothese des Pathomechanismus

Folgende Faktoren müssen gegeben sein, damit der Schädigungsprozess so erfolgt, wie angenommen:

1. Die Ausschüttung von 5-HT ist gesteigert, die Nervenendigungen verarmen an 5-HT, da es nicht wieder über den durch Ecstasy gehemmten SERT zurücktransportiert werden kann und über den synaptischen Spalt abdiffundiert. Hierzu gibt es bereits zahlreiche Studien, die belegen, dass die 5-HT-Ausschüttung durch Ecstasy stark erhöht wird. Der Efflux erfolgt über den Transporter, da er durch SSRI hemmbar und nicht Calcium-Ionen-abhängig ist. Die Hemmung des 5-HT-Reuptake wurde in dieser Arbeit genauer untersucht und charakterisiert. Alle Ecstasy-Substanzen sind kompetitive Inhibitoren mit einer ähnlichen Hemmstärke; die Weckamine hemmen den SERT ebenfalls, aber um ein Fünffaches weniger stark.
2. Auch DA wird unter dem Einfluss von Ecstasy vermehrt freigesetzt, wie bereits in zahlreichen Arbeiten beschrieben wurde. Es wurde beobachtet, dass mit zunehmender Größe des Substituenten die DA-Freisetzung schwächer wird. Folgende Reihenfolge in abnehmender Potenz konnte aufgestellt werden: MDA > MDMA > MDEA (Crespi et al. 1997; McKenna et al. 1991; Schmidt und Taylor 1987). MBDB bewirkt allerdings laut einiger Arbeiten nur eine geringe oder keine Freisetzung von DA (Callaway et al. 1991; Johnson et al. 1986). Es muss jedoch angenommen werden, dass die DA-Freisetzung durch Ecstasy wesentlich geringer ist als die 5-HT-Freisetzung, da sie über die präsynaptischen 5-HT-Rezeptoren dopaminergischer Nerven vermittelt wird und nicht über die Hemmung des DA-Membrantransporters.
3. DA muss in die serotoninergeren Nervenendigungen gelangen. Trotz widersprüchlicher Angaben in der Literatur konnte in dieser Arbeit eine Aufnahme des DA als falscher Transmitter in die Tbz bewiesen werden. Dies geschieht über den SERT. In diesem Fall gibt es eine Voraussetzung, die erfüllt sein muss, damit eine DA-Aufnahme *in vivo* erfolgen kann: Die Ecstasy-

Substanzen müssen schon weitgehend aus dem synaptischen Spalt abdiffundiert sein, da sonst die DA-Aufnahme über den Transporter durch Ecstasy gehemmt wird (siehe 6.7). Ein Transport des DA kann deshalb nicht sofort erfolgen, sondern etwas verzögert. Die Annahme, dass auch 5-HT weitgehend aus dem synaptischen Spalt diffundiert sein muss, da es andernfalls die DA-Aufnahme hemmt, wurde nicht bestätigt. Aufgrund der großen Konzentrationsunterschiede nach Ecstasy-Einwirkung vermag 5-HT den DA-Transport nicht zu hemmen (siehe 6.7). Nach Nash (1990) ist das Maximum der DA-Ausschüttung durch Ecstasy nach ca. 40 min erreicht. Schmidt (1987) stellte fest, dass die Gabe des SSRI Fluoxetin auch drei Stunden nach MDMA die Spätfolgen verhindern kann. Sechs Stunden später können nur noch 50% verhindert werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme eines zeitversetzten Transportes.

4. DA muss von der Monoaminoxidase-B abgebaut werden. Dabei müssen reaktive Sauerstoff-Metaboliten freiwerden, die in den Nervenendigungen eine Oxidation der Membranlipide verursachen. Dies konnte in mehreren Studien bewiesen werden. Die vorliegende Arbeit belegt, dass durch einen Abbau von DA durch MAO-B Wasserstoffperoxid entsteht (siehe Ergebnisteil 5.9.4). Sprague und Nichols (1995b) bewiesen bereits im Hirngewebe von Ratten die vermehrte Entstehung von Malondialdehyd (als Lipoxidations-Marker) nach MDMA-Gabe. Zu bedenken ist allerdings, dass Ecstasy, wie in dieser Arbeit bewiesen wurde, selbst die Aktivität der MAO-B hemmt. Dieser Effekt scheint nicht relevant zu sein, da er zum einen reversibel ist und vor allem erst bei sehr hohen Konzentrationen auftritt. Da Ecstasy - wie gezeigt werden konnte - im Cytosol nicht unbegrenzt akkumuliert, kommen diese hohen Konzentrationen unter normalen Konsum-Bedingungen nicht zustande. Außerdem wurde ein Effekt durch eine gleichzeitige Inkubation mit DA und MDMA überprüft und festgestellt, dass die Anwesenheit des Inhibitors keinen Effekt auf die H₂O₂-Entstehung ausübte. Shankaran et al. (1999b) konnten beweisen, dass MDMA zusätzlich zur extrazellulären DA-Konzentration auch die Hydroxyl-Radikal-Bildung erhöht. Dieser Effekt kann durch Fluoxetin verhindert werden,

wodurch die These unterstützt wird, dass es sich um einen SERT-abhängigen Effekt handelt, die Radikal-Bildung also innerhalb der Nervenendigungen stattfindet.

Werden alle hier dargestellten Faktoren zusammengefasst, kann gefolgert werden, dass die Neuronen-Degeneration durch Ecstasy auf diesem Wege stattfinden kann, vorausgesetzt, die oben diskutierten Bedingungen sind erfüllt.

Diese Schlussfolgerung setzt allerdings voraus, dass die mit Tbz gewonnenen Ergebnisse auf die serotoninergeren Nervenendigungen übertragen werden können.

Es finden sich zahlreiche Publikationen, deren Ergebnisse diese Schädigungs-Hypothese unterstützen:

McKenna et al. (1991) stellten fest, dass die Substanzen, die in ihrer Arbeit die größte Potenz als DA-Releaser hatten (MDA > MDMA >> MDEA), in anderen Studien als die potentesten Neurotoxine *in vivo* ermittelt wurden (Ricaurte et al. 1987). Die serotoninerge Neurotoxizität korrelierte linear mit der akuten Erhöhung der extrazellulären DA-Konzentration, wie Nash und Nichols (1991) beweisen konnten. Stone et al. (1988) behandelten Ratten mit einem DA-Synthese-Inhibitor (α -Methyl-p-tyrosin) oder einem DA-Aufnahme-Blocker (GBR-12909) und konnten so die MDMA-induzierte Neurotoxizität verhindern. Auch Schmidt et al. (1990) konnten beweisen, dass nach vorheriger Zerstörung von DA-Terminals mittels 6-Hydroxy-dopamin keine 5-HT-Terminal-Zerstörung durch Ecstasy auftrat, die Neurotoxizität also DA-abhängig ist. Dementsprechend potenzierte eine Vorbehandlung mit L-DOPA (DA-Synthese-Precursor) die Neurotoxizität des MDMA (Schmidt et al. 1991). Da Langzeit-Schäden durch einen Inhibitor der Tyrosin-Hydroxylase (TH) verhindert werden konnten, vermuteten die Autoren hohe lokale DA-Konzentrationen als verantwortlich für den 5-HT-Verlust (Stone et al. 1988). Eine Hemmung des DA-uptake-carriers schwächte die Langzeit-Verluste bei 5-HT und 5-HIAA signifikant ab. Dies zeigt ebenfalls, dass die gesteigerte Freisetzung von DA über den DA-Transporter eine wichtige Rolle im neurotoxischen Geschehen spielt (Schmidt und Taylor 1987).

Die Feststellung dreier Arbeitsgruppen (Nash et al. 1990; Schmidt et al. 1990; Hewitt und Green 1994), dass die Neurotoxizität durch 5-HT₂-Rezeptor-Antagonisten vermindert wird, hebt ebenfalls die Rolle des DA hervor: Da 5-HT als Agonist des präsynaptischen 5-HT₂-Rezeptors eine Steigerung der DA-Freisetzung zur Folge hat (z.B. im Falle einer Ecstasy-Wirkung), könnte durch einen Antagonisten die Schädigung durch einen verringerten 5-HT-induzierten DA-Release abgeschwächt werden.

Die akute Depletion von 5-HT soll in allen Hirnregionen gleich sein, ein neurotoxisches Geschehen aber vorwiegend im Striatum auftreten. Deshalb muss nach Nash et al. (1990) im Striatum ein „sekundäres Event“ stattfinden, welches zur Degeneration führt. Da die DA-Konzentration in dieser Hirnregion besonders hoch ist, spricht auch dies für eine wichtige Rolle des DA im neurotoxischen Geschehen.

Auch die Rolle der MAO-B und der durch den Abbau entstehenden Radikale ist in einigen Arbeiten bereits diskutiert worden: So konnten Sprague und Nichols (1995b) beweisen, dass der Einsatz von MAO-B-Inhibitoren vor MDMA-induzierter Lipidoxidation und Langzeit-5-HT-Defiziten bewahrt. Shankaran et al. (1999b) belegten mit Hilfe eines 2,3-Hydroxybenzoesäure-Testes eine Hydroxyl-Radikal-Bildung nach MDMA-Gabe. Esteban et al. (2001) und Cadet et al. (2001) (zit. nach Rothman und Baumann 2002) sahen ebenfalls den oxidativen Stress als neurotoxisches Agens an.

Im Hinblick auf diese Untersuchungsergebnisse und die vergleichenden Versuche mit Amphetamin und Methamphetamin stellt sich die Frage, ob auch die Weckamine neurotoxisch sind. Zumindest für Methamphetamin gibt es Studien, die eine Degeneration sowohl der serotoninergen, als auch der dopaminergen Nervenendigungen bestimmter Hirnareale postulieren (Ricaurte und Mc Cann 1992; Yang et al. 1997). Bei einer Durchsicht der Literatur scheinen die Substanzen oft sehr ähnlich zu reagieren: Schmidt und Lovenberg (1985) stellten fest, dass Methamphetamin gleiche Effekte wie Ecstasy haben soll, also einen DA-Anstieg, eine Tryptophanhydroxylase- (TPH-) und eine Tyrosinhydroxylase- (TH-) Aktivitäts-Verminderung verursacht. In Bezug auf die DA-Freisetzung zeigte sich, dass

(+)AMPH und (+)METH stärker wirksam sind als MDMA (Rothman und Baumann 2002). Diese Eigenschaften sind schon seit längerem bekannt und wurden z.T. bereits in die Lehrbücher aufgenommen.

