

Untersuchung der Effekte von Betäubungsmitteln und NPS mittels SH-SY5Y Neuroblastomzellen und Metabolomics

Manuela Carla Monti^{1,2,*}, Darta Stalberga¹, Liam J. Ward^{1,3}, Henrik Green^{1,3}, Albert Elmsjö^{1,3}

¹Department of Biomedical and Clinical Science, Division of Clinical Chemistry and Pharmacology, Linköping University, Schweden;

²Institut für Rechtsmedizin Basel, Department of Biomedical Engineering, University of Basel, Schweiz;

³Department of Forensic Genetics and Forensic Toxicology, National Board of Forensic Medicine (*Rättsmedicinalverket*), Linköping, Schweden;

*Korrespondierende Autorin: manuela.monti@unibas.ch

1. Hintergrund und Zielsetzung

Neue psychoaktive Substanzen (NPS) sind ein fortlaufendes und ernstzunehmendes Phänomen, welches dazu führt, dass jährlich neue uncharakterisierte Verbindungen auf dem Drogen-schwarzmarkt erscheinen. Die meist gänzlich fehlende Datenlage über Effekte und Toxizität dieser Substanzen zusammen mit ihrer relativ einfachen Verfügbarkeit über unregulierte Märkte (z. B. Internet) birgt gesundheitliche Risiken und stellt eine Bedrohung der öffentlichen Gesundheit dar [1].

Mangels therapeutischen Nutzens sind klinische Studien mit NPS wissenschaftlich nicht begründbar und aufgrund des potenziell hohen Risikos für den Menschen auch ethisch nicht vertretbar. Vor dem Hintergrund der angestrebten Reduktion von Tierversuchen [2] stellt das pharmakologische Profiling am Hauptwirkort in Zellmodellen die derzeitige Methode der Wahl zur Charakterisierung von NPS dar [3-5]. So werden synthetische Cannabinoide beispielsweise am Cannabinoid Rezeptor Typ 1 und synthetische Opioide am μ -Opioid Rezeptor charakterisiert [3, 5]. Solche Daten sind wichtig, da sie zeigen, ob eine betäubungsmittelartige neuronale Wirkung vorliegt. Auch dienen solche Daten zum Vergleich der Potenz neuer NPS und können helfen das Schadenspotential einzuschätzen.

In manchen Ländern ist das Vorliegen solcher Aktivitätsdaten sogar zwingend damit neue Verbindungen als Betäubungsmittel definiert werden können [3]. Trotz der hohen Wichtigkeit sind diese Modelle auch mit Limitationen verbunden: Neben dem, dass pharmakokinetische Faktoren (z. B. Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination - ADME) nicht berücksichtigt werden, sagen sie nichts über allfällige sekundäre und/oder off-target Effekte aus.

Sogenannte *in-vitro*-Metabolomics-Protokolle werden in unterschiedlichen Disziplinen als neue komplementäre Methoden untersucht, um die Wirkungen und Toxizität von Xenobiotika auf spezifische Zellmodelle, z.B. Hepatozyten, zu charakterisieren [2, 6-10]. Im Vergleich zum pharmakologischen Profiling positioniert sich dieser Ansatz am anderen Ende des methodischen Spektrums, da er mittels eines ungerichteten Verfahrens Einblicke in die Gesamtheit der zugrunde liegenden Wirkmechanismen ermöglicht [7, 11].

Ziel dieser Studie war die Entwicklung eines *in-vitro*-Metabolomics-Protokolls zur Erweiterung der derzeitigen Methoden zur Charakterisierung von NPS. In einer ersten explorativen Studie wurden daher Neuroblastomzellen als neuronales Zellmodell mit fünf zentralwirksamen Betäubungsmitteln inkubiert, darunter zwei NPS.

