

NOVÁ METODA PRO *IN VIVO* MONITOROVÁNÍ MOLEKULÁRNÍ PODSTATY ZÁVISLOSTI NA DROGÁCH

ELIŠKA ZLÁMALOVÁ, KAMILA SYSLOVÁ
a PETR KAČER

Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166
28 Praha 6

Petr.Kacer@vscht.cz

Došlo 5.9.16, přijato 14.11.16.

Klíčová slova: mikrodialýza, vysokoučinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, *nucleus accumbens*, dopamin, metamfetamin

Úvod

Metamfetamin (MA) je psycho-stimulační látka způsobující závislost a mnohé další vedlejší efekty¹. Rostoucím problémem je časté zneužívání této drogy těhotnými ženami². Podání MA způsobuje zvýšení extracelulární koncentrace monoaminových neurotransmiterů dopaminu, serotoninu a noradrenalinu v mozku³. Konkrétně nárůst koncentrace dopaminu (DA) a tím pádem synaptických přenosů v dopaminergním mesolimbickém systému, a především v mozkovém centru *nucleus accumbens* (NAc), byl popsán jako klíčový pro vznik závislosti⁴. Nicméně molekulární podstata vzniku a průběhu závislosti na MA a dalších drogách stále není plně pochopena⁵. Je proto nutné zaměřit se na biochemické procesy provázející adikci. Sledování hladin neurotransmiterů *in vivo* ve specifických oblastech mozku a v průběhu určitého časového úseku po podání drogy přináší cenné informace, které by mohly napomoci pochopení a léčbě této choroby. Problémem ovšem zůstává absence efektivní metody schopné měřit extrémně nízké (nano-molární úroveň) a rychle se měnící koncentrace látek různé chemické povahy v mozku živého organismu.

Předkládaná práce se zabývá vývojem nové, vysoce účinné a selektivní metody pro *in vivo* monitorování DA a jeho metabolitů (HVA, 3-MT a DOPAC) v limbickém systému. Konkrétně spočívá v odběru vzorků pomocí mikrodialýzy a následném kvantifikování analytů metodou kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Vyvinutá metoda byla použita v experimentální studii zkoumající důsledky prenatální expozice metamfetaminem na mesolimbický dopaminergní systém dospělých potkanů. Studie umožnila porovnání hladin DA a jeho metabolitů (HVA, 3-MT a DOPAC) v NAc potkanů, kteří byli prenatálně vystaveni MA a potkanů z kontrolní skupiny.

Experimentální část

Chemikálie

Všechny chemikálie a činidla byla komerčního původu: 3-hydroxytyramin hydrochlorid (= dopamin hydrochlorid; = DA.HCl, čistota $\geq 99,0\%$); kyselina homovanilová (= HVA, $\geq 99,0\%$; Sigma-Aldrich, USA); 3,4-dihydroxyfenylacetová kyselina (= DOPAC, $\geq 99,0\%$; Sigma-Aldrich, USA); kyselina chlorovodíková (37 %, Sigma-Aldrich, USA); chlorid sodný (99,5 %, Sigma-Aldrich, USA); chlorid hořečnatý (purum, Sigma-Aldrich, USA); chlorid vápenatý (93 %, Sigma-Aldrich, USA); chlorid draselný (purum, Sigma-Aldrich, USA); kyselina citronová ($\geq 99,5\%$; Sigma-Aldrich, USA); ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA = 99,99 %; Sigma-Aldrich, USA); octan sodný ($\geq 99,0\%$; Sigma-Aldrich, USA); hydroxid sodný (99,99 %; Sigma-Aldrich, USA); [1,1',2,2'-²H₄] dopamin-hydrochlorid (= DA.HCl-*d*₄, $\geq 98,0\%$; Cambridge Isotope Laboratories Inc., USA); 3-methoxytyramin hydrochlorid (= 3-MT.HCl, $\geq 99,0\%$, Fluka, Švýcarsko); voda (Fluka, Švýcarsko); methanol (Fluka, Švýcarsko); kyselina octová (99,9 %, Fluka, Švýcarsko); kyselina trifluoroctová (= TFA, $\geq 99,0\%$, Fluka, Švýcarsko); monohydrát 1-oktansulfonátu sodného ($\geq 99,0\%$, Fluka, Švýcarsko); ketamin hydrochlorid (Narkamon® 5 %, Vétoquinol, Francie); xylazin hydrochlorid (Rometa® 2 %, Bioveta, Česká republika); halotan (Narcotan® 0,01 %, Zentiva, Česká republika). D-Metamfetamin hydrochlorid (= MA.HCl, 99,8 %) byl připraven Farmaceutickou fakultou Univerzity Karlovy v Hradci Králové (Česká republika). Umělý mozkomíšní mok, používaný při mikrodialýze, obsahoval 147,0 mM chloridu sodného, 1,3 mM chloridu vápenatého, 0,9 mM chloridu hořečnatého a 4,0 mM chloridu draselného ve vodě (pH 6,5 až 7,0).