Auch in dieser Arbeit zeigten die Weckamine ähnliche Eigenschaften wie die Ecstasy-Substanzen, die sich nur in der Dimension unterschieden, nicht in der Qualität.

Werden nun die Ergebnisse in einen Zusammenhang mit der Neurotoxizität gebracht, so kann anhand der Hemm-Qualitäten, also der ermittelten K_i -Werte, der einzelnen Substanzen in Bezug auf die untersuchten Parameter eine Prognose für ihr neurotoxisches Potential abgegeben werden (vorausgesetzt, dies ist bei den z.T. nur marginalen Unterschieden zulässig):

Amphetamin hemmt sehr stark die MAO-B, aber nur schwach den SERT und den Vesikel-Transporter. Daraus könnte gefolgert werden, dass es nicht neurodegenerativ auf die 5-HT-Terminals wirkt. Diese Feststellung deckt sich mit Ergebnissen anderer Publikationen, wie z.B. Ricaurte und McCann (1992), die postulierten, dass Amphetamin toxisch für dopaminerge, nicht aber für serotoninerge Neuronen sei.

Methamphetamin hemmt nur wenig die MAO-B-Aktivität, etwas stärker den SERT und nur wenig den Vesikel-Transporter. Es könnte bei sehr hohen Konzentrationen neurotoxisch wirken. Auch dieses Ergebnis deckt sich mit der Arbeit von Ricaurte und McCann (1992), die für Methamphetamin eine neurotoxische Wirkung auf dopaminerge und serotoninerge Nervenendigungen beschrieben haben.

Im Vergleich dazu inhibiert MDA den SERT stark, die MAO-B aber erst bei sehr hohen Konzentrationen. Dies deckt sich mit den Literaturangaben, in denen es als das stärkste Neurotoxin beschrieben ist.

MDMA bewirkt ebenfalls eine starke SERT-Inhibition (und Hemmung des Vesikel-Transporters), außerdem bewirkt es eine stärkere MAO-B-Inhibition als MDA. Es kann demnach neurotoxisch wirken, aber nicht so stark wie MDA. Dieser Befund findet ebenfalls Unterstützung in der Literatur, wo z.B. Ricaurte et al. (1987) für MDA eine höhere neurotoxische Aktivität als für MDMA ermittelten.

MBDB gilt als schwaches Neurotoxin. Es hemmt den Membran- und den Vesikel-Transporter weniger als MDMA und MDA, die Monoaminoxidase-B wird stark inhibiert.

Bei dem letzten Vertreter der Gruppe, MDEA, verhält es sich ähnlich wie bei MBDB. Die Inhibition des SERT ist ein wenig schwächer als bei den anderen Substanzen, die Hemmung der MAO-B liegt in dem Bereich, in dem auch die K_i -Werte der Weckamine liegen. Hieraus ergibt sich, dass die neurotoxische Potenz ungefähr mit der von MBDB zu vergleichen wäre und höher ist als bei den Weckaminen. Auch hier kann vermutet werden, dass MDEA erst bei höheren Konzentrationen toxisch ist. Eine Neuro-Degeneration durch MBDB und MDEA wurde durch Ricaurte et al. (1987) belegt, wobei für MDEA eine neurotoxische Potenz ermittelt wurde, die ca. bei einem Viertel der MDMA-Potenz liegt. Schmidt und Lovenberg (1986, zit. nach Ricaurte et al. 1987) konnten keine Neurotoxizität für MDEA nachweisen, wobei aber nur einmalig 20 mg/kg KG gegeben wurden und nicht wie bei Ricaurte et al. (1987) mehrfach 20 oder 40 mg/kg KG, somit vermutlich aufgrund einer zu geringen Konzentration kein Effekt beobachtet werden konnte.

Es kann somit zusammengefasst werden, dass die Schädigung der serotoninergen Nervenendigungen zumindest zum Teil durch eine Aufnahme des DA als falscher Transmitter in die 5-HT-Terminals, dessen dortigen Abbau durch die MAO-B und die daraus resultierende Radikalbildung bewirkt werden könnte.

6.12 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgelegten und diskutierten Ergebnisse liefern zumindest Teilaspekte der Neurotoxizität durch Ecstasy in den serotoninergen Nervenendigungen.

Ob sie tragfähig sind, insbesondere die mangelnde Regenerationsfähigkeit der Axone zu erklären, mag bezweifelt werden und muss durch weitere Untersuchungen an Neuronengewebskulturen direkt studiert werden.

7 Zusammenfassung

7.1 Zusammenfassung

Die irreversible Neurotoxizität von Ecstasy ist tierexperimentell gut belegt. Histologische, immunhistologische und radiochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass Ecstasy eine Degeneration solcher serotoninerger Axone verursacht, die aus der dorsalen Raphe der Region B 5 - B 8 entspringen und aufsteigend verlaufen. Die Schädigung gilt als überwiegend irreversibel. Affen sind empfindlicher als z.B. Ratten; es liegt daher nahe, dass auch beim Menschen eine hohe Empfindlichkeit besteht.

Der Pathomechanismus dieser Schädigung ist bisher ungeklärt.

Es ist gesichert, dass durch Ecstasy (MDA, MDMA, MDEA, MBDB) Serotonin (5-HT) aus den Nervenendigungen freigesetzt wird und durch Hemmung des Membran-Transporters nicht wieder zurück in die Nerven aufgenommen werden kann. Es ist daher zu vermuten, dass das 5-HT deshalb aus dem synaptischen Spalt abdiffundiert und somit die Nervenendigungen an 5-HT verarmen. Dopamin, das aufgrund der 5-HT-Wirkung an den präsynaptischen 5-HT-Rezeptoren dopaminerger Nerven ebenfalls vermehrt ausgeschüttet wird, könnte nun an die 5-HT-Synapsen diffundieren und in die an 5-HT verarmten Nervenendigungen als falscher Transmitter aufgenommen werden. Das aufgenommene Dopamin kann dann durch die mitochondriale Monoaminoxidase-B desaminiert werden, wodurch reaktive Sauerstoffspezies entstehen. Dies führt zu einer Lipoperoxidation der Membranen, die eine Degeneration der 5-HT-Axon-Terminals zur Folge hat.

Dieser Hypothese sollte nachgegangen werden, wobei vor allem die Verhältnisse beim Menschen untersucht werden sollten.

Zwei Hauptfragen sollten geklärt werden:

1. Kann Dopamin in die serotoninergeren Nervenendigungen gelangen?
2. Entstehen in den Axon-Terminals durch den Abbau des Dopamins reaktive Sauerstoffspezies?

Um die genannten Fragen zu klären, wurden folgende Teilaufgaben bearbeitet:

- Auswahl und Entwicklung eines geeigneten Modells zur Untersuchung der serotoninergeren Nervenendigungen.
- Erstellung einer Kinetik der 5-HT-Aufnahme über den membranständigen selektiven Serotonin-Transporter.
- Untersuchung, ob Dopamin ebenfalls über den 5-HT-Transporter aufgenommen werden kann. Bestimmung der kinetischen Konstanten.
- Überprüfung einer möglichen Aufnahme von Ecstasy über den 5-HT-Transporter. Messung der Aufnahme-Kinetik.
- Analyse des Effektes der Ecstasy-Substanzen (MDMA, MDA, MDEA und MBDB) auf den selektiven Serotonin-Transporter. Erstellung einer Hemmkinetik, Vergleich der vier Substanzen mit Amphetamin und Methamphetamin.
- Untersuchung der Aufnahme von 5-HT, Dopamin und MDMA über den Amin-Transporter der Speichervesikel.
- Die Monoaminoxidase-B (MAO-B): Hat Ecstasy einen Einfluss auf ihre Aktivität? Bestimmung der Hemmkinetiken für MDMA, MDA, MDEA, MBDB, AMPH und METH.
- Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies durch den oxidativen Abbau von Dopamin durch MAO-B. Welchen Einfluss haben die Ecstasy-Substanzen?

Es wurde gefunden, dass

- humane Thrombozyten ein geeignetes Modell zur Untersuchung der serotoninergeren Nerven-Terminals darstellen.
- folgende kinetischen Konstanten für die 5-HT-Aufnahme über den humanen selektiven Serotonin-Transporter (SERT) der Thrombozyten gelten:

$K_m = 0,6 \mu\text{mol/L}$; $V_{\text{max}} = 4 \text{ pmol}/5 \times 10^7 \text{ Tbz/min}$.

- Dopamin ebenfalls über den SERT aufgenommen werden kann. Die kinetischen Konstanten für Dopamin sind: $K_m = 2,6 \mu\text{mol/L}$; $V_{\text{max}} = 0,8 \text{ pmol}/5 \times 10^7 \text{ Tbz/min}$.
- auch MDMA über denselben Transporter in die Thrombozyten gelangen kann. Hier liegt die Michaelis-Konstante K_m bei $3,4 \mu\text{mol/L}$ und die maximale Aufnahmegeschwindigkeit bei $V_{\text{max}} = 11 \text{ pmol}/5 \times 10^7 \text{ Tbz/min}$ (bei einer Inkubationszeit von 10 s).
- die aufgenommene MDMA-Menge nur über wenige Sekunden ansteigt und dann über die übrige Inkubationszeit stagniert oder sogar ein wenig abnimmt.
- Dopamin und MDMA ebenfalls über den Amin-Transporter in die Speichervesikel aufgenommen werden.
- alle untersuchten Ecstasy-Substanzen die 5-HT-Aufnahme über den SERT kompetitiv hemmen. Die K_i -Werte liegen zwischen $2,4$ und $3,2 \mu\text{mol/L}$, die Reihenfolge der Hemmstärke ist: $\text{MDA} > \text{MDMA} > \text{MBDB} > \text{MDEA}$.
- die untersuchten Weckamine Amphetamin (AMPH) und Methamphetamin (METH) den SERT ebenfalls kompetitiv hemmen. Die K_i -Werte liegen ca. 5fach höher: $14,5$ und $11,9 \mu\text{mol/L}$.
- sowohl die untersuchten Ecstasy-Substanzen, als auch AMPH, METH und Dopamin kompetitive, reversible Inhibitoren der Monoaminoxidase-B der Thrombozyten sind. Die K_i -Werte liegen zwischen 47 und $159 \mu\text{mol/L}$, die Reihenfolge der Hemmstärke ist: $\text{MBDB} = \text{MDMA} > \text{MDEA} = \text{AMPH} = \text{METH} > \text{MDA} = \text{Dopamin}$.
- in die serotoninergeren Nervenendigungen aufgenommenes Dopamin durch Einwirkung der MAO-B zur Entstehung von H_2O_2 führt.

