

SALVINORIINI A:N AKUUTIT VAIKUTUKSET TRKB- JA GSK3 β -
SIGNALOINTIIN HIIREN AIVOISSA

Salla Uusitalo
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Farmakologian ja lääkehoidon osasto

Joulukuu 2020

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Farmasian tiedekunta		Osasto/Sektion– Department Farmakologian ja lääkehoidon osasto
Tekijä/Författare – Author Salla Uusitalo		
Työn nimi / Arbetets titel – Title Salvinoriini A:n akuutit vaikutukset TrkB- ja GSK3 β -signalointiin hiiren aivoissa		
Oppiaine /Läroämne – Subject Farmakologia		
Työn laji/Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma	Aika/Datum – Month and year Joulukuu 2020	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 56
Tiivistelmä/Referat – Abstract Salvinoriini A on huulikukkaisheimoon kuuluvasta <i>Salvia divinorum</i> -kasvista löytyvä dissosiatiivinen hallusinogeeni. Muista hallusinogeenistä poiketen salvinoriini A ei sitoutu lainkaan serotoniinin 5-HT-2A reseptoriin, vaan sen vaikutukset välittyvät selektiivisesti kappa-opioidireseptorien kautta. 2000-luvulla <i>S. divinorum</i>in käytöstä on julkaistu yksittäisiä tapauskuvauksia, joiden perusteella salvinoriini A:n säännöllisillä matalilla annoksilla voi olla masennusta lievittäviä vaikutuksia. Eläintutkimuksissa salvinoriini A aiheuttaa sekä pro- että antidepressiivistä käyttäytymistä. Muita psykedeelisiä yhdisteitä, erityisesti klassisia hallusinogeeniä, on tutkittu lupaavin tuloksin hoitoresistenttiä masennusta sairastavilla potilailla. Nopeavaikutteinen masennuslääke ketamiini luokitellaan salvinoriini A:n kanssa samaan dissosiatiivisten hallusinogeenien ryhmään. Subanesteettisen ketamiinin käyttäminen suomalaisessa erikoissairaanhoidossa aloitettiin 2000-luvun alussa, jonka jälkeen se on vakiintunut osaksi lääkeresistenttiä masennusta sairastavien potilaiden hoitopolkua. Subanesteettisen ketamiinin ja perinteisten masennuslääkkeiden vaikutukset välittyvät aivojen muovautuvuutta säätelevän BDNF-TrkB -viestiketjun kautta. Myös klassiset hallusinogeenit vaikuttavat aivojen muovautuvuuteen lisäämällä välittömien-aikaisten geenien ilmenemistä ja aivokuoren hermosolujen spinogeneesiä. Tämän pro gradu -tutkielman kokeellisessa osassa tarkasteltiin salvinoriini A:n akuutteja vaikutuksia masennuslääkevasteeseen yhdistettyihin signalointiketjuihin sekä lokomotoriseen aktiivisuuteen C57BL/6 -kannan hiirillä. Salvinoriini A aiheutti merkitsevän lokomotorisen aktiivisuuden vähenemisen lähes välittömästi i.p. annostelun jälkeen. Se ei kuitenkaan vaikuttanut TrkB-GSK3β -viestiketjun proteiinien fosforylaatioon tai BDNF:n m:RNA:n määrään hiiren etuaivokuorella. Aiempien tutkimusten perusteella salvinoriini A:n mahdolliset terapeuttiset vaikutukset saattavat ilmetä vain matalilla annoksilla tai säännöllisessä mikroannostelussa.		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Salvinoriini A, Nopeavaikutteiset masennuslääkkeet, Ketamiini, Hallusinogeenit		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Helsingin yliopiston digitaalisten opinnäytteiden arkisto (e-thesis)		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Ohjaajat: Tomi Rantamäki, Apulaisprofessori, Farmasian tiedekunta, Helsingin yliopisto Samuel Kohtala, FaT, Farmasian tiedekunta, Helsingin yliopisto		

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Pharmacy		Osasto/Sektion– Department Division of Pharmacology and Pharmacotherapy	
Tekijä/Författare – Author Salla Uusitalo			
Työn nimi / Arbetets titel – Title The acute effects of Salvinorin A on TrkB and GSK3 β phosphorylation in mice			
Oppiaine /Läroämne – Subject Pharmacology			
Työn laji/Arbetets art – Level Master’s thesis		Aika/Datum – Month and year December 2020	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 56
Tiivistelmä/Referat – Abstract Salvinorin A is a dissociative hallucinogen found in the plant <i>Salvia divinorum</i>. Unlike other hallucinogens it is a selective kappa-opioid receptor antagonist with no affinity to serotonin receptor 5-HT-2A. Modern case studies suggest low, regularly used salvinorin A doses might have antidepressant properties. In animal studies salvinorin A causes both pro- and antidepressant behaviour. Other hallucinogens, such as classical psychedelics psilocybin and LSD, show great promise as rapid acting antidepressants in multiple clinical trials focusing on treatment resistant depression. The most well-known rapid acting antidepressant drug ketamine belongs to the same group of dissociative hallucinogens as Salvinorin A. The use of subanesthetic ketamine has become an integral part of treatment resistant patient care in Finnish healthcare. Ketamine as well as chronic treatment with traditional antidepressants induce plasticity via BDNF-TrkB signaling. The antidepressant mechanism of classical psychedelics is mostly unknown, but they have been shown to promote neuroplasticity by increasing the expression of immediate-early genes and spinogenesis in cortical neurons. The experimental part of this master’s thesis examines the acute effects of salvinorin A on the signaling pathways associated with antidepressant response in C57BL/6 mice. To better characterize the effects of salvinorin A an open field test of 100 min was carried out in addition to phosphorylation studies. Single high dose (5-10 mg/kg) of salvinorin A causes a robust reduction in locomotor activity almost immediately after i.p. administration in mice. However it does not affect the phosphorylation of proteins associated with antidepressant response, nor does it affect <i>BDNF</i> mRNA expression in mouse prefrontal cortex. According to previous studies, the therapeutic effects of salvinorin A might be present only at low doses or in regular microdosing.			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Salvinorin A, Rapid acting antidepressants, Ketamine, Hallucinogens			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Helsingin yliopiston digitaalisten opinnäytteiden arkisto (e-thesis)			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Supervisors: Tomi Rantamäki, Assoc. prof., Faculty of Pharmacy, University of Helsinki Samuel Kohtala, PhD (pharm.), Faculty of Pharmacy, University of Helsinki			