Experimentální zvířata

Samice potkanů Wistar (AnLab, Praha; stáří 4 měsíce, váha 250–300 g) byly připuštěny na počátku estrogenního cyklu. Březi samice byly rozděleny do dvou skupin: MA exponované skupině byl po celou dobu gestace podáván MA (5 mg/kg/den); kontrolní skupině byl stejným způsobem podáván fyziologický roztok. Z potomků samic obou skupin byli vybráni jen samci a v 90. den po narození byl započat mikrodialyzační experiment.

Veškeré manipulace se zvířaty byly prováděny podle směrnice Evropské unie (86/609/EU) a Národní komise pro chov laboratorních zvířat. Všechny experimenty schválila etická komise.

Mikrodialýza

Ve věku 90 dnů byli potkani uspáni anestetickou injekcí ketamin/xylazin (2 mg/kg; 0,5 mg/kg) a pomocí stereotaktického aparátu (o souřadnicích AP-1.6, ML \pm 1.5, DV-7.3)⁶ jim byla voperována mikrodialyzační kanyla MAB 4.15 IC (Agn Tho's AB, Švédsko). Po 7 dnech, když

se zahojila rána na hlavě, byli potkani uvedeni do halotanové anestezie a do kanyly byla zavedena mikrodialyzační sonda MAB 4.15.2.Cu s polopropustnou kuprofánovou membránou (délka membrány 2 mm, propustnost membrány – látky do velikosti 6 kDa). Sonda nacházející se v NAc byla promývána umělé cirkulující tekutinou (ACSF) o průtoku 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Vzorky byly odebírány v 20 minutových intervalech do mikrozkupek obsahujících 15 μl 0,1 M HCl a 10 pg vnitřního standardu (deuterovaný standard – DA.HCl- d_4). První tři vzorky byly odebrány pro ustanovení bazální hladiny DA a jeho metabolitů HVA, 3-MT a DOPAC. Poté byla potkanům podána dávka MA (1 mg/kg, s.c.) a koncentrace analytů byla sledována dalších 220 min po podání drogy. Po odebrání byly vzorky ihned zamrazeny při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Po ukončení experimentu byli potkani pod anestézií dekapitováni, byl vyjmout mozek a následně byla provedena histologická kontrola umístění mikrodialyzační sondy v NAc.

Příprava vzorků pro HPLC-ESI-MS/MS analýzu

Vzhledem k nízké koncentraci analytů v mikrodialyzátu byly vzorky zakoncentrovány lyofilizací. Lyofilizace probíhala na přístroji Labconco Free Zone (USA) po dobu 12 hodin. Kondenzační spirála lyofilizátoru byla chlazená na teplotu $-47\text{ }^\circ\text{C}$ a tlak byl ustálen na 9 kPa. Vysušený vzorek byl rozpuštěn v 10 μl methanolu.

HPLC-ESI-MS/MS analýza

Pro HPLC separaci látek (prováděno s využitím pumpy Accela 600 a autosampleru Accela) byla použita kolona Gemini C18 (zrnitost stacionární fáze 5 μm , rozměry kolony 150 \times 2 mm; Phenomenex, USA) s předkolonkou Gemini C18 a gradientové složení mobilní fáze (fáze A – vodný roztok kyseliny octové o pH 2; fáze B – methanol) o průtoku 150 $\mu\text{l}/\text{min}$. Gradient měl následující průběh: 5 % B (3 min) \rightarrow 30 % B (lineární nárůst během 2 min) \rightarrow 30 % B (10 min) \rightarrow 5 % B (lineární pokles během 1 min) \rightarrow 5 % B (4 min). Objem vzorku nastříkovaný na kolonu byl 5 μl .