Anhand der gemessenen kinetischen Konstanten beim Menschen lässt sich die Bestätigung der Ausgangshypothese ableiten. Ob sie als pathobiochemische Ursache der Axon-Schädigung ausreicht, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

7.2 Summary

The irreversible neurotoxicity of “ecstasy” has been proved by various studies in animals. Histological, immunohistological and radiochemical investigations have shown that ecstasy (MDMA, MDA, MDEA, MBDB) induces a degeneration of ascendend serotonergic axons of the dorsal raphe (region B 5 – B8). This pathological changes seemed to be predominantly irreversible.

Primates have been found to be more sensitive than rodents; this suggests that there is a high sensitivity in humans, too.

The exact pathomechanism still remains unclear.

Ecstasy-treatment leads to an increased serotonin-efflux and the reuptake of serotonin is not possible because the selective serotonin transporter is inhibited by ecstasy.

It is suggested that as a consequence serotonin remains in the synaptic cleft and gets lost by diffusion so the nerve terminals become poor of serotonin.

Dopamine, which is also increased by ecstasy (because of an effect of serotonin at the presynaptic serotonin-receptors of the dopaminergic neurons) is able now to diffuse to the serotonergic synapse and enter the axon terminals as a false transmitter. The deamination of excessive dopamine by monoamine oxidase B within the serotonergic terminal generates hydrogen peroxide. This leads to membrane lipid peroxidation and axon degeneration.

This hypothesis should be followed up by investigation concentrating on the proportions in humans.

Two main questions should be clarified:

1. Is dopamine able to get into serotonergic nerve terminals?
2. Do reactive hydrogen species result from dopamine catabolism in axon terminals?

To clear up this questions, the following tasks were investigated:

- Selection and development of a suitable model for investigation of serotonergic nerve terminals.
- Determination of the kinetic parameters for the serotonin-uptake via the membrane-standing selective serotonin transporter.
- Investigation if dopamine can be transported via the selective serotonin transporter. Determination of the kinetic constants.
- Determination of a possible uptake from ecstasy via the serotonin transporter. Measurement of the uptake kinetic.
- Examination of the effect from ecstasy-substances (MDMA, MDA, MDEA and MBDB) on the selective serotonin transporter. Preparation of inhibitor-kinetics and comparison of the four substances with amphetamine and methamphetamine.
- Investigation of the uptake from serotonin, dopamine and MDMA via the amine transporter of the storage-vesicles.
- Monoamine oxidase-B: Has ecstasy an effect on its activity? Determination of the inhibitor-kinetics for MDMA, MDA, MDEA, MBDB, amphetamine (AMPH), methamphetamine (METH).
- Generation of reactive hydrogen species through oxidative decomposition of dopamine by monoamine oxidase B? Which influence has ecstasy?

It was found that:

- human platelets are a suitable model for investigation of serotonergic nerve terminals.
- the following kinetic constants for serotonin-uptake via the human selective serotonin transporter are valid: $K_m = 0,6 \mu\text{mol/L}$; $V_{\text{max}} = 4 \text{ pmol}/5 \times 10^7 \text{ Tbz/min}$.
- dopamine can be transported likewise via the selective serotonin transporter (SERT). The kinetic constants for dopamine are: $K_m = 2,6 \mu\text{mol/L}$; $V_{\text{max}} = 0,8 \text{ pmol}/5 \times 10^7 \text{ Tbz/min}$.
- also MDMA gets into the platelets: $K_m = 3,4 \mu\text{mol/L}$; $V_{\text{max}} = 11 \text{ pmol}/5 \times 10^7 \text{ Tbz/min}$ were observed (incubation time was 10 sec).

- the uptake of MDMA is raising only a few seconds and stagnates during the remaining incubation time, even decreases a little.
- dopamine and MDMA are transported likewise via the amine transporter into storage-vesicles.
- all investigated ecstasy-substances inhibit serotonin-uptake via the serotonin transporter competitively. The K_i are between 2,4 and 3,2 $\mu\text{mol/L}$, the rank of inhibitory strength is: MDA > MDMA > MBDB > MDEA.
- the investigated amines AMPH and METH are also inhibiting the selective serotonin transporter competitively. But K_i values are about fivefold higher: 14,5 and 11,9 $\mu\text{mol/L}$.
- the ecstasy-substances as well as the amines AMPH and METH and dopamine are competitive inhibitors of platelet monoamine oxidase B. The K_i values are between 47 and 159 $\mu\text{mol/L}$, the ranking is: MBDB = MDMA > MDEA = AMPH = METH > MDA = Dopamine.
- after uptake into the serotonergic nerve terminals dopamine leads to the formation of hydrogen peroxide through monoamine oxidase B.

On the basis of the determined kinetic constants for humans the hypothesis can be validated. At this point further investigations have to show if it is a sufficient pathochemical cause for the axon-degeneration.

8 Literaturverzeichnis

AFFOLTER H AND PLETSCHER A (1982)
Storage of Biogenic Amines in Intact Blood Platelets of Man. *Mol Pharmacol* 22:94-98

AMINOFF MJ, TRENCHARD A, TURNER P, WOOD WG, HILLS M (1974)
Plasma uptake of dopamine on 5-HT and plasma-catecholamine levels in patients with Huntingtons' chorea. *Lancet* 9(2):1115-1116

AYMARD N, HONORE P, CARBUCCIA I (1994)
Determination of 5-Hydroxytryptamine and Tryptophan by Liquid Chromatography in Whole Blood. Its Interest for the Exploration of Mental Disorders. *Prog Neuro Psychoph and Biol Psych* 18:77-86

AZMITIA EC, MURPHY RB, WHITAKER-AZMITIA PM (1990)
MDMA (ecstasy) effects on cultured serotonergic neurons: evidence for Ca²⁺-dependent toxicity linked to release. *Brain Res* 510(1):97-103

BANKSON MG AND CUNNINGHAM KA (2001)
3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA) as a Unique Model of Serotonin Receptor Function and Serotonin - Dopamine Interactions. *J Pharmacol Exp Ther* 297:846-852

BARBEAU A, CAMPANELLA G, BUTTERWORTH RF, YAMADA K (1975)
Uptake and efflux of [¹⁴C]-dopamine in platelets: evidence for a generalized defect in Parkinson's disease. *Neurol* 25(1): 1-9

BARBER AJ AND JAMIESON GA (1970)
Isolation and Characterisation of Plasma membranes from Human Blood Platelets. *J Biol Chem* 245(23):6357-6365

BARTHOLINI G AND PLETSCHER A (1964)
Two Types of 5-Hydroxytryptamine Release from Isolated Blood Platelets. *Experientia* 20:376-378

BATTAGLIA G, YEH SY, DE SOUZA EB (1988)
MDMA-Induced Neurotoxicity: Parameters of Degeneration and Recovery of Brain Serotonin Neurons. *Pharmacol Biochem Behav* 29(2):269-274

BATTAGLIA G, YEH SY, O'HEARN E, MOLLIVER ME, KUCHAR MJ, DE SOUZA EB (1987)
3,4-Methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine Destroy Serotonin Terminals in Rat Brain: Quantification of Neurodegeneration by

Measurement of [³H]Paroxetine-Labeled Serotonin Uptake Sites. *J Pharmacol Exp Ther* 242(3):911-916

BERNSEN G (1983)

Zur Thrombozytenflüssiglagerung. Reaktion auf hypotonen Schock und Serotoninaufnahme zur in vitro Vitalitätstestung. *Folia Haematol* 110(2):242-250

BOHN M, BOHN G, BLASCHKE G (1993)

Synthesis markers in illegally manufactured 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Int J Leg Med* 86:233-234

BOVERIS A (1984)

Determination of the Production of Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide in Mitochondria. *Meth Enzymol* 105:429-435

BRADFORD M (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254

BRUSOVA EG (1983)

Fliuorimetricheskii skopoletin-peroksidaznyi metod opredeleniia aktivnosti monoaminoksidazy v thrombotsitakh cheloveka. [Fluorometric scopoletin peroxidase method for determining monoamine oxidase activity in human platelets.] *Biull Eksp Biol Med* 96(12):116-118

CADET JL, LADENHEIM B, HIRATA H, ROTHMAN RB, ALI S, CARLSON E, EPSTEIN C, MORAN TH (1995)

Superoxide radicals mediate the biochemical effects of methylenedioxy-methamphetamine (MDMA): evidence from using [CuZn]-superoxide dismutase transgenic mice. *Synapse* 21(2):169-176

CALLAWAY CW, JOHNSON MP, GOLD LH, NICHOLS DE, GEYER MA (1991)

Amphetamine derivatives induce locomotor hyperactivity by acting as indirect serotonin agonists. *Psychopharmacol* 104:293-301

CETIN M, ESER B, ER O, UNAL A, KILIC E, PATROGLU T, COSKUN SH, ALTINBAS M, ARSLAN D, ILHAN O (2001)

Effects of DMSO on platelet functions and P-selectin expression during storage. *Transfus Apheresis Sci* 24(3):261-267

CHATTERJEE D AND ANDERSON GM (1993)

The Human Platelet Dense Granule: Serotonin Uptake, Tetrabenazine Binding, Phospholipid and Ganglioside Profiles. *Arch Biochem Biophys* 302(2):439-446

