

UNIwersytet Jagielloński w Krakowie
Wydział Chemii



Streszczenie rozprawy doktorskiej

**Wpływ benzylopiperyliny –
modelowego związku z grupy dopalaczy
na stan energetyczny komórek,
apoptozę i stres oksydacyjny**

Karolina Persona

Promotorzy:

Prof. dr hab. n. med. Wojciech Piekoszewski

Prof. dr hab. med. Aldona Dembińska-Kieć

Kraków 2015

Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana w ramach projektu pn. Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „Nauki molekularne dla medycyny” (MOL-MED) współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego - Program Operacyjny Kapitał Ludzki 2007-2013



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Autorka uzyskała środki finansowe na przygotowanie rozprawy doktorskiej z Narodowego Centrum Nauki w ramach finansowania stypendium doktorskiego na podstawie decyzji numer DEC-2014/12/T/NZ7/00262 (ETIUDA II)



NARODOWE CENTRUM NAUKI

1. Wprowadzenie

Substancje psychoaktywne są znane ludzkości od tysięcy lat. Na przestrzeni wieków rodzaj substancji psychoaktywnych, ich liczba, jak również sposób oraz cel wykorzystywania znacznie się zmienił. Wśród substancji psychoaktywnych wyodrębniono niedawno dodatkową grupę tzw. „środków zastępczych”, które w języku potocznym zyskały miano „dopalaczy”. Z uwagi na fakt, iż substancje z grupy dopalaczy posiadają krótką historię użytkowania i są mało poznane, istnieje bardzo niewiele informacji na temat skutków ubocznych ich przyjmowania oraz mechanizmów działania.

Modelowym związkiem z grupy dopalaczy wybranym do badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej jest *N*-benzylpiperazyna (BZP), która jako substancja psychoaktywna nazywana „legalną Ecstasy”¹ po raz pierwszy pojawiła się na rynku narkotykowym w 1999 roku [1,2]. Od tego momentu dopalacz zyskał popularność w wielu krajach na świecie, w tym również w Polsce.

Określenie „legalna Ecstasy” jest efektem podobieństwa w mechanizmie psychostymulującego działania tych dwóch substancji. Wyniki badań sugerują, że BZP wykazuje pośrednie i bezpośrednie działanie sympatykomimetyczne, stymuluje uwalnianie i hamuje wychwyty zwrotny dopaminy (DA), serotoniny (5-HT) i noradrenaliny (NA) [3–5].

Efekty działania BZP określane jako „pozytywne” są 10-krotnie słabsze od efektów uzyskiwanych po przyjęciu amfetaminy [5,6], a zalicza się do nich m.in.: zwiększenie wydolności psychicznej i fizycznej, poprawa pamięci, zwiększenie poczucia własnej wartości oraz ułatwione kontakty międzyludzkie [7]. Wśród najczęściej występujących efektów niepożądanych podawane są natomiast: bezsenność, lęk, nudności, wymioty, kołatanie serca, huśtawki nastroju, splątanie i drażliwość [8,9]. Zgłaszane skutki niepożądane wskazują także na toksyczność ksenobiotyku, który przyjmowany w zbyt dużych dawkach, może prowadzić do poważnych skutków zdrowotnych.

Zawartość BZP w preparatach jest bardzo zróżnicowana. Substancja ta występuje często w połączeniu z innymi pochodnymi piperazyny, a przeciętną dawkę dopalacza szacuje się na 50-200 mg [10]. Od dawki, jak również od czasu, jaki minął pomiędzy przyjęciami, zależy nasilenie efektów działania BZP, także tych niepożądanych.

¹ Ecstasy, inaczej MDMA – popularne określenia dla substancji psychoaktywnej 3,4-metyleniodoksymetamfetaminy