Pro účely hmotnostní spektrometrie byla použita elektrosprejová ionizace v pozitivním (pro detekci DA a 3-MT) i negativním módu (pro detekci HVA a DOPAC). Analýza látek byla prováděna v SRM módu (Selective Reaction Monitoring) založená na detekci konkrétního produktového iontu vznikajícího z prekurzorového iontu po kolizně-indukované disociaci (CID)⁷. Kolizně indukované reakce (viz tab. I) byly monitorovány na hmotnostním spektrometru TSQ Vantage. Podmínky hmotnostního spektrometru byly optimalizovány na následující parametry: tlak kolizního plynu (argon) 1 mTorr, napětí na sprejovací jehle $\pm 3000\text{ V}$, teplota nosného plynu (dusík – tlak 40 psi) $350\text{ }^\circ\text{C}$, tlak pomocného plynu (dusík) 20 arb, teplota vstupní kapiláry $350\text{ }^\circ\text{C}$.

Výsledky a diskuse

Mikrodialýza byla použita k odběru vzorků, jelikož umožňuje *in vivo* monitorování koncentrací analytů v extracelulárním prostředí v diskretní oblasti mozku⁸. Díky pasivní difúzi do dialyzátu přestupují skrz membránu po směru koncentračního gradientu molekuly z okolního prostředí⁶. Odebraný vzorek tak ve výsledku obsahuje známý zlomek koncentrace analytů v NAc.

Z důvodu nízké stability DA a 3-MT byly vzorky jímány do mikrozkupek obsahující kyselinu chlorovodíkovou, což stabilizovalo tyto analyty ve formě hydrochloridů⁹. Dále bylo přidáno známé množství vnitřního standardu (deuterovaný standard – DA.HCl- d_4) pro zpřesnění kvantifikace. Vzhledem k nízké koncentraci analytů v mikrodialyzátu bylo nutné vzorky zakoncentrovat. Za tímto účelem byla provedena lyofilizace, při které nedocházelo k degradaci analytů ve vzorku.

K samotné kvantifikaci analytů bylo použito spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem vybaveným elektrosprejovou ionizací. Kapalinová chromatografie byla realizována na koloně Gemini s mobilní fází o gradientovém uspořádání, které umožnilo oddělení jednotlivých analytů a jejich separaci od solí přítomných v ACSF (soli se eluovaly a v mrtvém

Tabulka I

Parametry hmotnostně spektrometrické analýzy pro dopamin a jeho metabolity

Analyt ^a	Ionizace	Kvadrupól Q1	Energie CID	Kvadrupól Q3
		m/z [Da]	[eV]	m/z [Da]
DA.HCl	ESI ⁺	137	24	120
DA.HCl- d_4	ESI ⁺	141	24	123
3-MT.HCl	ESI ⁺	168	21	151
HVA	ESI ⁻	181	17	122
DOPAC	ESI ⁻	167	15	122