SISÄLLYSLUETTELO

OSA I: KIRJALLISUUSKATSAUS

1	JOHDANTO	1
2	MASENNUSLÄÄKKEIDEN KOHDEPROTEIINIT	3
2.1	Masennus ja aivojen muovautuvuus	3
2.2	cAMP-välitteinen viestiketju	4
2.3	Aivoperäinen hermokasvutekijä BDNF	6
2.4	Masennuslääkkeiden vaikutus CREB- ja BDNF -proteiineihin	7
3	NOPEAVAIKUTTEISET MASENNUSLÄÄKKEET.....	8
3.1	Ketamiini	8
3.1.1	Farmakokinetiikka ja farmakodynamiikka.....	8
3.1.2	Masennuslääkemekanismi: disinhibitio-hypoteesi	10
3.1.3	Masennuslääkemekanismi: TrkB-GSK β -signaointi	12
3.1.4	Käyttö masennuslääkkeenä.....	14
3.2	Muut psykoaktiiviset aineet.....	15
3.2.1	Kliiniset tutkimukset	15
3.2.2	Neurobiologinen mekanismi.....	16
4	SALVIA DIVINORUM JA SALVINORIINI A	18
4.1	Salvia divinorum	18
4.2	Salvinoriini A.....	18
4.2.1	Farmakokinetiikka.....	19
4.2.2	Kappa-opioidijärjestelmä.....	20
4.2.3	Käyttötutkimukset.....	22
4.3	Lääkinnällinen ja hengellinen käyttö	23

OSA II: KOKEELLINEN OSA

5	TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	25
6	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	25
6.1	Eläimet.....	25
6.2	Käsittelyt.....	25
6.3	Näytteenotto.....	27
6.4	Western Blot	27

6.4.1	Näytteenkäsittely ja proteiinkonsentraation määrittäminen	27
6.4.2	SDS-PAGE-elektroforeesi ja Western blot -siirto	28
6.4.3	Immunoblotaus	29
6.5	RT-qPCR	30
6.5.1	RNA:n eristys.....	30
6.5.2	RNA-pitoisuus ja näytteiden puhtaus.....	31
6.5.3	cDNA synteesi	32
6.5.4	qPCR	33
6.6	Avokenttätesti	34
6.7	Tilastollinen analyysi	34
7	TULOKSET	34
7.1	Salvinoviiri A:n vaikutukset TrkB - GSK3 β fosforylaatioon hiiren aivoissa ..	34
7.2	Salvinoviiri A:n vaikutukset valikoituihin mRNA-transkriptteihin.....	36
7.3	Salvinoviiri A:n vaikutus lokomotoriikkaan.....	37
8	POHDINTA	38
8.1	Salvinoriini A:n vaikutus masennuslääkevasteeseen yhdistettyihin viestiketjuihin ...	38
8.2	Lokomotorisen aktiivisuuden väheneminen	40
8.3	KOR-antagonistit	42
9	JOHTOPÄÄTÖKSET	42

LIITTEET

Liite 1	Käytetyt liuokset
Liite 2	Western blot tulosten analysoinnissa käytetyt tilastolliset testit
Liite 3	qPCR tulosten analysoinnissa käytetyt tilastolliset testit
Liite 4	Avokenttäkokeen tulosten analysoinnissa käytetyt tilastolliset testit
Liite 5	Avokenttäkokeen 100 min kuvaaja

LYHENTEET

AC	Adenylaattisyklaasi (engl. adenylyl cyclase)
AMPA	α -amino-3-hydroksi-5-metyyli-soksatsoli-4-propionihappo (-reseptori)
Arc	Aktiivisuudesta riippuvainen solun tukirankaan assosioitunut proteiini (engl. activity-regulated cytoskeleton-associated protein)
BDNF	Aivoperäinen hermokasvutekijä (engl. Brain-derived neurotrophic factor)
BSA	Naudan seerumin albumiini (engl. bovine serum albumin)
CaMK	Ca^{2+} -kalmoduliinikinaasi
cAMP	Syklinen adenosiinimonofosfaatti (Cyclic adenosine monophosphate)
cDNA	Komplementaarinen deoksiribonukleeiinihappo
CRE	cAMP:n vaste-elementti (engl. cAMP-response element)
CREB	CRE:n sitojaproteiini (engl. CRE-binding protein)
CRH	Kortikotropiinia vapauttava hormoni
CYP	Sytokromi P450 (-entsyymi)
DNA	Deoksiribonukleeiinihappo
DNase	Deoksiribonukleaasi (engl. Deoxyribonuclease)
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
ECL	Tehostettu kemiluminesenssi (engl. enhanced chemiluminescence)
ECT	Sähköhoito (engl. electroconvulsive therapy)
GAPDH	Glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi
GABA	Gamma-aminovoihappo (engl. gamma-aminobutyric acid)
GSK3 β	Glykokeenin syntaasikinaasi 3 β
HC	Hippokampus
HRP	Piparjuuriperoksidaasi (engl. horseradish peroxidase)
i.p.	Intraperitoneaalinen
IEG	Välitön-aikainen geeni (engl. immediate early gene)
KOR	Kappa-opioidireseptori
LSD	Lysergihapon dietyyliamidi
MAPK	Mitogeenin aktivoima proteiinikinaasi (mitogen-activated protein kinase)
MEK	Mitogeenin aktivoima proteiinikinaasi kinaasi (engl. mitogen activated protein kinase kinase)
mRNA	Lähettilä-RNA (engl. messenger RNA)

MTL	Mediaalinen temporaalilohko
mTOR	Rapamysiinin kohdeproteiini (engl. mammalian target of rapamycin)
NFDM	Rasvaton maitojauhe (engl. non-fat dried milk)
NMDA	N-metyyli-D-aspartaatti (-reseptori)
PBS	Fosfaatti-puskuroitu suolaliuos (phosphate buffered saline)
PCP	Fensyklidiini (phenylcyclohexyl piperidine)
PFC	Prefrontaalikorteksi, etuaivokuori
PI3K	Fosfoinositidi-3-kinaasi (engl. phosphoinositide 3-kinase)
PKA	Proteiinikinaasi A
PVDF	Polyvinyylideenifluoridi (-kalvo)
qPCR	Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio
RNA	Ribonukleiinihappo
RT-PCR	Käänteistranskriptaasi-PCR
SDS	Natriumlauryylisulfaatti (engl. sodium dodecyl sulphate)
TBST	Tris-puskuroitu suolaliuos 0,1 % Tweenillä
TrkB	Tyrosiinikinaasireseptori B
UGT	Uridiini 5-difosfo-glukuronosyyli transferaasi
5-HT	5-hydroksitryptamiini, serotoniini

OSA I: KIRJALLISUUSKATSAUS

1 JOHDANTO

Masennus on mielialahäiriöistä yleisin ja maailmanlaajuisesti yksi merkittävimmistä menetettyjä toimintakykyisiä elinvuosia (Disability-adjusted life year, DALY) aiheuttavista sairauksista (World Health Organization 2008; GBD 2018). Suomalaisessa aikuisväestössä (≥ 30 ikävuotta) masennuksen vuosiprevalenssi eli vuoden aikana masennusta sairastavien osuus on noin 6,5 % (Pirkola ym. 2005). Masennuslääkkeiden kulutus on kymmenkertaistunut Suomessa vuosien 1990–2018 aikana (Suomen lääketilasto 2009; Suomen lääketilasto 2018). Vuonna 2019 yli 500 000 suomalaista osti apteekista masennuslääkkeitä, joista Kansaneläkelaitos maksoi 20,9 miljoonaa euroa korvauksia (Kelan tilastotietokanta 2019).

