

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.