CHAUDHURI J, MARTIN RE, DONAHUE MJ (1988)

Evidence for the absorption and synthesis of 5-hydroxytryptamine in perfused muscle and intestinal tissue and whole worms of adult *Ascaris suum*. *Int J Parasitol* 18(3) :341-346

CHRIST W, RAKOW D, HONECKER H, COOPER H (1976)

Bestimmung der Monoaminoxidase und Catechol-O-Methyltransferase in menschlichen Blutbestandteilen. *Arzneim Forsch* 26(6):1151-1152

CHU T, KUMAGAI Y, DISTEFANO EW, CHO AK (1996)

Disposition of methylenedioxymethamphetamine and Three Metabolites in the Brains of Different Rat Strains and Their Possible Roles in Acute Serotonin Depletion. *Biochem Pharmacol* 51:789-796

CIERI UR (1998)

Determination of reserpine and rescinnamine in *Rauwolfia serpentina* powders and tablets: a collaborative study. *J AOAC Int* 81(2):373-380

COLADO MI AND GREEN AR (1994)

A study of the mechanism of MDMA ('Ecstasy') - induced neurotoxicity of 5-HT neurones using chlormethiazole, dizocilpine and other protective compounds. *Br J Pharmacol* 111:131-136

COLADO MI AND GREEN AR (1995)

The spin trap reagent alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron prevents 'ecstasy'-induced neurodegeneration of 5-hydroxytryptamine neurones. *Eur J Pharmacol* 280:343-346

COLADO MI, CAMARERO J, MECHAN AO, SANHEZ V, ESTEBAN B, ELLIOT JM, GREEN AR (2001)

A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine neurons in mouse brain. *Br J Pharmacol* 134:1711-1723

COLADO MI, ESTEBAN B, O'SHEA E, GRANADOS R, GREEN AR (1999a)

Studies on the neuroprotective effect of pentobarbitone on MDMA-induced neurodegeneration. *Psychopharmacol* 142:421-425

COLADO MI, GRANADOS R, O'SHEA E, ESTEBAN B, GREEN AR (1999b)

The Acute effect in Rats of 3,4-methylenedioxyethamphetamine (MDEA, "Eve") on Body Temperature and Long term Degeneration of 5-HT Neurones in Brain: A Comparison with MDMA ("Ecstasy"). *Pharmacol Toxicol* 84:261-266

COLADO MI, MURRAY TK, GREEN AR (1993)

5-HT loss in rat brain following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), *p*-chloroamphetamine and fenfluramine administration and effects of chlormethiazole and dizocilpine. *Br J Pharmacol* 108:583-589

COLADO MI, O'SHEA E, ESTEBAN B, GRANADOS R, GREEN AR (1999c)
In vivo evidence against clomethiazole being neuroprotective against MDMA ('ecstasy') - induced degeneration of rat brain 5-HT nerve terminals by a free radical scavenging mechanism. *Neuropharmacol* 38:307-314

COLADO MI, O'SHEA E, GRANADOS R, ESTEBAN B, MARTIN AB, GREEN AR (1999d)
Studies on the role of dopamine in the degeneration of 5-HT nerve endings in the brain of Dark Agouti rats following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or 'ecstasy') administration. *Brit J Pharmacol* 126:911-924

COLADO MI, O'SHEA E, GRANADOS R, MURRAY TK, GREEN AR (1997)
In vivo evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ('ecstasy') and p-chloroamphetamine but not the degeneration following administration following fenfluramine. *Br J Pharmacol* 121(5):889-990

COLADO MI, WILLIAMS JL, GREEN AR (1995)
The hyperthermic and neurotoxic effects of 'Ecstasy' (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) in the Dark Agouti (DA) rat, a model of the CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *Br J Pharmacol* 115:1281-1289

COLLINS GGS AND SANDLER M (1971)
Human Blood Platelet Monoamine Oxidase. *Biochem Pharmacol* 20:289-296

COMMINS DL, VOSMER G, VIRUS RM WOOLVERTON WL, SCHUSTER CR, SEIDEN LS (1987)
Biochemical and Histological Evidence that methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is Toxic to Neurons in the Rat Brain. *J Pharm Exp Ther* 241(1):338-345

CORBETT JT (1989)
The scopoletin assay for hydrogen peroxide. A review and a better method. *J Biochem Biophys Meth* 18:297-308

COZZI NC, SIEVERT M, SHULGIN AT, JACOB III P, RUOHO AE (1999)
Inhibition of plasma membrane monoamine transporters by β -ketoamines. *Eur J Pharmacol* 381:63-69

CRESPI D, MENNINI T, GOBBI M (1997)
Carrier-dependent and Ca^{2+} - dependent 5-HT and dopamine release induced by (+)-amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine p-chloroamphetamine and (+)-fenfluramine. *Br J Pharmacol* 121:1735-1743

CURRAN HV (2000)
Is MDMA ('Ecstasy') Neurotoxic in Humans? An Overview of Evidence and of Methodological Problems in Research. *Neuropsychol* 42:34-41

DA PRADA M, CESURA AM, LAUNAY JM, RICHARDS JG (1988)

Platelets as a model for neurones? *Experientia* 44:115-126

DAYA S, MIA RB, WHITELY CG (1992)

Isolation and purification of monoamine oxidase B from bovine liver by chromatofocusing. *Biochem Intern* 27(2):321-333

DEAN B AND COPOLOV DL (1991)

An assay to measure the simultaneous uptake of [³H]Dopamine and [¹⁴C]Serotonin by the human platelet reveals an imipramine-insensitive [³H]Dopamine uptake mechanism. *Life Sci* 50:341-347

DE LA HARPE J AND NATHAN CF (1985)

A Semi-Automated Micro-Assay for H₂O₂ Release by Human Blood Monocytes and Mouse Peritoneal Macrophages. *J Immunol Meth* 78:323-336

DE-LA-TORRE R, FARRE M, ORTUNO J, MAS M, BRENNEISEN R, ROSET PN, SEGURA J, CAMI J (2000)

Non-linear pharmacokinetics of MDMA ('ecstasy') in humans. *Br J Clin Pharmacol* 49(2):104-109

DINSE H (1997)

Ecstasy (MDMA)-Intoxikation – Ein Überblick. *Anaesthesist* 46:697-703

ESTEBAN B, O'SHEA E, CAMARERO J, SANCHEZ V, GREEN AR, COLADO MI (2001)

3,4-Methylenedioxymethamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose. *Psychopharmacol* 154(3):251-260

FARAJ BA, OLKOWSKI ZL, JACKSON RT (1994)

Active [³H]-Dopamine Uptake by Human Lymphocytes: Correlates with Serotonin Transporter Activity. *Pharmacology* 48:320-327

FERIGOLO M, MEDEIROS FB, BARROS HM (1998)

Ecstasy: a pharmacological review. *Rev Saude Publica* 32(5):487-495

FEUERSTEIN TJ, LUPP A, HERTTING G (1987)

The Serotonin (5-HT) Autoreceptor in the Hippocampus of the Rabbit: Role of 5-HT Biphasic Concentration. *Neuropharm* 26(8): 1071-1080

FINNEGAN KT, RICAURTE GA, RITCHIE LD, IRWIN I, PEROUTKA SJ, LANGSTON JW (1988)

Orally administered MDMA causes a long-term depletion of serotonin in rat brain. *Brain Res* 447:141-144

FISHKES H AND RUDNICK G (1982)

Bioenergetics of Serotonin Transport by Membrane Vesicles Derived from Platelet Dense Granules. *J Biol Chem* 257(10):5671-5677

FORNAI F, GIORGI FS, GESI M, CHEN K, ALESSRI MG, SHIH JC (2001)

Biochemical effects of the monoamine neurotoxins DSP-A and MDMA in specific brain regions of MAO-B-deficient mice. *Synapse* 39(3):213-21

FRIEDL W, PROPPING P, WECH B (1983)

³H-imipramine binding in platelets: influence of varying proportions of intact platelets in membrane preparations on binding. *Psychopharmacology-(Berl.)* 80(1):96-99

GEHLERT DR, SCHMIDT CJ, WU L, LOVENBERG W (1985)

Evidence for specific methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) binding sites in the rat brain. *Eur J Pharmacol.* 119 :135-136

GESPACH C, LAUNAY JM, EMAMI S, BONDOUX D, DREUX C (1986)

Biochemical and pharmacological characterization of histamine-mediated up-regulation of human platelet Serotonin uptake. Evidence for a subclass of histamine H₂receptors (H_{2h}) highly sensitive to H₂ receptor antagonists. *Agents and Actions* 18:115-119

GILL JR, HAYES JA, DE SOUZA IS, MARKER E, STAJIC M (2002)

Ecstasy (MDMA) Deaths in New York City: A Case Series and Review of the Literature. *J Forensic Sci* 47(1):121-126

GOLD LH, HUBNER CB, KOOB GF (1989)

A role for the mesolimbic dopamine system in the psychostimulant actions of MDMA. *Psychopharmacol* 99:40-47

GORDON JL AND OLVERMAN HL (1978)

5-Hydroxytryptamine and dopamine transport by rat and human blood platelets. *Br J Pharmacol* 62(2):219-226

GOUGH B, ALI SF, SLICKER W Jr, HOLSON RR (1991)

Acute effects of 3,4- methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on monoamines in rat caudate. *Pharmacol Biochem Behav* 39(3):619-623

GREEN AR, CROSS AJ, GOODWIN GM (1995)

Review of the pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "Ecstasy"). *Psychopharmacology* 119:247-260

GRONIER B AND JEANNINGROS R (1995)

Kinetic characterization of a carrier-mediated transport system for L-Tryptophan in human blood platelets. *Int Clin Psychopharm* 10:95-101

GU XF AND AZMITIA EC (1993)

Integrative transporter-mediated release from cytoplasmic and vesicular 5-hydroxytryptamine stores in cultured neurons. *Eur J Pharmacol* 235:51-57

GUDELSKY GA AND NASH JF (1996)

Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin-dopamine interactions. *J Neurochem* 66(1):243-249

HARMON JT, GRECO NJ, JAMIESON GA (1992)