Obserwowane napady drgawkowe u neurologicznie zdrowych osób, mogą wskazywać na neurodegeneracyjne właściwości tego ksenobiotyku [8]. Ponadto organem szczególnie narażonym na toksyczny wpływ tego związku wydaje się być wątroba będąca miejscem metabolizmu BZP [11]. Znane są również opisy kliniczne nefrotoksycznego działania BZP, co potwierdzają niektóre doniesienia naukowe [12]. Zaburzeń funkcjonowania wymienionych narządów można potencjalnie spodziewać się u osób będących aktywnymi użytkownikami dopalacza. Na podstawie przeprowadzonych badań i obserwacji stwierdzono, iż BZP posiada wąski margines bezpieczeństwa, nawet w przypadku „rekreacyjnego” lub okazjonalnego użytkowania [8]. Przyjmowanie preparatów zawierających w swoim składzie BZP wiąże się zatem z poważnymi zagrożeniami dla zdrowia, a nawet życia. Występowanie wymienionych objawów niepożądanych oraz efektów toksycznego działania ksenobiotyku, często jest wynikiem przyjęcia większej dawki niż powszechnie stosowana [13]. Należy wspomnieć także o sytuacjach nieświadomego używania BZP, będących skutkiem na przykład kupowania preparatów, których skład jest inny, niż deklarowany na opakowaniu, jak zostało przedstawione w pracy Davisa [14] albo celowego wprowadzania użytkowników w błąd, poprzez brak informacji o składzie kupowanych produktów psychoenergetyzujących [15].

Pomimo tego, iż obecnie BZP należy do substancji prawnie zabronionych lub kontrolowanych w większości krajów, dopalacz ten całkowicie nie zniknął z użycia [16]. Za niesłabnącą popularnością benzylopiperazyny przemawiają także inne dane ankietowe, wedle których pomimo delegalizacji, 2,1% respondentów przyznaje się do przyjmowania BZP [17], niezależnie od możliwości wystąpienia efektów niepożądanych.

Pomimo stosunkowo długiej, jak na związki z grupy dopalaczy, historii BZP, informacje na temat jej toksyczności są głównie efektem obserwacji osób przyjmujących tę substancję, a mechanizm toksycznego działania nie został jak dotąd wyjaśniony i potwierdzony eksperymentalnie, co stało się motywacją do podjęcia badań opisanych w rozprawie doktorskiej. Przedstawione badania stanowią nowoczesne podejście do zagadnienia dotyczącego mechanizmu działania ksenobiotyków na poziomie komórkowym.

2. Cel badań

Nadrzędnym celem badań, przeprowadzonych w ramach realizacji projektu doktorskiego i opisanych w rozprawie, była ocena wpływu benzylopiperazyny na nasilenie stresu oksydacyjnego, stan energetyczny oraz proces apoptozy wybranych typów komórek ludzkich w eksperymencie *in vitro*.

Opierając się na właściwościach, działaniu, jak również przemianach metabolicznych, jakim ulega BZP w organizmie, w ramach realizacji projektu badawczego podjęto próby wyjaśnienia wpływu tego ksenobiotyku na funkcje mitochondriów, w tym zmiany potencjału błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$) oraz biosyntezy adenozyno-5'-trifosforanu (ATP), powstające w wyniku zaburzeń przepływu elektronów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej.

Analizowano również wpływ BZP na zmiany generacji reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach, będące efektem zaburzeń funkcji mitochondriów oraz na powstające ewentualne skutki stresu oksydacyjnego w postaci uszkodzeń oksydacyjnych struktury DNA.

Do poznania wpływu BZP na proces apoptozy, analizowano szlaki indukcji programowanej śmierci komórki poprzez ocenę aktywacji kaspazy-8 związanej ze szlakiem receptorowym, kaspazy związanej z uszkodzeniem mitochondriów - kaspazy-9 oraz wykonawczej kaspazy-3.

Ponadto, w ramach realizacji celu pracy doktorskiej, wykonano analizę zmian ekspresji wybranych genów związanych z procesem apoptozy pod wpływem działania ksenobiotyku z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej polimerazy z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (ang. *Real-Time polymerase chain reaction*; Real-Time PCR).

3. Metodyka

Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej mają charakter interdyscyplinarny łącząc zagadnienia z pogranicza biochemii, biologii molekularnej, toksykologii z szerokim spektrum stosowanych metod oraz technik chemicznych i analitycznych.

Ze względu na opisane działanie i potencjalne właściwości neurodegeneracyjne oraz metabolizm wątrobowy BZP do badań wybrano linie nowotworowych ludzkich komórek: glejowych będących elementem tkanki nerwowej (LN-18) oraz wątrobowych (HepG2). Inkubację komórek z dodatkiem BZP do medium hodowlanego prowadzono w warunkach hodowlanych przez 24 godziny.

W celu doboru stężeń BZP stosowanych w badaniach, oceniono cytotoksyczność ksenobiotyku w oparciu o pomiar uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH) do medium hodowlanego. Pomiar przeprowadzono metodą spektrofotometryczną. W wyborze stężeń kierowano się również danymi literaturowymi dotyczącymi oznaczeń BZP w materiale biologicznym osób przyjmujących tę substancję.