Perinteisten masennuslääkkeiden antidepressiivinen teho saavutetaan tyypillisesti vasta useiden viikkojen yhtäjaksoisen annostelun jälkeen (Mitchell ym. 2006). Masennuslääkkeiden aiheuttamat haittavaikutukset ovat kuitenkin yleisiä juuri näiden ensimmäisten viikkojen aikana, ennen masennusoireiden lieventymistä (Crawford ym. 2014). Haittavaikutukset heikentävät hoitomyöntyvyyttä ja ovat yksi yleisimmistä syistä lääkehoidon lopettamiselle. Perinteisten masennuslääkkeiden ongelmana on lisäksi niiden heikko teho. Ensimmäisen lääkekokeilun jälkeen vain noin yksi kolmasosa potilaista saavuttaa oireiden pysyvän tai tilapäisen lieventymisen eli remission (Rush ym. 2006). Remission saavuttaminen on sitä epätodennäköisempää, mitä useampi epäonnistunut lääkekokeilu potilaalla on. Euroopan lääkeviraston asettaman työryhmän arvion mukaan noin 20 % potilaista sairastaa hoitoresistenttiä, eli ainakin kahteen perinteiseen hoitoon reagoimatonta masennusta (CHMP 2009). Hoitoresistentti masennus heikentää merkittävästi potilaiden elämänlaatua, kasvattaa relapsin eli oireiden uusiutumisen riskiä sekä lisää kuolleisuutta (Rush ym. 2006).

Nopeavaikutteisia masennuksen hoitoja tarvitaan erityisesti hoitoresistenttiä masennusta sairastavien sekä akuutissa itsemurhavaarassa olevien potilaiden auttamiseen. Suomalaisen erikoissairaanhoidon vakiintuneessa käytössä on tällä hetkellä kaksi ratkaisua vaikean lääkeresistentin masennuksen hoitoon: psykiatrinen sähköhoito (ECT)

sekä subanesteettinen ketamiini (Depressio: Käypä hoito -suositus, 2020). ECT on säilyttänyt asemansa tehokkaana ja pääosin turvallisena hoitomuotona 1930-luvulta asti, jolloin sen laajamittainen käyttö psykiatristen sairauksien hoitona aloitettiin (The UK ECT Review Group 2003). Ketamiinia käytetään masennuksen hoidossa subanesteettisilla annoksilla, eli annoksilla jotka ovat matalampia kuin anestesiaan vaadittava annos (Peltoniemi ym. 2016). 2000-luvun alussa käyttöön otettu subanesteettinen ketamiini on ensimmäinen farmakologinen hoito, jonka masennusta lievittävä vaikutus alkaa todistetusti jo muutamassa tunnissa yksittäisen annostelukerran jälkeen (Berman ym. 2000; Zarate ym. 2006; Murrough ym. 2013; Lapidus ym. 2014).

Ketamiini on dissosiatiivinen hallusinogeeni, eli se aiheuttaa käyttäjässään muuntuneen tajunnantilan ja aistihavaintojen vääristymiä (Nichols 2004). Dissosiatiivit ovat yksi kolmesta ryhmästä joihin hallusinogeenit voidaan luokitella niiden psykoaktiivisten vaikutustensa perusteella, muiden kahden ollessa psykedeelit ja deliriantit. Ketamiinin masennuslääkevaikutusten löytyminen on saanut tutkijat palaamaan 1950-luvulla kehitetyn psykedeeliterapian pariin muiden samankaltaisten yhdisteiden löytämisen toivossa. Erityisesti klassisia psykedeelejä on tutkittu lupaavin tuloksin hengenvaarallisesti sairaiden sekä lääkeresistenttien potilaiden masennuksessa (Grob ym. 2011; Gasser ym. 2014; Griffiths ym. 2016; Ross ym. 2016; Carhart-Harris ym. 2016).

Hallusinogeenit ovat potentiaalinen lähde uusien nopeavaikutteisten masennuslääkkeiden löytämiselle. Tämän kirjallisuuskatsauksen tarkoituksena on perehtyä perinteisten masennuslääkkeiden ja ketamiinin vaikutusten taustalla oleviin neurobiologisiin mekanismeihin sekä esitellä ketamiinin kanssa samaan dissosiatiivisten hallusinogeenien ryhmään kuuluva salvinoriini A.

2 MASENNUSLÄÄKKEIDEN KOHDEPROTEIINIT

2.1 Masennus ja aivojen muovautuvuus

Masennus ja pitkäkestoinen stressi voivat aiheuttaa rakenteellisia muutoksia aivoissa. Muutoksia havaitaan erityisesti mielialaa ja tiedonkäsittelyä säätelevillä aivoalueilla, kuten monissa etuaivojen osissa sekä hippokampuksessa (Duman ja Aghajanian 2012). Kuvantamistutkimuksissa näiden aivoalueiden koko on pienentynyt ja hermoyhteyksien eli synapsien määrä vähentynyt (Koolschijn ym. 2009; Kang ym. 2012). Krooninen stressi aiheuttaa etuaivokuoren synapsien heikkenemistä sekä neuronien atrofiaa eli surkastumista myös eläinmalleissa (Cook ja Wellman 2004; Li ym. 2011). Masennuslääkkeiden ajatellaan korjaavan näitä haitallisia muutoksia lisäämällä uusia hermoyhteyksiä ja aivojen muovautuvuutta.

Aivojen muovautuvuudella eli plastisuudella tarkoitetaan hermosolujen rakenteellista ja toiminnallista muutosta vasteena ympäristölle (Castrén ja Antila 2017). Muutoksessa uusia hermosoluja ja synapseja muodostuu neuro- ja synaptogeneesin kautta, sekä käyttämättömiä yhteyksiä karsiutuu pois. Aivojen muovautuvuus on voimakkainta varhaiskehityksen kriittisten jaksojen aikana, jolloin hermoverkot kehittyvät näinä aikoina opittujen tietojen ja taitojen pohjalta (Hensch 2005). Myös aikuisen aivoissa esiintyy aktiivisuudesta riippuvaa muovautuvuutta ja uusia hermosoluja syntyy läpi elämän hippokampuksen pykäläpoimussa (dentate gyrus) sekä otsalohkon alla sijaitsevassa hajukäämissä (olfactory bulb) (Lledo ym. 2006).