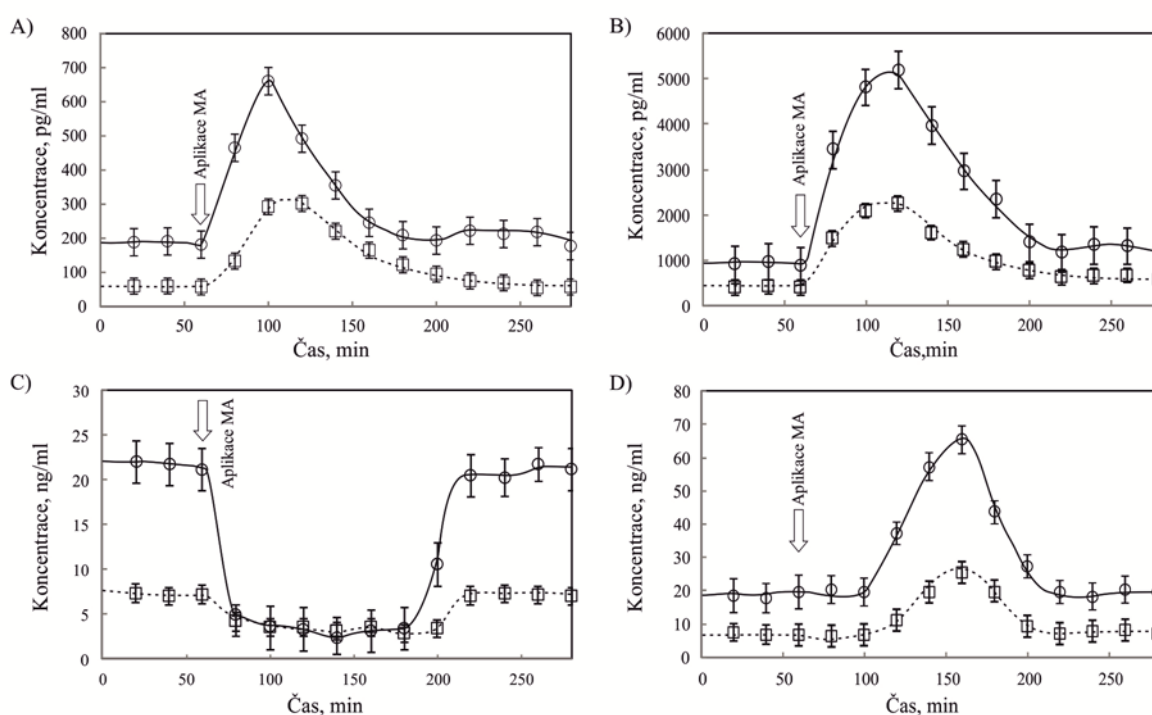
^a DA.HCl – dopamin-hydrochlorid, DA.HCl- d_4 – [1,1',2,2'- $^2\text{H}_4$] dopamin-hydrochlorid, 3-MT.HCl – 3-methoxytyramin hydrochlorid, HVA – kyselina homovanilová, DOPAC – kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová

Tabulka II

Validace vyvinuté metody pro DA a jeho metabolity (HVA, 3-MT a DOPAC) v ACSF

Látka ^a	Přesnost (RSD) [%]	Správnost (RE) [%]	LOD [pg/40 μ l]	LOQ [pg/40 μ l]
DA.HCl	11,4	-11,8	0,07	0,08
HVA	10,1	-11,7	0,08	0,09
3-MT.HCl	13,9	-14,1	0,09	0,11
DOPAC	11,9	-11,4	0,08	0,09

^aDA.HCl – dopamin-hydrochlorid, HVA – kyselina homovanilová, 3-MT.HCl – 3-methoxytyramin hydrochlorid, DOPAC – kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová



Obr. 1. Koncentrace DA (A) a jeho metabolitů 3-MT (B), DOPAC (C) a HVA (D) v NAc před a po aplikaci akutní dávky metamfetaminu; Průměrné koncentrace naměřené u potkanů, kteří byli prenatálně exponováni MA, jsou vyznačeny jako kolečka. Průměrné hodnoty pro kontrolní skupinu potkanů jsou v grafu značeny jako čtverečky

čase kolony $t_m = 1,2$ min), které by narušovaly ionizaci látek. Retenční časy jednotlivých analytů byly následující: DA 3,3 min, 3-MT 4,6 min, DOPAC 11,3 min a HVA 12,5 min. V průběhu HPLC-MS analýzy byla metoda rozdělena na dva segmenty, které se lišily v ionizačním módu. V prvním segmentu v čase analýzy 0–6 min byly v pozitivní elektrosprejové ionizaci monitorovány DA a 3-MT. HVA a DOPAC byly detegovány negativní elektrosprejovou ionizací v druhém segmentu (6–19 min).

Vyvinutá analytická metoda byla validována pro každou analyzovanou látku (DA, HVA, 3-MT a DOPAC) na pěti koncentračních hladinách (0,5; 10; 50; 100 a 250

pg/40 μ l) v ACSF s využitím vnitřního standardu DA.HCl- d_4 (10 pg/40 μ l). Každý vzorek byl připraven alespoň 5 \times . Sledovanými parametry validace byly: přesnost (vyjádřeno relativní směrodatnou odchylkou – RSD), správnost (stanoveno relativní chybou – RE), limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ). Parametry validace jsou uvedeny v tab. II.