2. Material und Methoden

SH-SY5Y Neuroblastom Zellinkubationen wurden im Triplikate pro Wirkstoff und das ganze Experiment im Duplikate in konsekutiven Wochen durchgeführt. SH-SY5Y Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und für das Experiment in T-25 Zellkulturflaschen ausgesät. Nachdem eine Konfluenz von 80% erreicht wurde, wurden die Zellen mit 20 μM Cocain, Alprazolam, Tramadol, 4-Methylmethcathinon (Mephedron; 4-MMC) und MDMB-4en-PINACA versetzt und für 18 h inkubiert. Die Zellen wurden dann zur Extraktion als erstes trypsiniert und die Zellsuspension in 5 mL Mikroreaktionsgefäße überführt und zentrifugiert. Der Überstand (Zellmedium) wurde entfernt und das Zellpellet (entsprechend ca. 4 Millionen Zellen) mit 100 μL einer Mischung aus 2 : 2 : 1 (v/v/v) Acetonitril : Methanol : Wasser präzipitiert. Der Überstand wurde in HPLC Vials überführt und bis zur Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Die Proben wurden mit Hochleistungsflüssigchromatographie in Normal- sowie Umkehrphase gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie (Agilent 1290 Infinity LC und Agilent 6540 QToF Massenspektrometer) im positiven Ionisations- und Fullscanmodus (50 – 1000 m/z) gemessen. Danach folgte die Metabolomics-Datenauswertung mittels XCMS und SIMCA. Mit Orthogonaler Partial-Least-Squares-Diskriminanzanalyse (OPLS-DA) wurde die Unterscheidung der verschiedenen Wirkstoffe anhand unterliegender Metabolitenmuster untersucht und visualisiert. Metaboliten von gesondertem Differenzierungspotential wurden gegen hauseigene sowie öffentlich zugänglichen Datenbanken abgeglichen.

3. Resultate und Diskussion

Die multivariate Datenauswertung mittels OPLS-DA zeigte eine klare Trennung der unterschiedlichen Wirkstoffe sowohl untereinander als auch gegenüber der negativen Kontrolle (Zellen ohne Wirkstoff). Eine Ausnahme bildeten die mit Tramadol behandelten Proben, die eine Überlappung mit der negativen Kontrolle aufwiesen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Tramadol ein schwach wirksames Opioid ist und seine pharmakologische Wirkung zusätzlich über einen aktiven Metaboliten vermittelt wird [12], der im vorliegenden In-vitro-System möglicherweise nicht gebildet wurde.

Beim Vergleich von Umkehr- und Normalphasenchromatographie wurden mit den Daten der Normalphase robustere Modelle erzielt; exemplarisch ist in Abbildung 1 die erste gegen die zweite Dimension des OPLS-DA-Score-Plots dargestellt.

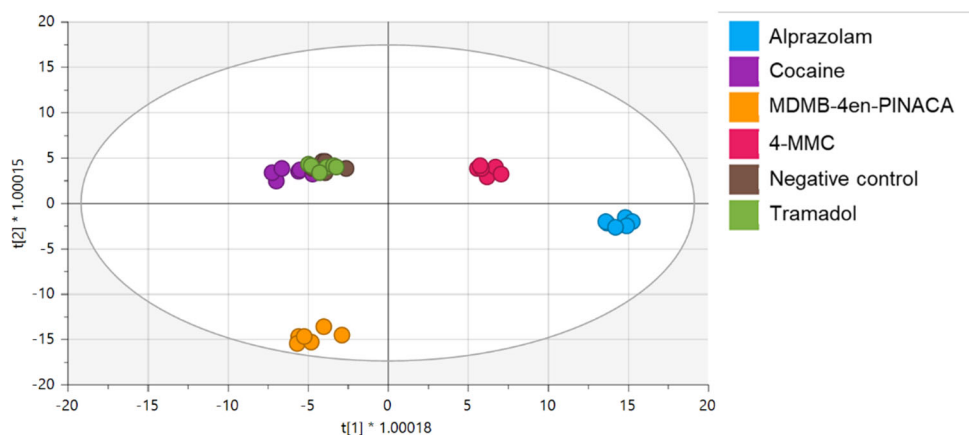


Abb. 1. OPLS-DA-Scores-Plot des Normalphasendatensatzes (HILIC). Eine Gruppentrennung der unterschiedlichen Wirkstoffe ist zu erkennen ($n = 6$ Datenpunkte pro Wirkstoff). Beachte: Cocain (violette Datenpunkte) sind in der dritten Dimension klar von Tramadol und der negativen Kontrolle unterscheidbar, was in der gezeigten 2D Darstellung so nicht ersichtlich ist.

Interessant war die klare Unterscheidung des synthetischen Cannabinoids MDMB-4en-PINACA von den anderen Wirkstoffen in der zweiten Dimension. Die Untersuchung des Metaboliten-Fingerabdruckes ergab unter anderem höhere Signale für die vorläufig identifizierten endogenen Metabolite N⁶-Methyladenosin, Cytosin, Cytidin, Guanosin und Betain, sowie eine Abnahme von Serotonin. Auch wenn eine vollständige biologische Interpretation der Ergebnisse nicht Gegenstand dieser Studie war, zeigen die Resultate: (i) es lagen wirkstoffspezifische metabolische Fingerabdrücke im System vor und (ii) das verwendete In-vitro-Modell weist ein Potenzial für eine erweiterte Charakterisierung von NPS auf.

4. Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Studie wurde ein In-vitro-Metabolomics-Protokoll erarbeitet und anhand von fünf Betäubungsmitteln evaluiert. Wirkstoffspezifische Unterschiede im metabolischen Fingerabdruck konnten identifiziert werden. Zukünftige Studien sollten untersuchen, ob weitere Wirkstoffe vom gleichen Wirkungstyp (z. B. mehrere synthetische Cannabinoide) die gleichen Veränderungen auslösen, womit sich weiter klären kann, inwiefern das Modell die unterliegende Pharmakologie widerspiegelt. Ausserdem erscheinen weitere spezifischere Probenextraktionen und/oder chemische Analysen indiziert. Diese Studie ist ein erster Schritt in Richtung der Anwendung von In-vitro-Metabolomics zur komplementären Charakterisierung von NPS.

5. Danksagung

Die Autorinnen und Autoren bedanken sich beim Schweizerischen Nationalfonds (SNSF) für die finanzielle Unterstützung von Manuela Carla Monti (Stipendien: *Postdoc.Mobility* PM217677 und *Rückkehr CH Postdoc.Mobility* PM235057), sowie bei der GTFCh für das Reisestipendium zur TIAFT Conference 2025 für Manuela Carla Monti.

6. Literatur

- [1] UNODC. World Drug Report 2025 - Contemporary issues on drugs United Nations publication, Vienne2025 [Available from: <https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2025.html>].
- [2] Quintás G, Castell JV, Moreno-Torres M. The assessment of the potential hepatotoxicity of new drugs by in vitro metabolomics. *Front Pharmacol.* 2023;Volume 14 - 2023.
- [3] Bäckberg M, Vikingsson S, Strandberg J, Wall S, Åstrand A, Karlsson H, et al. Using in vitro receptor activity studies to support the risk assessment of new psychoactive substances – A Swedish strategy to protect public health from harm. *Forensic Science International.* 2023;348:111691.
- [4] Luethi D, Liechti ME. Monoamine Transporter and Receptor Interaction Profiles in Vitro Predict Reported Human Doses of Novel Psychoactive Stimulants and Psychedelics. *International Journal of Neuropsychopharmacology.* 2018;21(10):926–31.
- [5] Vandeputte MM, Stove CP. Navigating nitazenes: A pharmacological and toxicological overview of new synthetic opioids with a 2-benzylbenzimidazole core. *Neuropharmacology.* 2025;275:110470.
- [6] Souders CL, Sanchez CL, Malphurs W, Aristizabal-Henao JJ, Bowden JA, Martyniuk CJ. Metabolic profiling in human SH-SY5Y neuronal cells exposed to perfluorooctanoic acid (PFOA). *NeuroToxicology.* 2021;85:160–72.
- [7] Martínez-Sena T, Moro E, Moreno-Torres M, Quintás G, Hengstler J, Castell JV. Metabolomics-based strategy to assess drug hepatotoxicity and uncover the mechanisms of hepatotoxicity involved. *Arch Toxicol.* 2023;97(6):1723–38.
- [8] Palmer JA, Smith AM, Gryshkova V, Donley ELR, Valentin J-P, Burrier RE. A Targeted Metabolomics-Based Assay Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Identifies Structural and Functional Cardiotoxicity Potential. *Toxicological Sciences.* 2020;174(2):218–40.
- [9] Bowen TJ, Southam AD, Hall AR, Weber RJM, Lloyd GR, et al. Simultaneously discovering the fate and biochemical effects of pharmaceuticals through untargeted metabolomics. *Nature Communications.* 2023;14(1):4653.
- [10] Manier SK, Wagmann L, Flockerzi V, Meyer MR. Toxicometabolomics of the new psychoactive substances α -PBP and α -PEP studied in HepaRG cell incubates by means of untargeted metabolomics revealed unexpected amino acid adducts. *Arch Toxicol.* 2020;94(6):2047–59.
- [11] Bowen TJ, Hall AR, Lloyd GR, Smith MJ, Weber RJM, Wilson A, et al. Discovering a predictive metabolic signature of drug-induced structural cardiotoxicity in cardiac microtissues. *Arch Toxicol.* 2025.
- [12] Grond S, Sablotzki A. Clinical Pharmacology of Tramadol. *Clinical Pharmacokinetics.* 2004;43(13):879–923.