Isolation of Human Platelet Plasma Membranes by Glycerol Lysis. *Meth Enzymol* 215:32-36

HASHIGUTI H, NAKAHARA D, MARUYAMA W, NAOI M, IKEDA T (1993)

Simultaneous determination of in vivo hydroxylation of tyrosine and tryptophan in rat striatum by microdialysis-HPLC: relationship between dopamine and serotonin biosynthesis. *J Neural Transm Gen Sect* 93(3):213-223

HASHIMOTO K, MAEDA H, HIRAI K, GOROMARU T (1993)

Drug effects on distribution of [³H]3,4-methylenedioxymphetamine in mice. *Eur J Pharmacol* 228:247-256

HAWIGER J (1992)

Repertoire of Platelet Receptors. *Meth Enzymol* 25:131-136

HAWKINS J (1951)

The Localisation of Amine Oxidase in the Liver Cell. *Biochem* 50:577-581

HAZIMITRIOU G, MC CANN UD, RICAURTE GA (1999)

Altered Serotonin Innervation Patterns in the Forebrain of Monkeys Treated with (+/-)-3,4-Methylenedioxymphetamine Seven Years Previously: Factors Influencing Abnormal Recovery. *J Neurosci* 19(12):5096-5107

HEGADOREN KM, BAKER GB, BOURIN M (1999)

3,4-Methylenedioxy analogues of amphetamine: defining the risks to humans. *Neurosci Biobehav Rev* 23(4):539-553

HEKMATPANAHAH CR AND PEROUTKA SSJ (1990)

5-hydroxytryptamine uptake blockers attenuate the 5-hydroxytryptamine-releasing effect of 3,4-methylenedioxymphetamine and related agents. *Eur J Pharmacol* 177(1-2):95-98

HELANDER A AND TOTTMAR O (1987)

Metabolism of biogenic aldehydes in isolated human blood cells, platelets and in plasma. *Biochem Pharmacol* 36(7):1077-1082

HENRY JA (1992)

Ecstasy and the dance of death. *BMJ* 305:5-6

HENRY JA, JEFFREYS KJ, DAWLING S (1992)

Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy). *Lancet* 340:384-387

HERMLE L, GOUZOULIS E, OEPEN G, SPITZER M, KOVAR KA, BORCHARD D, FÜNFGELD M, BERGER M (1993)

Zur Bedeutung der historischen und aktuellen Halluzinogenforschung in der Psychiatrie. *Nervenarzt* 64:562-571

HESFORD F, SCHMITT M, LAZARY S (1987)

Rapid data acquisition from a microtiter plate fluorescence reader and applications in kinetic measurements. *J Immunol Meth* 100:269-279

HEWITT KE AND GREEN AR (1994)

Chlormethiazole, Dizocilpine and Haloperidol Prevent the Degeneration of Serotonergic Nerve Terminals Induced by Administration of MDMA ('Ecstasy') to Rats. *Neuropharmacology* 33(12):1589-1595

HUETHER G AND SCHUFF-WERNER (1996)

Platelet Serotonin acts as a locally releasable antioxidant. *Recent Advances in Tryptophan Research* ed. By Filippini GA et al, Plenum Press NY

HUSSEINI H, MITROVIC V, SCHLEPPER M (1995)

Determination of monoamine oxidase B activity by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B* 672:138-142

IWERSEN S AND SCHMOLDT A (1996)

Two very different fatal cases associated with the use of methylenedioxyethylamphetamine (MDEA): Eve as deadly as Adam. *J Clin Tox* 34:241-244

JACOBSSON SOP AND FOWLER CJ (1999)

Dopamine and glutamate neurotoxicity in cultured chick telencephali cells: effects of antagonists, antioxidants and MAO inhibitors. *Neurochem Int* 34:49-62

JOHNSON MP, CONARTY PF, NICHOLS DE (1991)

[³H]monoamine releasing and uptake inhibition properties of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and p-chloroamphetamine analogues. *Eur J Pharmacol* 200(1) :9-16

JOHNSON M, ELAYAN I, HANSON GR, FOLTZ RL, GIBB JW, LIM HK (1992)
Effects of 3,4-Dihydroxymethamphetamine and 2,4,5-Trihydroxymethamphetamine, Two metabolites of 3,4-Methylenedioxyamphetamine, on Central Serotonergic and Dopaminergic Systems. *J Pharmacol Exp Ther* 261(2):447-453

JOHNSON M, HANSON GR, GIBB JW (1987)
Effects of *N*-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine (MDE) on central serotonergic and dopaminergic systems in the rat. *Biochem Pharmacol* 36(23):4085-4093

JOHNSON M, HANSON GR, GIBB JW (1989)
Characterization of acute *N*-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine (MDE) action on the central serotonergic system. *Biochem Pharmacol* 38(23): 4333-4338

JOHNSON MP, HOFFMAN AJ, NICHOLS DE (1986)
Effects of the enantiomers of MDA, MDMA and related analogues on [³H]serotonin and [³H]dopamine release from superfused rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 132:269-276

JOHNSON M, LETTER AA, MERCHANT K, HANSON GR, GIBB JW (1988)
Effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-Methylenedioxy-methamphetamine Isomers on Central Serotonergic, Dopaminergic and Nigral Neurotensin Systems of the Rat. *J Pharmacol Exp Ther* 244(3):977-982

KANNER BI, FISKES H, MARON R, SHARON I, SCHULDINER S (1979)
Reserpine as a competitive and reversible inhibitor of the catecholamine transporter of bovine chromaffine granules. *FEBS Lett* 100:175-178

KATZUNG W UND HARFST G (1996)
Ecstasy: Synthetische Amphetamin-Drogen vom XTC-Typ. Holger Harfst Verlag, Würzburg

KELLY E, JENNER P, MARSDEN CD (1985)
Evidence that [³H]Dopamine Is taken Up and Released from Nondopaminergic Nerve Terminals in the Rat Substantia Nigra In Vitro. *J Neurochem* 45(1):137-144

KLENER P, KUBISZ P, SURANOVÁ J (1977)
Influence of Cytotoxic Drugs on Platelet Functions and Coagulation in vitro. *Thrombos Haemostas* 37:53-61

KNIGHT DE, HALLAM TJ, SCRUTTON MC (1982)
Agonist selectivity and second messenger concentration in Ca²⁺-mediated secretion. *Nature* 296:256-257

KNOTH J, PEABODY JO, HUETTL P, NJUS D (1984)
Kinetics of Tyramine Transport and Permeation across Chromaffin-Vesicle Membranes. *Biochem* 23:2011-2016

- KOKOTOS LEONARDI ET AND AZMITIA EC (1994)
MDMA (Ecstasy) Inhibition of MAO Type A and Type B: Comparisons with Fenfluramine and Fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacol* 10(4):231-238
- KOKOTOS LEONARDI ET, HOU XP, AZMITIA EC (1992)
Selectivity of various amphetamines for MAO-A. *Soc Neurosci Abstr* 18:1385
- KRAJL M (1965)
A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol* 14:1683-1685
- LAI CT AND YU PH (1997)
R(-)-Deprenyl Potentiates Dopamine-Induced Cytotoxicity toward Catecholaminergic Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 142:186-191
- LANGER SZ AND GALZIN AM (1988)
Studies on the serotonin transporter in platelets. *Experientia* 44:127-130
- LAUNAY JM, GEOFFROY C, MUTEL V, BUCKLE M, CESURA A, ALOUF J, DA PRADA M (1992)
One-step Purification of the Serotonin Transporter Located at the Human Platelet Plasma Membrane. *J Biol Chem* 276(16):11344-11351
- LESCH KP, WOLOZIN BL, MURPHY DL, RIEDERER P (1993)
Primary Structure of the Human Platelet Serotonin Uptake Site: Identity with the Brain Serotonin Transporter. *J Neurochem* 60(6):2319-2322
- LIM HK AND FOLTZ RL (1988)
In Vivo and In Vitro Metabolism of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine in the Rat: Identification of Metabolites using an Ion Trap Detector. *Chem Res Toxicol* 1:370-378
- LIU Y, KRANTZ DE, WAITES C, EDWARDS RH (1999)
Membrane trafficking of neurotransmitter transporters in the regulation of synaptic transmission. *Trends in Cell Biology* 9(9):356-363
- MÄKELÄ JH AND ISOMAA B (1992)
Sphingosine induced release of K⁺ and 5-HT in platelets should not be confused with membrane leakiness. *Chem Biol Interactions* 85:27-33
- MALBERG JE, SABOL KE, SEIDEN LS (1996)
Co-Administration of MDMA with Drugs That Protect Against MDMA Neurotoxicity Produces Different Effects on Body Temperature in the Rat. *J Pharmacol Exp Ther* 278:258-267

MARCUSSON JO, BERGSTROM M, ERIKSSON K, ROSS SB (1988)
Characterization of [³H]-Paroxetine binding in the rat brain . J Neurochem 50:1783-1790

MC CANN UD AND RICAURTE GA (1991)
Major metabolites of (+/-)3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) do not mediate its toxic effects on brain serotonin neurons. Brain Res 545:279-282

MC CANN UD, RIDENOUR A, SHAHAM Y, RICAURTE GA (1994)
Serotonin neurotoxicity after (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; „Ecstasy“): a controlled study in humans. Neuropsychopharmacology 10(2):129-138

MC CANN UD, SZABO Z, SCHEFFEL U, DANNALS RF, RICAURTE GA (1998)
Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA („Ecstasy“) on brain serotonin neurons in human beings. Lancet 352(9138):1433-1437

MC KENNA LL AND PEROUTKA SJ (1990)
Neurochemistry and neurotoxicity of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, „Ecstasy“). J Neurochem 54:14-19

MC KENNA DJ, GUAN XM, SHULGIN AT (1991)
3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA) Analogues Exhibit Differential Effects on Synaptosomal Release of ³H-Dopamine and ³H-5-Hydroxytryptamine. Pharmacol Biochem Behav 38(3):505-512

MECHAN AO, ESTEBAN B, O'SHEA E, ELLIOTT JM, COLADO MI, GREEN AR (2002)
The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy') to rats. Br J Pharmacol 135(1):170-180