Pomiary spektrofotometryczne oraz metodę Lowry-Peterson wykorzystano również do oznaczenia białka w analizowanych komórkach.

Z wykorzystaniem metody opartej na zjawisku bioluminescencji dokonano oznaczenia ATP będącego markerem żywotności komórek, którego poziom gwałtownie maleje na skutek zachodzącego procesu śmierci komórek.

Depolaryzacja wewnętrznej błony mitochondrialnej zachodząca m.in. na skutek procesu apoptozy może być źródłem nadmiernej produkcji ROS, której efektem jest nasilanie stresu oksydacyjnego komórek. Pomiar $\Delta\Psi_m$ i generacji ROS wykonano z użyciem techniki cytometrii przepływowej FACS.

Do oceny wpływu BZP na powstawanie stresu oksydacyjnego oraz uszkodzeń oksydacyjnych DNA wykorzystano immunoenzymatyczną metodą oznaczenia 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (8-OHdG) – substancji powstającej na skutek działania ROS na strukturę komórkowego DNA.

W celu analizy szlaku przebiegu procesu programowanej śmierci komórek dokonano oceny enzymatycznej aktywności kaspaz, czyli proteaz cysteinowych odgrywających kluczową rolę w przebiegu apoptozy. Wykorzystano do tego pomiary fluorescencyjne. Do badań wytypowano kaspazy inicjujące proces apoptozy: kaspazę-8, należącą do rodziny kaspaz zewnętrznych (receptorowego) szlaku, kaspazę-9, należącą

do rodzin kaspaz wewnętrzznego (mitochondrialnego) szlaku oraz kaspazę-3 będącą kaspazą wykonawczą procesu apoptozy.

Analizę zmian ekspresji wybranych genów komórek poddanych działaniu BZP przeprowadzono z techniki Real-Time PCR

Wszystkie wyniki przedstawiono w odniesieniu do komórek kontrolnych.

4. Wyniki badań

Ocena cytotoksyczności BZP pozwoliła zaobserwować w przypadku linii LN-18 istotny statystycznie wzrost poziomu LDH w medium nad komórek hodowanych z dodatkiem odpowiednio 300 oraz 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BZP, a w przypadku linii komórek HepG2 dodatkowo w jeszcze niższym stężeniu 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, iż BZP w najwyższym stężeniu wpływa na zaburzenia funkcji mitochondriów komórek obu linii, o czym świadczy zaobserwowany zwiększony poziom ROS, zmniejszony poziom ATP oraz zaburzony $\Delta\Psi_m$. Ponadto, dzięki obserwacji zwiększonej aktywności kaspazy-3 w komórkach obu linii oraz kaspazy-9 w komórkach LN-18 wykazano, że dopalacz wpływa na indukcję procesu apoptozy. Na podstawie określonego poziomu 8-OHdG stwierdzono również, że wzmożona produkcja ROS w komórkach, świadcząca o nasileniu stresu oksydacyjnego pod wpływem BZP, może być przyczyną utleniania związków endogennych, w tym powstawania uszkodzeń oksydacyjnych DNA. Analiza zmian ekspresji genów pozwoliła określić wpływ BZP na powstawanie stresu siateczki endoplazmatycznej (ER), zaangażowanego w przebieg procesu apoptozy analizowanych komórek.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, iż BZP stosowana w stężeniu porównywalnym do stężenia stwierdzanego w moczu osób przyjmujących tę substancję, wpływa na zaburzenia funkcji mitochondriów, powstawanie stresu ER, indukcję apoptozy, stan energetyczny i nasilenie stresu oksydacyjnego komórek glejowych i wątrobowych. Dane te sugerują, iż związek wykazuje działanie hepato- i neurotoksyczne.

5. Wnioski

Przeprowadzone eksperymenty umożliwiły realizację postawionych celów rozprawy doktorskiej. Dokonano oceny wpływu benzylopiperyazyny na proces apoptozy ludzkich komórek: glejowych (LN-18) i wątrobowych (HepG2). Przebadano działanie substancji psychoaktywnej na stan energetyczny komórek, powstawanie stresu oksydacyjnego oraz zaburzenia funkcjonowania wybranych organelli komórkowych – mitochondriów i retikulum endoplazmatycznego.