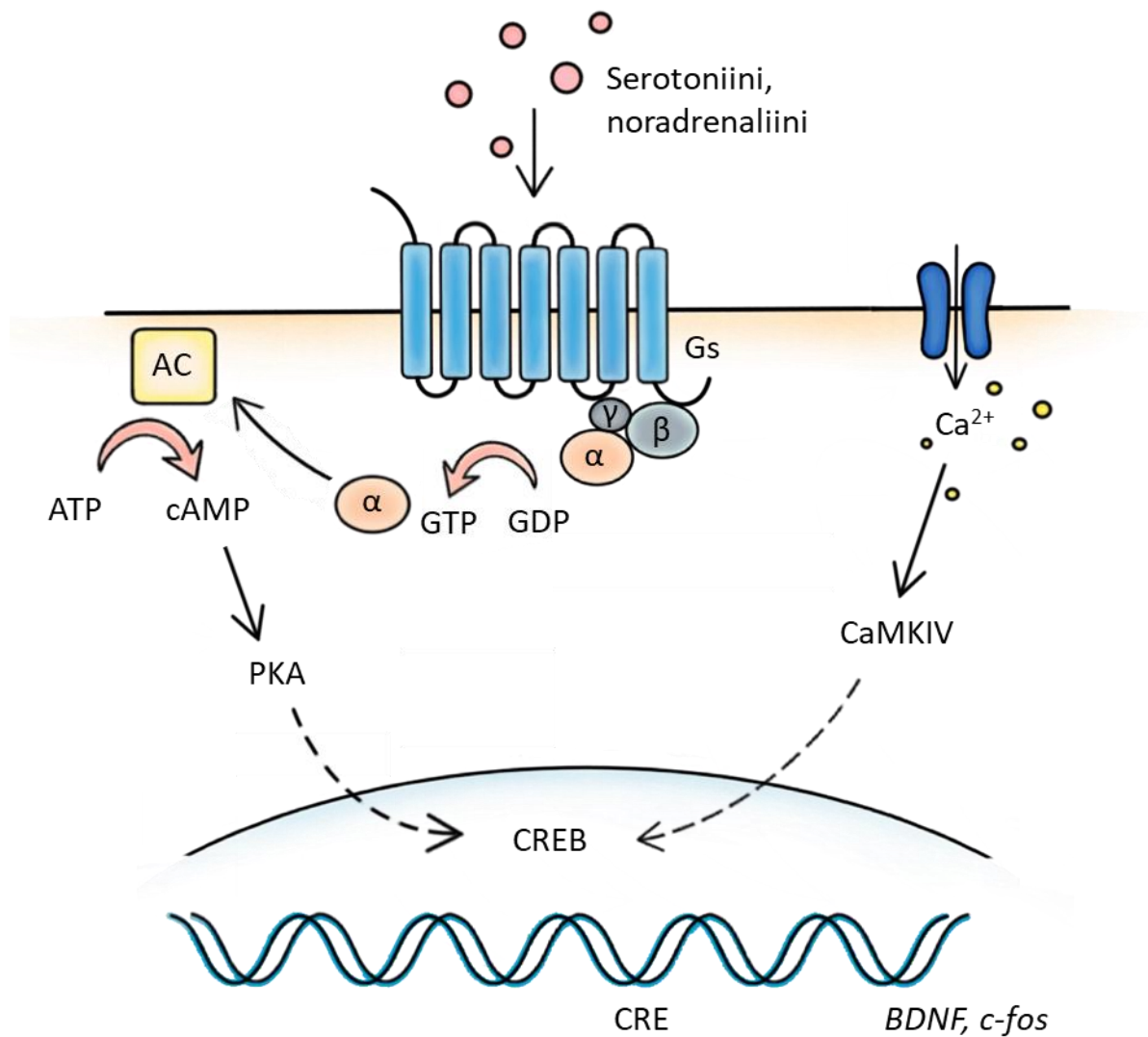
Fluoksetiinin ja muiden perinteisten masennuslääkkeiden pitkäaikainen annostelu aikaansaa kriittisten kehitysjaksojen kaltaisen plastisuuden aikuisen rotan näköaivokuorella (Vetencourt ym. 2008). Masennuslääkkeiden aikaansaamia plastisuuteen liittyviä muutoksia havaitaan myös pykäläpoimussa, jossa neurogeneesi lisääntyy kroonisen fluoksetiinihoidon seurauksena aikuisilla rotilla (Malberg ym. 2000). Makakiapinoilla suoritetun tutkimuksen perusteella neurogeneesin lisääntyminen liittyy olennaisesti fluoksetiinin antidepressiiviseen tehoon (Perera ym. 2011). Tutkimuksen mukaan 15 viikkoa kestäneen fluoksetiinihoidon käynnistämä pykäläpoimun neurogeneesi vähensi stressin aiheuttamaa masennuksen kaltaista käyttäytymistä.

Neurogeneesin estäminen pykäläpoimussa sen sijaan vähentää fluoksetiinin antidepressiivista vaikutusta (Santarelli ym. 2003; Perera ym. 2011).

Suurin osa tällä hetkellä markkinoilla olevista masennuslääkkeistä perustuu niin sanottuun monoamiinihypoteesiin, jonka mukaan masennus johtuu mielialaa säätelevien monoamiinien, erityisesti serotoniinin (5-HT) ja noradrenaliinin vähentyneestä määrästä aivoissa (Hirschfeld 2000). Perinteiset masennuslääkkeet vaikuttavat välittömästi aivojen monoamiinireseptoreihin tai -kuljettajaproteiineihin lisäten solunulkoisen serotoniinin ja noradrenaliinin määrää. Masennuslääkkeiden antidepressiiviset vaikutukset ilmenevät kuitenkin vasta useiden päivien tai viikkojen yhtäjaksoisen annostelun jälkeen (Mitchell 2006). Näin ollen niiden terapeuttinen vaikutusmekanismi ei todennäköisesti perustu ainoastaan akuutteihin välittäjäainemuutoksiin, vaan pitkäkestoisen annostelun aikana tapahtuvaan adaptiiviseen muutokseen postsynaptisissa signaalintireiteissä (Hyman ja Nestler 1996).

2.2 cAMP-välitteinen viestiketju

Suuri osa serotoniinin ja noradrenaliinin kohdereseptoreista on Gs-proteiinikytkentäisiä reseptoreja, jotka aktivoivat syklistä adenosinimonofosfaattia (cAMP) toisiolähtettinä käyttävän viestiketjun (**Kuva 1**) (Duman ym. 1997). Serotoniinin tai noradrenaliinin sitoutuminen reseptoriin aiheuttaa konformaation muutoksen, jonka seurauksena α -alayksikkö irtaantuu aktivoituneesta Gs-proteiiniosasta (Kandel ym. 2013). Vapaa α -alayksikkö sitoutuu cAMP:n muodostumista katalysoivaan adenylyylisyklaasientsyymiin (AC) ja aktivoi sen. cAMP -molekyylit kiinnittyvät proteiinikinaasi A:han (PKA), joka välittää solunsisäisiä viestejä fosforyloimalla sitä seuraavia viestimolekyylejä. Proteiinien fosforylaatio eli proteiinikinaasin katalysoima fosfaattiryhmän liittäminen proteiiniin on yleisesti tärkeä solunsisäinen viestikeino.