MELLERUP ET, PLENGE P, ENGELTOFT M (1983)
High affinity binding of [³H]paroxetine and [³H]imipramine to human platelet membranes. Eur J Pharmacol 96:303-309

MILLER RT, LAU SS, MONKS TJ (1997)
2,5-*bis*-(Glutathion-S-yl)-alpha-methyldopamine, a putative metabolite of (+/-)-3,4-methylenedioxyamphetamine, decreases brain serotonin concentrations. Eur J Pharmacol 323:173-180

MILROY CM (1999)
Ten years of 'ecstasy'. J R Soc Med 92:68-72

MOCKUS SM AND VRANA KE (1998)
Advances in the Molecular Characterisation of Tryptophan Hydroxylase. J Mol Neurosci 10:163-179

MOHANTY JG, JAFFE JS, SCHULMAN ES, RAIBLE DG (1997)

A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *J Immun Meth* 202:133-141

MOLLIVER ME, BERGER UV, MAMOUNAS LA, MOLLIVER DC, O'HEARN E, WILSON MA (1990)

Neurotoxicity of MDMA and related compounds: anatomic studies. *Ann N Y Acad Sci* 600:648-661; discussion: 661-664

MORGAN MJ (2000)

Ecstasy (MDMA): a review of its possible persistent psychological effects. *Psychopharmacology* 152(3):230-248

MOSMANN T (1983)

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Meth* 65:55-63

MURPHY DL AND DONNELLY CH (1974)

Monoamine Oxidase in Man: Enzyme Characteristics in Platelets, Plasma, and other Human Tissues. *Neuropsychopharmacology of Monoamines and Their Regulatory Enzymes*, ed. E.Usdin Raven Press (New York):71-85

NASH JF (1990)

Ketanserin Pretreatment Attenuates MDMA-Induced Dopamine Release in the Striatum as Measured by in vivo Microdialysis. *Life Sci* 47:2401-2408

NASH JF AND BRODKIN J (1991)

Microdialysis studies on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release: effect of dopamine uptake inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 259:820-825

NASH JF AND NICHOLS DE (1991)

Microdialysis studies of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine and structurally related analogues. *Eur J Pharmacol* 200:53-58

NASH JF, ARORA RC, SCHREIBER MA, MELTZER HY (1991)

Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on [³H]paroxetine binding in the frontal cortex and blood platelets of rats. *Biochem Pharmacol* 41(1):79-84

NASH JF, MELTZER HY, GUDELSKY GA (1990)

Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on 3,4-Dihydroxyphenylalanine Accumulation in the Striatum and Nucleus Accumbens. *J Neurochem* 54(3):1062-1067

NICHOLS DE (1986)

Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: Entactogens. *J Psychoact Drugs* 18(4):305-313

NICHOLS DE, LLOYD DH, HOFFMAN AJ, NICHOLS MB, YIM KW (1982)
Effects of Certain Hallucinogenic Amphetamine Analogues on the Release of [3H]Serotonin from Rat Brain Synaptosomes. *J Med Chem* 25:530-535

OBROCKI J, ANDRESEN B, SCHMOLDT A, THOMAS R (2001)
Anhaltende neurotoxische Schäden durch Ecstasy. *Dt Ärzteblatt* 98(47):2656-2660

O'CARROLL AM, FOWLER CJ, PHILLIPS JP, TOBBIA I, TIPTON KF (1983)
The Deamination of Dopamine by Human Brain Monoamine Oxidase. Specificity for the Two Enzyme Forms in Seven Brain Regions. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*:198-202

OKADA M, KAWATA Y, MURAKAMI T, WADA K, MIZUNO K, KANEKO S (1999)
Interaction between purinoreceptor subtypes on hippocampal serotonergic transmission using in vivo microdialysis. *Neuropharmacol* 38(5):707-715

O'LOINSIGH ED, BOLAND G, KELLY JP, O'BOYLE KM (2001)
Behavioural, hyperthermic and neurotoxic effects of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine analogues in the Wistar rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25(3):621-638

O'HEARN E, BATTAGLIA G, DE SOUZA EB, KUCHAR MJ, MOLLIVER ME (1988)
Methylenedioxyamphetamine (MDA) and Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) Cause Selective Ablation of Serotonergic Axon Terminals in Forebrain: Immunohistochemical Evidence for Neurotoxicity. *J Neurosci* 8(8):2788-2803

O'SHEA E, ESTEBAN B, CAMARERO J, GREEN AR, COLADO MI (2001)
Effect of GBR 12909 and fluoxetine on the acute and long term changes induced by MDMA ('ecstasy') on the 5-HT and dopamine concentrations in mouse brain. *Neuropharmacol* 40:65-74

O'SHEA E, GRANADOS R, ESTEBAN B, COLADO MI, GREEN AR (1998)
The relationship between the degree of neurodegeneration of rat brain 5-HT nerve terminals and the dose and frequency of administration of MDMA ('ecstasy'). *Neuropharmacol* 37:919-926

PAGE G, BARRIER L, MOREL P, SCHULZBERG M, PIRIOU A, HUGUET F (1998)
Possible Relationship between Changes in [3H]DA Uptake and Autoxidation in Rat Striatal Slices. *Exp Neurol* 152:88-94

PENTNEY AR (2001)
An exploration of the history and controversies surrounding MDMA and MDA. *J Psychoactive Drugs* 33(3):213-21

PEROUTKA SJ, NEMAN H, HARRIS H (1988)
Subjective effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in recreational users. *Neuropsychopharmacology* 1(4):273-277

PETERS JR, GEANEY DP, GRAHAME-SMITH DG (1992)
5-[³H]Hydroxytryptamine and [³H]Lysergic Acid Diethylamide Binding to Human Platelets. *Meth Enzym* 215:201-212

PIZZINAT N, COPIN N, VINDIS C, PARINI A, CAMBON C (1999)
Reactive oxygen species production by monoamine oxidases in intact cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 359:428-431

PLETSCHER A (1978)
Platelets as a Model for Monoaminergic Neurons. In: *Essays in Neurochemistry and Neuropharmacology* (Youdim MBH, ed.) Vol 3 John Wiley and Sons, London, GB

PUSSARD E, GUIGUENO N, ADAM O, GIUDICELLI JF (1996)
Validation of HPLC-amperometric detection to measure Serotonin in plasma, platelets, whole blood, and urine. *Clin Chem* 42(7):1086-1091

RENTON RJ, COWIE JS, OON MCH (1993)
A study of the precursors, intermediates and reaction by-products in the synthesis of 3,4 methylenedioxymethylamphetamine and its application to forensic drug analysis. *Forensic Sci Int* 60:189-202

RICOURTE GA AND MCCANN UD (1992)
Neurotoxic amphetamine analogues: effects in monkeys and implications for humans. *Ann N Y Acad Sci* 648:371-382

RICOURTE G, BRYAN G, STRAUSS L, SEIDEN L, SCHUSTER C (1985)
Hallucinogenic Amphetamine Selectively Destroys Brain Serotonin Nerve Terminals. *Science* 229:986-988

RICOURTE GA, DE LANNEY LE, IRWIN I, LANGSTON JW (1988a)
Toxic effects of MDMA on central serotonergic neurons in the primate: importance of route and frequency of drug administration. *Brain Res* 446:165-168

RICOURTE GA, DE LANNEY LE, WIENER SG, IRWIN I, LANGSTON JW (1988b)
5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid reflects serotonergic damage induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine in CNS of non-human primates. *Brain Res* 474:359-363

RICAURTE GA, FINNEGAN KF, NICHOLS DE, DELANNEY LE, IRWIN I, LANGSTON JW (1987)

3,4-Methylenedioxyethylamphetamine (MDE), a novel analogue of MDMA, produces long-lasting depletion of serotonin in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 137:265-268

RICAURTE GA, FORNO LS, WILSON MA, DE LANNEY LE, IRWIN I, MOLLIVER MD, LANGSTON JW (1988c)

(+/-)-3,4-Methylenedioxymethamphetamine Selectively Damages Central Serotonergic Neurons in Nonhuman Primates. *JAMA* 260(1):51-55

RICAURTE GA, MARTELLO AL, KATZ JL, MARTELLO MB (1992)

Lasting Effects of (+/-)-3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on Central Serotonergic Neurons in Nonhuman Primates: Neurochemical Observations. *J Pharmacol Exp Ther* 261(2):616-622

RICAURTE GA, MC CANN UD, SZABO Z, SCHEFFEL U (2000a)

Toxicodynamics and long-term toxicity of the recreational drug, 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'). *Toxicol Lett* 112-113:143-146

RICAURTE GA, YUAN J, HATZIMITRIOU G, CORD BJ, MC CANN UD (2002)

Severe Dopaminergic Neurotoxicity in Primates After a Common Recreational Dose Regimen of MDMA ("Ecstasy"). *Science* 297:2260-2263

RICAURTE GA, YUAN J, MC CANN UD (2000b)

(+/-) 3,4- Methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') - induced serotonin neurotoxicity: studies in animals. *Neuropsychobiology* 42(1):5-10

ROTHMAN RB AND BAUMANN MH (2002)

Therapeutic and adverse actions of serotonin transporter substrates. *Pharmacol Ther* 95:73-88

ROTMAN A, MUNITZ H, MODAI I, TJANO S, WIJSENBEEK H (1980)

A comparative uptake study of Serotonin, dopamine and norepinephrine by platelets of acute schizophrenic patients. *Psych Res* 3(3):239-246

RUDNICK G (1977)

Active Transport of 5-Hydroxytryptamine by Plasma Membrane Vesicles Isolated from Human Blood Platelets. *J Biol Chem* 252(7):2170-2174

RUDNICK G AND CLARK J (1993)

From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochim Biophys Acta* 1144(3):249-263

RUDNICK G AND HUMPHREYS CJ (1992)

Platelet Serotonin Transporter. *Meth Enzymol* 215:213-224

RUDNICK G AND WALL SC (1992a)

The molecular mechanism of ecstasy [3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. Proc Natl Acad Sci USA 89:1871-1821

RUDNICK G AND WALL SC (1992b)