Nová metoda skládající se z mikro dialýzy, lyofilizace a HPLC-MS/MS analýzy byla aplikována v experimentální studii zkoumající vliv prenatální expozice MA na dopaminergní systém v NAc. Veškeré experimentální postupy byly shodně provedeny na dvou skupinách potkanů:

skupině prenatalně vystavené MA (5 mg/kg, s.c.) a skupině, která se dříve s látkou neseťkala. Nejdříve byly odebrány tři vzorky pro ustanovení bazální hladiny DA a jeho metabolitů (HVA, 3-MT a DOPAC). Potkani, kteří byli prenatalně vystaveni MA, měli v NAc vyšší bazální koncentraci DA i všech zkoumaných metabolitů (HVA, 3-MT a DOPAC) ve srovnání s kontrolní skupinou potkanů. Následně byla potkanům injekčně vpravena dávka MA (1 mg/kg, s.c.) a koncentrace DA a jeho metabolitů (HVA, 3-MT a DOPAC) byla zaznamenávána v průběhu 220 min po podání akutní dávky drogy. U obou skupin potkanů se po podání MA zvýšila hladina DA, 3-MT a HVA. Koncentrace DOPAC klesla (viz obr. 1). Tyto výsledky jsou konzistentní se známým mechanismem působení MA. MA zvyšuje koncentraci extracelulárního DA. Vzápětí se zvýší hladina 3-MT a později skrze delší metabolickou dráhu i koncentrace HVA. MA naopak snižuje koncentraci DOPAC jakožto inhibitor enzymu MAO, který přeměňuje DA na DOPAC (cit.^{10,11}). Koncentrační hladiny analytů DA, 3-MT a HVA byly po akutním podání MA výrazně vyšší v NAc prenatalně exponovaných potkanů než u potkanů, kteří se s drogou setkali poprvé (viz obr. 1). Naše výsledky naznačují, že potkani, kteří byli vystaveni droze *in utero*, reagují v dospělosti na MA a případně i další psychostimulanty s jinou citlivostí a následně mohou být odlišně náchylní ke vzniku závislosti než potkani, kteří se s drogou dříve neseťkali. Pro bližší pochopení důsledků prenatalní expozice MA je nutné dále zkoumat změny a případnou plasticitu v dopaminergním mesolimbickém systému postižených jedinců. Například porovnání množství a senzitivity dopaminových receptorů nebo aktivity neuronů v NAc by mohlo přinést cenné informace.

Závěr

Předkládaná práce popisuje *in vivo* metodiku umožňující rychlou a přesnou detekci a kvantifikaci DA a jeho hlavních metabolitů (HVA, 3-MT, DOPAC) v mozku. Vzorky byly odebírány pomocí mikrodiálýzy ze specifických oblastí mozku aktivních potkanů. Kyselina chlorovodíková byla přidána pro zvýšení stability DA a 3-MT a deuterovaný standard pro zpřesnění analytické metody. Z důvodu nízké koncentrace měřených analytů byly vzorky zakoncentrovány lyofilizací. Vlastní kvantifikace byla provedena spojením vysokoúčinné kapalinové chromatografie s třikvadrupólovým hmotnostním spektrometrem vybaveným elektrosprejovou ionizací. Hmotnostně spektrometrická analýza probíhala ve vysoce citlivém SRM módu, který se prokázal ideální pro analýzu složek komplexních biologických matic díky své vysoké senzitivitě a selektivitě. Vyvinutá metoda byla aplikována v experimentální studii zkoumající vliv prenatalního vystavení MA na dopaminergní systém v NAc. Koncentrační hladiny DA, HVA, 3-MT a DOPAC byly měřeny v NAc potkanů, kteří byli v prenatalním období vystaveni MA, a potkanů z kontrolní skupiny, kteří se s drogou dříve neseťkali. Bylo zjištěno, že prenatalně exponovaní jedinci

mají vyšší bazální hladinu DA, HVA, 3-MT a DOPAC a reagují výrazněji na podání akutní dávky MA. Tato studie dokazuje, že zneužívání MA v průběhu těhotenství způsobuje trvalé změny v mesolimbickém dopaminergním systému potomků.