Kuva 1. Perinteiset masennuslääkkeet käynnistävät hermosolujen cAMP välitteisen viestiketjun ja lisäävät CREB:n fosforylaatiota. Perinteiset masennuslääkkeet lisäävät synaptisen serotoniinin ja noradrenaliinin määrää ja näin ollen aktivoivat niiden Gs-kytkentäisiä kohderesptoreja (Hirschfeld 2000). Gs-proteiiniosa aktivoi adenylylaattisyklaasi (AC) entsyymien, joka katalysoi syklisen adenosinimonomofosfaatin eli cAMP:n muodostumista ATP:stä. cAMP sitoutuu proteiinkinaasi A:han (PKA) saaden aikaan sen translokaation tumaan, jossa se vaikuttaa geenien ekspressioon fosforyloimalla geenin CRE-sekvenssiin sitoutuvan transkriptiotekijä CREB:n (Duman ym. 1997). CREB voi fosforyloitua myös intrasellulaarisen kalsiumin määrään reagoivien kalmoduliinikinaasien (CaMK) vaikutuksesta (Bito ym. 1996).

Masennuslääkkeiden aktivoimassa cAMP-välitteisessä viestikejussa PKA fosforyloi cAMP:n vaste-elementin sitojaproteiinin eli CREB:in seriinitähde 133 -kohdalta (Shaywitz ja Greenberg 1999). CREB on transkriptiotekijä, joka säätelee muun muassa

hermoston kehittymiseen, neuroprotektioon ja aivojen muovautuvuuteen liittyvien geenien ilmenemistä sitoutumalla geenien cAMP:n vaste-elementtiin (CRE-sekvenssi) (Lonze ja Ginty 2002). CRE-sekvenssin sisältäviä geenejä tunnetaan tällä hetkellä yli 100, mukaan lukien tässä katsauksessa myöhemmin käsiteltävät *BDNF* ja *c-fos*. cAMP-välitteisen viestiketjun lisäksi CREB voi fosforyloitua myös Ca^{2+} -ionien sisäänvirtauksen aiheuttaman Ca^{2+} -kalmoduliinikinaasien (CaMK) aktivaation kautta (Bito ym. 1996). Kalsium on cAMP:n ohella yksi yleisimmistä solunsisäisessä viestinnässä käytetyistä toisioläheteistä. Ca^{2+} -kalmoduliinikinaasit ovat ryhmä entsyymejä, joiden aktivaatio käynnistyy Ca^{2+} -ioneja sitoneen kalmoduliinin kiinnittyessä niihin (Kandel ym. 2013). Tunnetuin CREB:iä fosforyloiva CaMK on CaMKIV, jota löytyy sekä sytosolista että tumasta (Bito ym. 1996; Lonze ja Ginty 2002).

2.3 Aivoperäinen hermokasvutekijä BDNF

Hermoston kasvutekijät eli neurotrofiinit ovat ryhmä proteiineja, jotka huolehtivat hermosolujen kehityksestä ja selviytymisestä (Kandel ym. 2013). Neurotrofiineista erityisesti aivoperäinen hermokasvutekijä eli BDNF välittää aivojen aktiivisuudesta riippuvia plastisia muutoksia (Castrén ja Antila 2017). BDNF:n ekspressio eli ilmeneminen riippuu hermosolujen aktiivisuudesta (Thoenen 1991). Yleisesti ottaen aivojen eksitoivan eli kiihottavan hermovälityksen tärkein välittäjäaine glutamaatti lisää *BDNF*:n ilmenemistä, kun taas inhibitorisia eli estäviä vaikutuksia välittävä gamma-aminovoihappo (GABA) vähentää sitä.

Ihmisen *BDNF*-geeni koostuu ainakin yhdestätoista 5' eksonista ja yhdeksästä promoottorista (Cattaneo ym. 2016). Hiiren *BDNF*-geeni koostuu kahdeksasta säätelevästä 5' ja yhdestä proteiinia ilmentävästä 3' eksonista (Aid ym. 2007). *BDNF*-geenin transkriptio voi alkaa eri eksonien kohdalla sijaitsevilta promoottorialueilta ja näin ollen tuottaa erilaisia *BDNF*:n lähetti-RNA (mRNA) -molekyylejä eli transkripteja. Eri mRNA-molekyylit käyvät läpi post-transkriptionaalisia muokkauksia kuten silmukointia, jonka seurauksena ne transloituvat lopulta samaksi pro-BDNF -peptidiksi (Cattaneo ym. 2016). Pro-BDNF pilkkoutuu edelleen proteaasi-entsyymien avulla BDNF-proteiiniksi.

Masennus vaikuttaa merkittävästi BDNF:n ja sen tyrosiinikinaasireseptorin (TrkB) ilmenemiseen. Dwivedi työryhmineen (2003b) suorittamassa tutkimuksessa *BDNF*:n ja *TrkB*:n mRNA:n määrä oli vähentynyt itsemurhaan kuolleiden etuaivokuorella ja hippokampuksessa. Samoilla aivoalueilla havaittiin myös BDNF-proteiinin vähäisempi määrä verrattuna muista syistä kuolleisiin henkilöihin, joilla ei oltu diagnosoitu mielenterveyden sairautta (Dwivedi ym. 2003b; Karege ym. 2005). BDNF-proteiinin vähentynyt määrä havaitaan myös masennusta sairastavien ihmisten veren seerumi- ja plasmanäytteissä (Polyakova ym. 2015).

Sekä hiirillä että ihmisillä erityisesti *BDNF IV* -eksonin ekspressio lisääntyy hermosolujen aktiivisuuden seurauksena (Aid ym. 2007; Cattaneo ym. 2016) *BDNF IV* on altis epigeneettisille muutoksille esimerkiksi metylaation eli metyyliiryhmän lisäämisen kautta (Cattaneo ym. 2016). Keller työryhmineen (2010) suorittaman postmortem tutkimuksen perusteella *BDNF IV*:n metylaatio vaikuttaa mahdollisesti *BDNF*-geenin ekspressioon sitä vähentävästi ohimolohkossa sijaitsevalla Wernicken alueella (Keller ym. 2010).

2.4 Masennuslääkkeiden vaikutus CREB- ja BDNF -proteiineihin

Perinteisten masennuslääkkeiden pitkäaikainen annostelu vaikuttaa *CREB*-mRNA:n ja CREB-proteiinin määrään. Eri ryhmiin kuuluvien perinteisten masennuslääkkeiden kolmen viikon yhtäjaksoinen annostelu kasvattaa *CREB*-mRNA:n määrää rotan hippokampuksessa (Nibuya ym. 1996). Postmortem tutkimusten perusteella sekä CREB-proteiinin että *CREB*-mRNA:n määrä on vähentynyt vaikeaa masennusta sairastaneiden itsemurhan tehneiden henkilöiden etuaivokuorella ja hippokampuksessa (Dowlatsahi ym. 1998; Dwivedi ym. 2003a). Masennuslääkkeitä käyttäneillä itsemurhan tehneillä henkilöillä CREB-proteiinin määrä ohimo- eli temporaalilohkon alueella oli kuitenkin suurempi, kuin henkilöillä jotka eivät olleet saaneet lääkettä (Dowlatsahi ym. 1998).