The Platelet Plasma Membrane Serotonin Transporter Catalyzes Exchange between Neurotoxic Amphetamines and Serotonin. Ann N Y Acad Sci 11(648): 345-347

RUDNICK G AND WALL SC (1993)

Non-neurotoxic Amphetamine Derivatives Release Serotonin through Serotonin Transporters. Mol Pharmacol 43:271-276

RUDNICK G, BENCUYA R, NELSON PJ, ZITO Jr RA (1981)

Inhibition of Platelet Serotonin Transport by Propranolol. Mol Pharmacol 20:118-123

RUDNICK G, FISKES H, NELSON PJ, SCHULDINER S (1980)

Evidence of Two Distinct Serotonin Transport Systems in Platelets. J Biol Chem 255(8):3638-3641

RUDNICK G, STEINER-MORDOCH SS, FISHKES H, STERN-BACH Y, SCHULDINER S (1990)

Energetics of Reserpine Binding and Occlusion by the Chromaffin Granule Biogenic Amine Transporter. Biochemistry 29:603-608

SANCHEZ V, CAMARERO J, ESTEBAN B, PETER MJ, GREEN AR, COLADO MI (2001)

The mechanisms involved in the long-lasting neuroprotective effect of fluoxetine against MDMA ('ecstasy')-induced degeneration of 5-HT-nerve endings in rat brain. Br J Pharmacol 134:46-57

SCANZELLO CR, HATZIDIMITRIOU G, MARTELLO M, KATZ JL, RICAURTE GA (1993)

Serotonergic Recovery after (+/-)3,4-(Methylenedioxy)Methamphetamine Injury: Observations in Rats. J Pharmacol Exp Ther 264(3):1484-1491

SCHERMAN D AND HENRY JP (1984)

Reserpine Binding to Bovine Chromaffin Granule Membranes. Mol Pharmacol 25:113-122

SCHMIDT CJ (1987)

Neurotoxicity of the Psychedelic Amphetamine, Methylenedioxymethamphetamine. J Pharmacol Exp Ther 240(1):1-7

SCHMIDT CJ AND LOVENBERG W (1985)

In vitro demonstration of dopamine uptake by neostriatal serotonergic neurons of the rat. *Neurosci Lett* 59:9-14

SCHMIDT CJ AND TAYLOR VL (1987)

Depression of rat brain tryptophan hydroxylase activity following the acute administration of methylenedioxyamphetamine. *Biochem Pharmacol* 36(23):4095-4102

SCHMIDT CJ AND TAYLOR VL (1988)

Direct central effects of acute methylenedioxyamphetamine on serotonergic neurons. *Eur J Pharmacol* 156:121-131

SCHMIDT CJ AND TAYLOR VL (1990)

Reversal of the acute effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine by 5-HT uptake inhibitors. *Eur J Pharmacol* 181:133-136

SCHMIDT CJ, BLACK CK, TAYLOR VL (1990)

Antagonism of the neurotoxicity due to a single administration of 3,4-methylenedioxyamphetamine. *Eur J Pharmacol* 181:59-70

SCHMIDT CJ, BLACK CK, TAYLOR VL (1991)

L-DOPA potentiation of serotonergic deficits due to a single administration of 3,4-methylenedioxyamphetamine, p-chloroamphetamine or methamphetamine to rats. *Eur J Pharmacol* 203:41-49

SCHMIDT CJ, LEVIN JA, LOVENBERG W (1987)

In vitro and in vivo neurochemical effects of methylenedioxyamphetamine on striatal monoaminergic systems in the rat brain. *Biochem Pharmacol* 36(5):747-755

SCHMIDT CJ, RITTER JK, SONSALLA PK, HANSON GR, GIBB JW (1985)

Role of dopamine in the neurotoxic effects of methamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 233(3):539-544

SCHMITZ T AND BÖNISCH H (1998)

Uptake of Serotonin (5-HT) and 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) into human platelets and lymphocytes. *Naunyn Schmiedeburgs Archives of Pharmacol* 357:Suppl 4, R 30

SCHMOLDT A (1999)

Ecstasy - Pharmakologische und toxikologische Aspekte. In: Thomasius R: Ecstasy-Wirkungen, Risiken, Interventionen. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1999:15-22

SCHULDINER S, STEINER-MORDOCH S, YELIN R, WALL SC, RUDNICK G (1993) Amphetamine Derivatives Interact with both Plasma Membrane and secretory Vesicle Biogenic Amine Transporters. *Mol Pharmacol* 44:1227-1231

SCORZA C, CARRAU C, SILVEIRA R, ZAPATA-TORRES G, CASSELS BK, REYES-PARADA M (1997)

Monoamine Oxidase Inhibitory Properties of Some Methyloxylated and Alkylthio Amphetamine Derivatives. *Biochem Pharmacol* 54:1361-1369

SERIES HG AND MOLLIVER ME (1994)

Immunocytochemical Evidence for Serotonergic Neurotoxicity of N-Ethyl-methylenedioxyamphetamine (MDE). *Exp Neurol* 128:50-58

SHANKARAN M, YAMAMOTO BK, GUDELSKY GA (1999a)

Mazindol attenuates the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced formation of hydroxyl radicals and long-term depletion of serotonin in the striatum. *J Neurochem* 72(6):2516-2522

SHANKARAN M, YAMAMOTO BK, GUDELSKY GA (1999b)

Involvement of the serotonin transporter in the formation of hydroxyl radicals induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Eur J Pharmacol* 385(2-3):103-110

SHIHABI ZK AND SCARO J (1980)

Liquid-Chromatographic Assay of Urinary 5-Hydroxy-3-indoleacetic Acid with Electrochemical Detection. *Clin Chem* 26(7):907-909

SLIKKER W jr, ALI SF, SCALLET AC, FRITH CH, NEWPORT GD, BAILEY JR (1988)

Neurochemical and Neurohistological Alterations in the Rat and Monkey Produced by Orally Administered Methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Toxicol Appl Pharmacol* 94(3):448-457

SNEDDON JM (1973)

Blood platelets as a model for monoamine-containing neurones. *Prog Neurobiol* 1(2):151-198

SOLOMON HM, SPRIT NM, ABRAMS WB (1970)

The accumulation and metabolism of dopamine by the human platelet. *Clin Pharmacol Ther* 11(6):838-845

SPRAGUE JE AND NICHOLS DE (1995a)

Inhibition of MAO-B protects against MDMA-induced neurotoxicity in the striatum. *Psychopharmacol* 118:357-359

SPRAGUE JE AND NICHOLS DE (1995b)

The Monoamine Oxidase-B Inhibitor L-Deprenyl Protects Against 3,4-Methylenedioxymethamphetamine-Induced Lipid Peroxidation and Long-Term Serotonergic Deficits. *J Pharmacol Exp Ther* 247:667-673

- SPRAGUE JE, HUANG X, KANTHASAMY A, NICHOLS DE (1994)
Attenuation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induced neurotoxicity with the serotonin precursors tryptophan and 5-hydroxytryptophan. *Life Sci* 55:1193-1198
- SPROUSE JS, BRADBERRY CW, ROTH RH, AGHAJANIAN GK (1989)
MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) inhibits the firing of dorsal raphe neurons in brain slices via release of serotonin. *Eur J Pharmacol* 167:375-383
- STEELE TD, MC CANN UD, RICAURTE GA (1994)
3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"): pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* 89:539-551
- STEELE TJ, NICHOLS DE, YIM GKW (1987)
Stereochemical Effects of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and Related Amphetamine Derivatives on Inhibition on Uptake of [³H]-Monoamines into Synaptosomes from Different Regions of Rat Brain. *Biochem Pharmacol* 36:2297-2303
- STONE DM, JOHNSON M, HANSON GR, GIBB JW (1987)
A comparison of the neurotoxic potential of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) and its N-methylated and N-ethylated derivatives. *Eur J Pharmacol* 134:245-248
- STONE DM, JOHNSON M, HANSON GR, GIBB JW (1988)
Role of endogenous dopamine in the central serotonergic deficits induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 247:93-97
- STONE DM, MERCHANT KM, HANSON GR, GIBB JW (1987)
Immediate and long-term effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on Serotonin pathways in brain of rat. *Neuropharmacology* 26(12):1677-1683
- STONE DM, STAHL DC, HANSON GR, GIBB JW (1986)
The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) on monoaminergic systems in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 128:41-48
- SWAROOP A AND RAMASARMA T (1981)
Inhibition of H₂O₂ generation in rat liver mitochondria by radical quenchers and phenolic compounds. *Biochem J* 194:657-665
- SZUKAJ M (1994)
MDMA ("Ecstasy") - gefährliche Droge oder Psychotherapeutikum? *Nervenarzt* 65:802-805

- THOMAS CE, HUBER EW, OHLWEILER DE (1997)
Hydroxyl and peroxy radical trapping by the monoamine oxidase-B inhibitors deprenyl and MDL 72,974A : implications for protection of biological substrates. *Free Radic Biol Med* 22(4):733-7
- THOMAS R AND JARCHOW C (1997)
"Ecstasy": Psychotrope Effekte, Komplikationen, Folgewirkungen. *Dt Ärzteblatt* 94(7):372-376
- THOMAS R AND KRAUS D (1999)
Spektrum der Designerdrogen. In: Thomas R: Ecstasy-Wirkungen, Risiken, Interventionen. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1999:15-22
- THOMAS R, SCHMOLKE M, KRAUS D (1997)
MDMA („Ecstasy“)-Konsum – ein Überblick zu psychiatrischen und medizinischen Folgen. *Fortschr Neurol Psychiat* 65:49-61
- TIFFANY-CASTIGLIONI E AND PEREZ-PLO JR (1980)
Evaluation of methods for determination 6-hydroxydopamine cytotoxicity. *In Vitro* 16(7):591-599
- TSUKADA H, LINDNER KJ, HARTVIG P, LANGSTRÖM B (1994)
Effect of 6R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin on the extracellular levels of dopamine and serotonin in the rat striatum: a microdialysis study with tyrosine or tryptophan infusion. *Brain Res* 635:59-67
- VANHATALO S AND SOINILA S (1995)
Release of false transmitter serotonin from the dopaminergic nerve terminals of the rat pituitary intermediate lobe. *Neurosci Res* 22:367-374
- VANHEE D, JOSEPH M, VORNG H, TONNEL AB (1993)
A colorimetric assay to evaluate the immune reactivity of blood platelets based on the reduction of a tetrazolium salt. *J Immunol Methods* 159(1-2): 53-259
- VAIVA G, BAILLY D, BOSS V, THOMAS P, LESTAVEL P, GOUDEMANT M (2001)
Un cas d'épisode psychotique aigu après prise unique d'ecstasy. [A case of acute psychotic episode after a single dose of ecstasy.] *Encephale* 27(2):198-202
- VINDIS C, SEGUELAS MH, LANIER S, PARINI A, CAMBON C (2001)
Dopamine induces ERK activation in renal epithelial cells through H₂O₂ produced by monoamine oxidase. *Kidney Int* 59(1):76-86
- WALDMEIER PC (1985)
Displacement of striatal 5-hydroxytryptamine by dopamine released from endogenous stores. *J Pharm Pharmacol* 37:58-60