Zaobserwowane w komórkach glejowych zaburzenia funkcji mitochondriów, objawiające się wzrostem potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, zmniejszeniem produkcji ATP i zwiększoną produkcją ROS, świadczą o zaburzeniach mitochondriów powstających na skutek działania BZP w najwyższych stosowanych stężeniach. Obserwowana aktywacja kaspazy-9 (związanej z mitochondrialnym szlakiem indukcji apoptozy) i kaspazy-3 (wykonawczej) jest potwierdzeniem zachodzącego procesu programowanej śmierci komórek linii LN-18 pod wpływem BZP, wskazującym dodatkowo na udział mitochondriów w tym procesie. Stwierdzony poziom markera uszkodzeń oksydacyjnych DNA prowadzi do wniosków, iż nasilony w wyniku działania ksenobiotyku stres oksydacyjny w komórkach glejowych może prowadzić do nieodwracalnych zmian struktur związków wewnątrzkomórkowych, w tym również białek i lipidów. Przeprowadzona względna analiza zmian ekspresji genów sugeruje natomiast, iż w proces programowanej śmierci komórek linii LN-18 hodowanych w medium z dodatkiem najwyższego stężenia BZP mogą być zaangażowane również inne organelle komórkowe, takie jak ER.

Na podstawie przedstawionej dyskusji otrzymanych wyników można wnioskować, iż BZP wykazuje właściwości neurodegeneracyjne. Zaburzenia funkcji mitochondriów związane z hamowaniem kompleksów mitochondrialnego łańcucha oddechowego i jednoczesnym wzrostem ROS prowadzące do śmierci komórek neuronalnych leżą u podstaw wielu schorzeń neurodegeneracyjnych takich jak: np.: choroba Parkinsona czy Huntingtona [18,19]. W rozwoju patomechanizmu choroby Alzheimera wymieniany jest natomiast stres siateczki endoplazmatycznej [20], którego aktywację pod wpływem najwyższego stężenia BZP zaobserwowano w komórkach linii LN-18. Na tej podstawie można przypuszczać, iż osoby przyjmujące BZP mogą być bardziej narażone na zachorowanie na tego typu schorzenia, a dopalacz ten może przyspieszać

rozwój chorób związanych z zaburzeniami funkcji mitochondriów i stresem siateczki endoplazmatycznej.

Analiza uzyskanych wyników pozwoliła również wykazać mechanizm hepatotoksycznego działania benzylopiperazyny. Zaobserwowano wpływ ksenobiotyku na funkcje mitochondriów komórek wątrobowych linii HepG2 objawiające się zmniejszonym potencjałem błony mitochondrialnej, spadkiem stężenia wewnątrzkomórkowego ATP i wzrostem produkcji ROS. Stwierdzono, iż działanie BZP polega na zaburzeniu stanu energetycznego związanego ze zmniejszoną produkcją ATP w komórkach wątrobowych. Potwierdzono także, iż powstawanie stresu oksydacyjnego w komórkach linii HepG2 wiąże się jednocześnie z możliwością powstawania uszkodzeń oksydacyjnych kwasów nukleinowych komórek, o czym świadczy obserwowany zwiększony poziom markera uszkodzeń DNA – 8-OHdG.

Wzmocniona aktywacja kaspazy-3 przemawia za proapoptotycznym wpływem BZP na komórki HepG2. Zwiększona ekspresja białek związanych ze stresem ER oraz proapoptotycznego białka BAX sugeruje natomiast, iż w proces apoptozy tych komórek zaangażowane są zarówno mitochondria, jak i siateczka endoplazmatyczna. W przeciwieństwie do komórek linii LN-18, w komórkach linii HepG2 nie odnotowano zwiększonej aktywności kaspazy-9 aktywowanej na skutek zwiększenia przepuszczalności mitochondrialnych megakanałów i wypływu czynników apoptotycznych do cytoplazmy. Ze względu na brak obserwowanej aktywności kaspazy-8 oraz nasilenia ekspresji genów kodujących ten enzym proteolityczny, nie wykazano wpływu BZP na indukcję apoptozy drogą receptorową, która jest postulowana w komórkach wątrobowych narażonych na działanie związku o podobnym mechanizmie działania do BZP – MDMA [21].

Z uwagi na obserwowany wpływ BZP zarówno na komórki linii LN-18, jak i HepG2, można wnioskować, iż za mechanizm toksycznego działania na komórki odpowiada głównie BZP, natomiast nie można wykluczyć także wpływu metabolitów tej substancji szczególnie na funkcje komórek wątrobowych.