Vyvinutá metodika může zkoumat libovolnou oblast mozku a je aplikovatelná na řadu chemických látek. Díky tomu je použitelná pro monitorování procesů jak zdravého, tak nemocného mozku, stejně jako experimentálním sledováním farmakoterapie řady neurologických onemocnění.

Tato práce se uskutečnila v rámci Národního programu udržitelnosti (NPU I LO1215) MŠMT – 34870/2013.

Seznam zkratk

3-MT	3-methoxytyramine = 3-methoxytyramin
ACSF	artificial cerebrospinal fluid = umělý mozko-míšňí mok
CID	collision induced dissociation = kolizně-indukovaná disociace
DA	dopamine = dopamin
DOPAC	3,4-dihydroxyphenylacetic acid = kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová
ESI	electrospray ionization = elektrosprejová ionizace
HVA	homovanillic acid = kyselina homovanilová
LOD	limit of detection = limit detekce
LOQ	limit of quantification = limit kvantifikace
MA	methamphetamine = metamfetamin
MS/MS	tandem mass spectrometry = tandemová hmotnostní spektrometrie
NAc	<i>nucleus accumbens</i>
RSD	relative standard deviation = relativní směrodatná odchylka
RE	relative error = relativní chyba
s.c.	subcutaneous = subkutánní (podkožní) aplikace léčiva
SRM	selective reaction monitoring = selektivní monitorování reakcí

LITERATURA

- Kršiak M.: Br. J. Pharmacol. 65, 525 (1979).
- Bubenikova-Valesova V., Kacer P., Syslova K., Rambousek L., Janovsky M., Schutova B., Hrubá L., Slamberova R.: Int. J. Dev. Neurosci. 27, 525 (2009).
- Gough B., Imam S. Z., Blough B., Slikker W., Ali S. F.: Annals of the New York Academy of Sciences 965, 410 (2002).
- Di Chiara G., Bassareo V.: Curr. Opin. Pharmacol. 7, 69 (2007).
- Nestler E. J.: Nat. Neurosci. 8, 1445 (2005).
- Paxinos G., Watson C.: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Elsevier, New York 2003.
- Lange V., Picotti P., Domon B., Aebersold R.: Mol. Syst. Biol. 4, 222 (2008).

8. Westerink B. H.: J. Chromatogr. B 747, 21 (2000).
9. Syslová K., Rambousek L., Kuzma M., Najmanová V., Bubeníková-Valešová V., Šlamberová R., Kačer P.: J. Chromatogr. A 1218, 3382 (2011).
10. Baranyi M., Milusheva E., Vizi E. S., Sperlágh B.: J. Chromatogr. A 1120, 13 (2006).
11. Tsuchida K., Akiyama K., Sakai K., Ujike H., Li X., Kuroda S.: Pharmacol. Biochem. Behav. 53, 575 (1996).

E. Zlámalová, K. Syslová, and P. Kačer (*University of Chemistry and Technology, Prague*): **Novel Method for *in vivo* Monitoring of the Molecular Basis of Drug Addiction**

A novel method was developed for a parallel, rapid and precise tracking of dopamine and its metabolites (homovanillic acid, 3-methoxytyramine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid) in the brain. The method con-

sists of a sample collection using microdialysis from specific brain region, a lyophilization step to concentrate analytes from the microdialysates, and a quantification step exploiting high performance liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). This was employed in an experimental study investigating the effect of a prenatal exposure to methamphetamine on development of mesolimbic dopaminergic system. It was determined that abusing methamphetamine during pregnancy induces permanent changes in the *nucleus accumbens* of adult rats. Namely, the basal levels of dopamine and its metabolites are higher and a response to acute dose of methamphetamine is stronger in prenatally exposed rats compared to control rats. Furthermore, the developed methodology can be optimized for use in different brain regions and for analysis of diverse chemical substances. This highly applicable technique could thus be a source of valuable information about brain physiology as well as pathophysiology on the molecular level.