Vastaavia muutoksia havaitaan *BDNF*-mRNA:ssa ja proteiinissa. Jyrsijöillä tehdyissä tutkimuksissa perinteiset masennuslääkkeet aktivoivat BDNF:n tyrosiinikinaasireseptoria (TrkB) akuutisti, mutta eivät vielä yhden annostelukerran jälkeen vaikuta *BDNF*-

mRNA:n määrään (Nibuya ym. 1995; Rantamäki ym. 2007). Pitkäaikainen masennuslääkekäsittely sen sijaan lisää *BDNF*:n ja *TrkB*:n mRNA:n esiintymistä rotan etuaivokuorella ja hippokampuksessa (Nibuya ym. 1995; Dias ym. 2003). Ihmisillä onnistunut masennuslääkehoito näkyy veren seerumin BDNF-proteiinitason nousuna (Polyakova ym. 2015). Myös postmortem tutkimuksissa lääkehoitoa saaneiden potilaiden BDNF-proteiinitasot etuaivokuorella, päälaki- eli parietaalilohkon alueella ja hippokampuksessa ovat normalisoituneet (Karege ym. 2005; Sheldrick ym. 2017). Sähköhoidon tehokkuudesta viestii se, että sen eläinmalli aiheuttaa *BDNF* mRNA:n lisääntymisen etuaivokuorella ja pykäläpoimussa akuutisti jo yhden hoitokerran jälkeen (Nibuya ym. 1995).

3 NOPEAVAIKUTTEISET MASENNUSLÄÄKKEET

3.1 Ketamiini

3.1.1 Farmakokinetiikka ja farmakodynamiikka

Ketamiini kehitettiin noin 60 vuotta sitten korvaamaan voimakkaita psykotomimeettisia eli psykoosin oireita muistuttavia haittavaikutuksia aiheuttava nukutusaine fensyklidiini (PCP) (Corssen ja Domino 1966). Ketamiini on rakenteeltaan PCP:n johdannainen, jonka aryyliisikloalkyyliamiinirungon sykloheksa-1-oni sisältää kiraalisen hiiliatomin. Lääketieteessä käytetty ketamiini on raseeminen yhdistelmä sen S(+)- ja R(-)-enantiomeereja tai pelkkää S(+)-enantiomeeriä, jonka anesteettinen ja analgeettinen teho on R(-)-enantiomeeria parempi (Peltoniemi ym. 2016).

Ketamiini annostellaan yleensä laskimoon annettavana infuusiona, sillä sen biologinen hyötyosuus oraalisen annon jälkeen on voimakkaan ensikierron metabolian vuoksi vain 16–24 % (Clements ym. 1982; Yanagihara 2003). Ketamiini on rasvaliukoinen eli lipofiilinen molekyyli, joka jakautuu nopeasti ja laajasti kudoksiin, mukaan lukien aivoihin. Näennäinen jakautumistilavuus molemmille enantiomeereille on noin 3–5 l/kg, S(+)-enantiomeerin jakautuessa jokseenkin R(-)-enantiomeeria tehokkaammin (Geisslinger ym. 1993; Persson ym. 2002). Ketamiini poistuu ihmisen elimistöstä

nopeasti, kokonaispuhdistuman ollessa noin 20 ml/min/kg ja eliminaation puoliintumisajan 2,5-3 tuntia (Clements ym 1982; Geisslinger ym. 1993).

Ketamiinin pääasiallinen metaboliareitti on maksan mikrosomeissa tapahtuva sytokromi P450 -entsyymien CYP3A4 ja CYP2B6 katalysoima N-demetylaatio, jonka pääasiallinen metaboliatuote on norketamiini (Hijazi ja Boulieu 2002; Portmann ym. 2010). Samat entsyymit katalysoivat norketamiinin hydrolyysia hydroksinorketamiineksi ja edelleen dehydroksinorketamiineiksi (Portmann ym. 2010). S(+)-ketamiini metaboloituu norketamiiniksi raseemista yhdistettä tai R(-)-ketamiinia tehokkaammin. Norketamiinin huippupitoisuus plasmassa saavutetaan noin 1,5 tuntia ketamiini-infuusion jälkeen, kun taas sen metaboliiteilla vastaava aika on 2–4 tuntia (Zhao ym. 2012; Zarate ym. 2012). Hydroksinorketamiini ja dehydroksinorketamiini voidaan mitata verestä vielä 3 päivää ketamiini-infuusion jälkeen (Zhao ym. 2012).

Ketamiinin pääasiallinen vaikutuskohde on N-metyyli-D-aspartaatti -reseptori (NMDA-reseptori), jossa se sitoutuu avoimen ionikanavan sisällä olevaan PCP:n sitoutumispaikkaan estäen ionien kulkeutumisen kanavan läpi (Anis ym. 1983; MacDonald ym. 1987). Avoin NMDA-reseptori läpäisee solun ulkopuolelta sisälle virtaavia Ca^{2+} - ja Na^{+} -ioneja sekä sisältä ulos liikkuvia K^{+} -ioneja (Kandel ym. 2013). Ketamiini on NMDA-antagonisti, sillä se ei aktivoi tai inaktivoi reseptoria vaan salpaa sen (MacDonald ym. 1987). Ketamiini ei kilpaile samasta sitoutumispaikasta NMDA-reseptorin luonnollisen ligandin glutamaatin kanssa, eli sitoutuminen on nonkompetitiivista eli kilpailematonta.

NMDA-reseptori on neljän alayksikön muodostama heterotetrameerinen proteiinikompleksi, joka koostuu tyypillisesti kahdesta GluN1-alayksiköstä sekä GluN2/GluN2- tai GluN2/GluN3-alayksiköistä (Kandel ym. 2013). Eri alayksiköistä koostuvien NMDA-reseptorien sijainti vaihtelee eri aivoalueilla. Ketamiinin affiniteetti on suurempi GluN2D-alayksikön sisältäviin NMDA-reseptoreihin, joita löytyy erityisen runsaasti niin sanotuista interneuroneista (Kotermanski ja Johnson 2009). NMDA-reseptorin aktivaatio vaatii glysiini-kofaktorin sitoutumisen GluN1-alayksikköön ja glutamaatin sitoutumisen GluN2-alayksikköön (Kandel ym. 2013). Aktivaatio on

jänniteriippuvaista, sillä solukalvon lepopotentiaalissa NMDA-ionikanavan sulkee Mg^{2+} -ioni, joka poistuu kanavasta solukalvon depolarisaation aiheuttaman sähköisen hyljinnän seurauksena.