- WALL SC, GU H, RUDNICK G (1995)
Biogenic Amine Flux mediated by Cloned Transporters Stably Expressed in Cultured Lines: Amphetamine Specificity for Inhibition and Efflux. *Mol Pharmacol* 47:544-550
- WESTLUND KN, DENNEY RM, KOCHERSPERGER LM, ROSE RM, ABELL CW (1985)
Distinct Monoamine Oxidase A and B Populations in Primate Brain. *Science* 230:181-183
- WHITE SR, OBRADOVIC T, IMEL KM, WHEATON MJ (1996)
The Effects of Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") on Monoaminergic Neurotransmission in the Central Nervous System. *Prog Neurobiol* 49:455-479
- WÖLFEL R AND GRAEFE KH (1991)
Effects of imipramine and some tryptamine derivatives on the efflux of [³H]-5-hydroxytryptamine from rabbit platelets. *J Neural Transm [Suppl]* 34:77-83
- WRONA MZ, GOYAL RN, TURK DJ, BLANK CL, DRYHURST G (1992)
5,5'-Dihydroxy-4,4'-bitryptamine: a potentially aberrant, neurotoxic metabolite of serotonin. *J Neurochem* 59(4):1392-1398
- YANG Z, WRONA MZ, DRYHURST G (1997)
5-hydroxy-3-ethylamino-2-oxindole is not formed in rat brain following a neurotoxic dose of methamphetamine: evidence that methamphetamine does not induce the hydroxyl radical mediated oxidation of Serotonin. *J Neurochem* 68(5):1929-1941
- YEH SY, DERSCH C, ROTHMAN R, CADET JL (1999)
Effects of antihistamines on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced depletion of serotonin in rats. *Synapse* 33(3):207-217
- YEO HC, HELBOCK HJ, CHYU DW, AMES BN (1994)
Assay of Malondialdehyde in Biological Fluids by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Biochem* 220:391-396
- YOUDIM MBH (1988)
Platelet monoamine oxidase B: Use and misuse. *Experientia* 44:137-141
- YOUDIM MB, LAVIE L (1994)
Selective MAO-A and B inhibitors, radical scavengers and nitric oxide synthase inhibitors in Parkinson's disease. *Life Sci* 55(25-26):2077-2082
- YUAN J, CORD BJ, MC CANN UD, CALLAHAN BT, RICAURTE GA (2002)
Effect of depleting vesicular and cytoplasmic dopamine on methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity. *J Neurochem* 80:960-969

ZANG LY AND MISRA HP (1993)

Generation of Reactive Oxygen Species during the Monoamine Oxidase-catalyzed Oxidation of the Neurotoxicant, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. J Biol Chem 268(22):16504-16512

ZHAO ZY, CASTAGNOLI N jr, RICAURTE GA, STEELE T, MARTELLO M (1992) Synthesis and neurotoxicological evaluation of putative metabolites of the serotonergic neurotoxin 2-(methylamino)-1-[3,4-(methylenedioxy)phenyl] propane [(methylenedioxy)methamphetamine]. Chem Res Toxicol 5(1):89-94

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

| | |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A | Adrenalin |
| AMPH | Amphetamin |
| BtM | Betäubungsmittel |
| BtMG | Betäubungsmittelgesetz |
| cpm | counts per minute |
| DA | Dopamin |
| DAT | Dopamin-Transporter |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DOPAC | 3,4- Dihydroxyphenylacetessigsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| Exc | Anregungswellenlänge |
| Em | Emmissionwellenlänge |
| HWZ | Eliminationshalbwertszeit |
| 5-HIAA | 5-Hydroxyindolessigsäure |
| 5-HT | 5-Hydroxytryptamin, Serotonin |
| IC ₅₀ | Konzentration, die zu halbmaximaler Hemmung führt |
| KG | Körpergewicht |
| K _i | Inhibitorkonzentration, die notwendig ist, um die gegebene Reaktionsgeschwindigkeit zu halbieren |
| K _m | Michaelis-Konstante, Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist |
| MAO | Monoaminoxidase |
| MBDB | N-methyl-1-(3,4-methylendioxyphenyl)-2-butanamin |
| MDA | 3,4- Methylendioxyamphetamin |
| MDEA | 3,4- Methylendioxyethylamphetamin |
| MDMA | 3,4- Methylendioxymethamphetamin |
| METH | Methamphetamin |
| MW | arithmetischer Mittelwert |
| NA | Noradrenalin |
| RIO | reaktive intermediäre Sauerstoffspezies |
| RT | Raumtemperatur |
| SD | Standardabweichung |
| SERT | selektiver Serotonin-Transporter |
| SSRI | selektiver Serotonin-Reuptake Inhibitor |
| Tabl. | Tablette |
| Tbz | Thrombozyten |
| TH | Tyrosin-Hydroxylase |
| TK1 | Thrombozyten-Konzentrat, aus dem Blut eines Spenders gewonnen |
| TPH | Tryptophan-Hydroxylase |
| VK % | Variationskoeffizient |
| V _{max} | maximale Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms |
| v/v | Volumen pro Volumen |

Gefahrstoffe

Folgende verwendete Reagenzien und Lösungsmittel waren mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsratschlägen nach § 6 der Gefahrstoffverordnung versehen:

| Substanz | R-Sätze | S-Sätze |
|---------------------------------------|-------------------------|----------------------|
| Aceton | 11-36-66-67 | 9-16-26 |
| Amphetamin-Sulfat | 63-26/27/28 | 53-22-45-36/37/39 |
| Bioquant-Protein-Test | 20/21/22-68/20/21/22 | 26-36 |
| DMSO | 36/38 | 26 |
| Dopamin-HCl | 36/37/38 | 26-36 |
| EDTA (Titriplex III) | 22 | |
| Ethanol | 11 | 7-16 |
| Essigsäure 99% | 10-35 | 23.2-6-45 |
| H ₂ O ₂ ca. 30% | 34 | 3-26-36/37/39-45 |
| Hydroxyquinolin-4 | 36/37/38 | 26-36 |
| KOH 1mol/L | 35 | 26-36/37/39-45 |
| Lithiumchlorid | 22-36/38 | |
| MBDB-HCl | 20/21/22 | 36 |
| MDA-HCl | 11-23/24/25-39/23/24/25 | 53-7-16-45-36/37 |
| MDEA-HCl | 26/27/27-36/37/38 | |
| MDMA-HCl | 25-36/37/38 | 53-26-27-45-36/37/38 |
| Methamphetamin-HCl | 63-23/24/25 | 53-22-45-36/37/39 |
| Methanol | 11-23/24/25-39/23/24/25 | 7-16-36/37-45 |
| NaOH 1mol/L | 34 | 26-36/37/39 |
| Perchlorsäure ca. 70% | 5-8-35 | 23.2-26-36/37/39-45 |
| Phosphorsäure 85% | 34 | 26-36/37/39-45 |
| R-Deprenyl-HCl | | 22-36 |
| Reserpin | 45-46-61-22 | |
| Serotonin-Creatininsulfat | 40-20/21/22 | 22-36 |
| Trichloressigsäure | 35-50/53 | 26-36/37/39-45-60-61 |
| Triton X-100 | 22-41 | 23-26-36 |

Bei den radioaktiv markierten Verbindungen [³H]Dopamin, [³H]MDMA und [³H]Serotonin waren zusätzlich zu den Vorschriften der Gefahrstoffverordnung auch die Schutzvorschriften nach § 28-§ 80 der Strahlenschutzverordnung zu beachten.

Lebenslauf

- 16.05.1973 Geboren als Tochter von Elise Andresen-Bunjes, geb. Bunjes, und Dr. med. Horst Andresen in Husum
- 1979 – 1983 Besuch der Grundschule Jesteburg
- 1983 – 1985 Besuch der Orientierungsstufe Buchholz i.d. Nordheide, Jesteburg
- 1985 – 1992 Besuch des Ratsgymnasium Rotenburg/Wümme
- 06/1992 Abitur
- 10/1992 Beginn des Pharmaziestudiums in Greifswald
- 04/1993 Wechsel an die Universität Hamburg
- 03/1995 Erstes pharmazeutisches Staatsexamen
- 11/1996 Zweites pharmazeutisches Staatsexamen
- 11/1996 - 10/1997 Pharmazeutisches Praktikum:
- 11/96 – 04/97 Eulen-Apotheke, Würzburg
- 05/97 – 10/97 Apotheke des AK St. Georg, Hamburg
- 01/1998 Drittes pharmazeutisches Staatsexamen und Approbation als Apothekerin
- 09/1999 Beginn der vorliegenden Dissertation im Institut für Rechtsmedizin der Universität Hamburg
- 01/98 – 06/00 Beschäftigung als Apothekerin in der Oster-Apotheke, Hamburg
- 07/00 – 08/00 Vertretung in der Insel- und Bad-Apotheke, Wangerooge
- 09/00 – 01/03 Beschäftigung als Apothekerin in der Merkur-Apotheke, Hamburg
- seit 03/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Rechtsmedizin der Universität Hamburg

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Ich habe mich auch früher um keine Promotion bemüht.

Ferner versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den genutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.