Wyniki badań prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej mogą stanowić wstęp do dalszych badań prowadzonych w warunkach *in vivo*.

Piśmiennictwo

1. Wikstrom M, Holmgren P. A2 (N-Benzylpiperazine) a New Drug of Abuse in Sweden. *J Anal Toxicol.* 2004;28: 67–70.
2. Kerr J, Davis L. Benzylpiperazine in New Zealand: brief history and current implications. *J R Soc New Zeal.* 2011;41: 155–164.
3. Szücs Z, Szentendrei T, Fekete MI. The effect of EGYT-475 (Trelibet) and its metabolites on the potassium-stimulated 3H-noradrenaline release from cortical slices of rat brain. *Pol J Pharmacol Pharm.* 1987;39: 185–93.
4. Magyar K, Fekete MIK, Tekes K, Török TL. The action of Trelibet, a new antidepressive agent on [3H]noradrenaline release from rabbit pulmonary artery. *Eur J Pharmacol.* 1986;130: 219–227.
5. Campbell H, Cline W, Evans M, Lloyd J, Peck AW. Comparison of the effects of dexamphetamine and 1-benzylpiperazine in former addicts. *Eur J Clin Pharmacol.* 1973;6: 170–176.
6. Bye C, Munro-Faure AD, Peck AW, Young PA. A comparison of the effects of 1-benzylpiperazine and dexamphetamine on human performance tests. *Eur J Clin Pharmacol.* 1973;6: 163–169.
7. Butler RA, Sheridan JL. Highs and lows: patterns of use, positive and negative effects of benzylpiperazine-containing party pills (BZP-party pills) amongst young people in New Zealand. *Harm Reduct J.* 2007;4: 18.
8. Gee P, Gilbert M, Richardson S, Moore G, Paterson S, Graham P. Toxicity from the recreational use of 1-benzylpiperazine. *Clin Toxicol.* 2008;46: 802–7.
9. Wilkins C, Girling M, Sweetsur P, Huckle T, Huakau J. Legal party pill use in New Zealand: Prevalence of use, availability, health harms and “gateway effects” of benzylpiperazine (BZP) and trifluoromethylphenylpiperazine (TFMPP). Auckland New Zealand; 2006.
10. Sheridan J, Butler R, Wilkins C, Russell B. Legal piperazine-containing party pills - a new trend in substance misuse. *Drug Alcohol Rev.* 2007;26: 335–43.
11. Maurer HH, Kraemer T, Springer D, Staack RF. Chemistry, Pharmacology, Toxicology, and Hepatic Metabolism of Designer Drugs of the Amphetamine. *Ther Drug Monit.* 2004;26: 127–131.
12. Alansari M, Hamilton D. Nephrotoxicity of BZP-based herbal party pills: a New Zealand case report. *N Z Med J.* 2006;119: U1959. 13. Nicholson TC. Prevalence of use, epidemiology and toxicity of “herbal party pills” among those presenting to the emergency department. *Emerg Med Australas.* 2006;18: 180–4.

14. Davies S, Wood DM, Smith G, Button J, Ramsey J, Archer R, et al. Purchasing “legal highs” on the Internet - is there consistency in what you get? *QJM Mon J Assoc Physicians*. 2010;103: 489–93.
15. Ramsey J, Dargan PI, Smyllie M, Davies S, Button J, Holt DW, et al. Buying “legal” recreational drugs does not mean that you are not breaking the law. *QJM Mon J Assoc Physicians*. 2010;103: 777–83.
16. Wilkins C, Sweetsur P. The impact of the prohibition of benzylpiperazine (BZP) “legal highs” on the prevalence of BZP, new legal highs and other drug use in New Zealand. *Drug Alcohol Depend*. Elsevier Ireland Ltd; 2013;127: 72–80.
17. Corazza O, Simonato P, Corkery J, Trincas G, Schifano F. “Legal highs”: safe and legal “heavens”? A study on the diffusion, knowledge and risk awareness of novel psychoactive drugs among students in the UK. *Riv Psichiatr*. 2014;49: 89–94.
18. Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*. Elsevier Ltd; 2014;112: 24–49.
19. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1: 120–129.
20. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner B a, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 2000;403: 98–103.
21. Cerretani D, Bello S, Cantatore S, Fiaschi AI, Montefrancesco G, Neri M, et al. Acute administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induces oxidative stress, lipoperoxidation and TNF α -mediated apoptosis in rat liver. *Pharmacol Res*. Elsevier Ltd; 2011;64: 517–527.