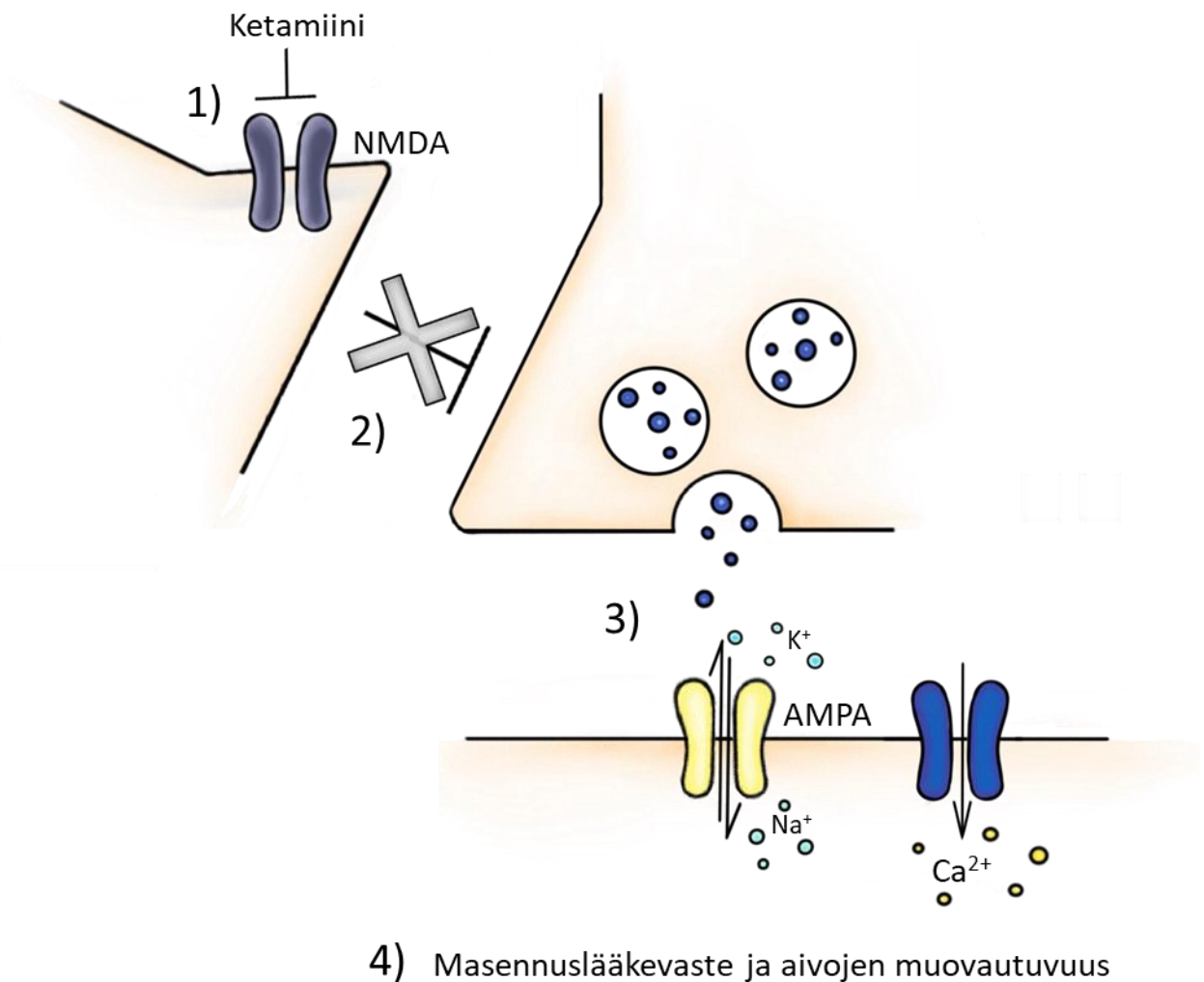
Perinteisten masennuslääkkeiden pitkäaikainen annostelu ja sähköhoidon eläinmalli vaikuttavat hiirillä NMDA-reseptorikompleksin glysiininsitoutumispaikan ligandin sitoutumisominaisuuksiin (Paul ym. 1994). Akuutti masennuslääkkeen annostelu ei kuitenkaan aiheuta vastaavaa muutosta. Masennuslääkkeiden aiheuttamat adaptiiviset muutokset NMDA-reseptorissa osallistuvatkin mahdollisesti ketamiinin antidepressiivisen vaikutuksen välittämiseen.

3.1.2 Masennuslääkemekanismi: disinhibitio-hypoteesi

Keskushermoston glutamaterginen eli glutamaattia välittäjäaineenaan käyttävä hermovälitys on pääasiassa eksitoivaa (Kandel ym. 2013). Subanesteettisen ketamiinin aiheuttaman NMDA-reseptorivälitteisen glutamatergisen signaloinnin estäminen ei kuitenkaan johda aktiivisuuden vähenemiseen aivokuorella – päinvastoin. Kuvantamistutkimusten perusteella subanesteettinen ketamiini lisää veren happipitoisuuden muutoksen osoittamaa ja metabolista aktiivisuutta ihmisen aivokuoren eri alueilla (Breier ym. 1997; Höflich ym. 2017). Moghaddam työryhmineen (1997) rotilla suorittaman tutkimuksen perusteella ketamiinin aikaansaaman eksitaation taustalla on glutamaatin vapautuminen etuaivokuorella.

Ketamiinin disinhibitio-hypoteesin mukaan etuaivokuoren inhibitoristen interneuronien NMDA-reseptorien estäminen johtaa GABAergisen inhibition vähentymiseen, glutamaatin vapautumiseen ja aktiivisuudesta riippuvan plastisuuden induktioon (**Kuva 2**) (Duman ym. 2016; Duman 2018). Nämä etuaivokuoren interneuronit ovat jatkuvasti aktiivisia eli tonaalisia, jonka vuoksi ketamiini pääsee vapaasti sitoutumaan avoimen kanavan sisällä olevaan sitoutumispaikkaan. Inhibition puuttuessa kohdesolut (pyramidaalineuronit) vapauttavat eksitatorista glutamaattia, joka aktivoi postsynaptisten solujen α -amino-3-hydroksi-5-metyyli-soksatsoli-4-propionihappo- eli AMPA-reseptoreja. NMDA-reseptorien tapaan AMPA-reseptorit ovat glutamatergisia ionikanavareseptoreja, jotka osallistuvat neuronaalista plastisiteettia sääteleviin

signaalintiketjuihin (Kandel ym. 2013). Ne läpäisevät tyypillisesti Na^+ - ja K^+ -ioneja. AMPA-reseptorien aktivaation aiheuttama solukalvon depolarisaatio aikaansaa jänniteherkkien kalsiumkanavien avautumisen ja Ca^{2+} -ionien sisäänvirtauksen. Solunsisäisen kalsiumin lisääntyminen aktivoi plastisuuteen liittyviä viestiketjuja, jotka johtavat lopulta proteiinisynteesiin, synapsien vahvistumiseen ja uusien synapsien muodostumiseen (Duman 2012).



Kuva 2. Ketamiinin disinhibition-hypoteesi. NMDA-antagonismi (1) GABAergisissä interneuroneissa poistaa niiden estävän vaikutuksen (2), joka aiheuttaa glutamaatin vapautumisen pyramidaalneuroneista (3) (Duman 2018). Tämä johtaa AMPA-reseptoriaktivaation aiheuttamaan solukalvon depolarisaatioon, jänniteherkkien kalsiumkanavien avautumiseen ja aivojen plastisuuteen liittyvien viestiketjujen käynnistymiseen (4).

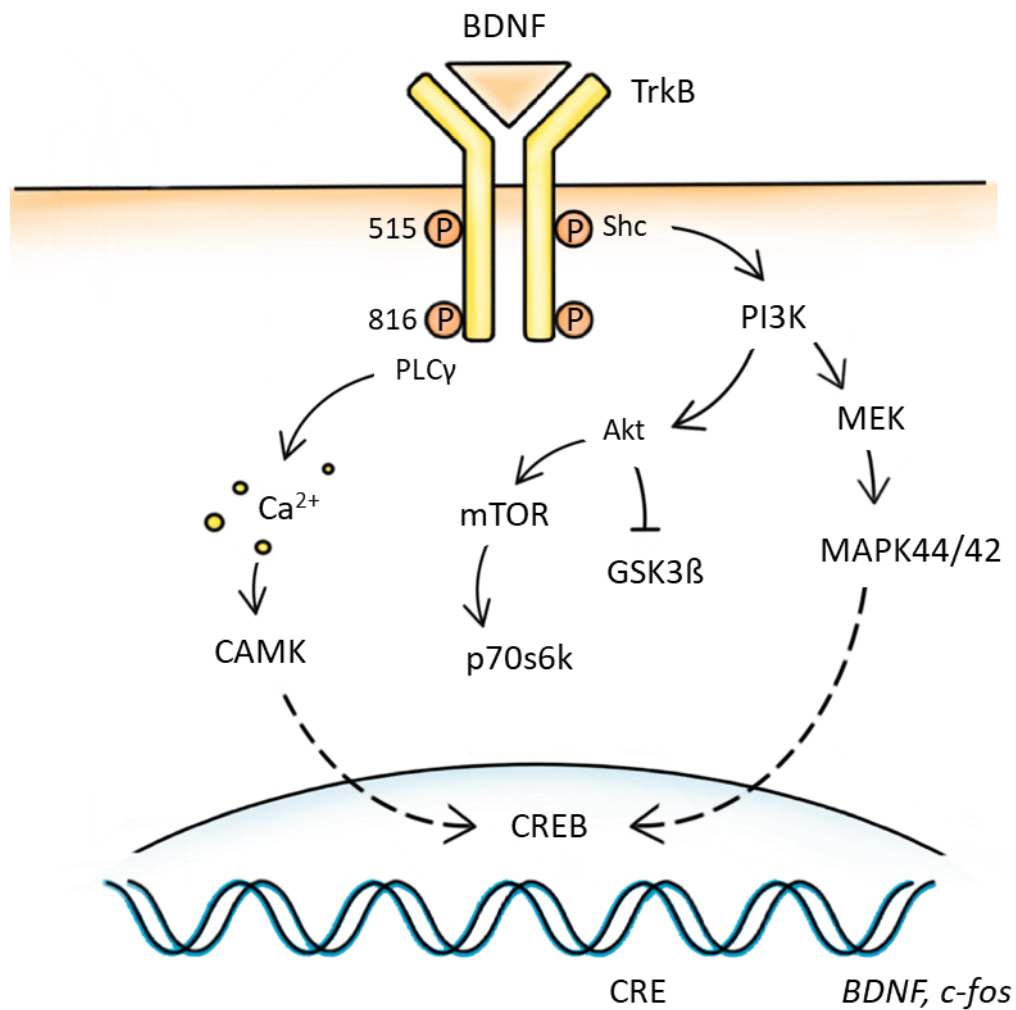
Ketamiinin aikaansaama aivojen muovautuvuuden lisääntyminen on osoitettu eläinkokeissa. Ma työryhmineen (2017) hiirillä tehdyn tutkimuksen mukaan ketamiini indusoi neurogeneesiä pykäläpoimussa jo 24 tuntia annostelun jälkeen. Ketamiini lisää myös synapsien muodostumiselle tärkeän Arc-proteiinin määrää nopeasti ja tilapäisesti (1–2 h annostelun jälkeen) rotan etuaivokuorella (Li ym. 2010). Lisäksi se vaikuttaa synapsien vahvistumiseen lisäämällä suuriläpimittaisten (engl. mushroom) dendriittien haarakkeiden määrää. Kroonisen stressin eläinmallissa ketamiini palauttaa stressin aikaansaamia haitallisia muutoksia vahvistamalla heikentyneitä synapseja ja lisäämällä dendriittien haarakkeita rottien etuaivokuorella (Li ym. 2011).

3.1.3 Masennuslääkemekanismi: TrkB-GSK β -signaali

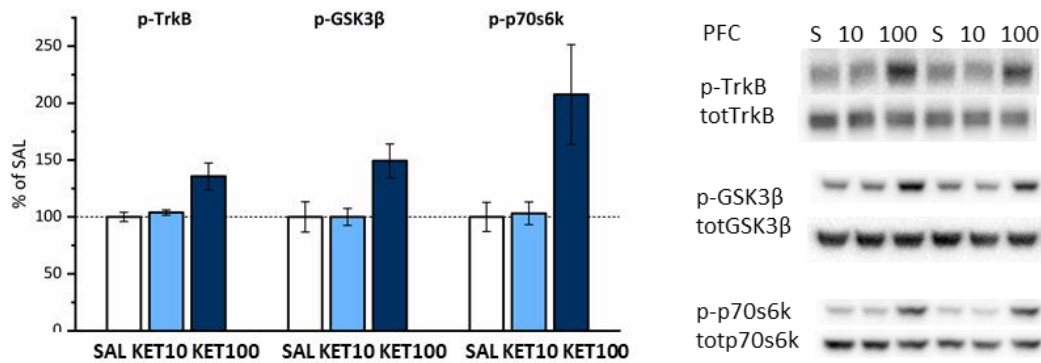
Eläintutkimusten perusteella ketamiinin aikaansaaman synapto- ja neurogeneesin taustalla on TrkB-välitteinen viestiketju (Li ym. 2010; Ma ym. 2017). TrkB-reseptori voi fosforyloitua useiden eri tyrosiinitähteiden kohdalta aktivoiden eri toisiolähettejä solun sisällä (**Kuva 3**). Fosforylaatio tyrosiinitähteen 515 kohdalta johtaa PI3K-MAPK44/42 -signaaliin, kun taas Tyr816-tähteen fosforylaatiota seuraa solunsisäisten Ca²⁺-varastojen vapautuminen ja PLC γ -CaMK -viestiketjun aktivaatio (Huang ja Reichardt 2003). Ketamiini lisää akuutisti ja annosriippuvaisesti TrkB-reseptorin ja sitä seuraavien kinaasien fosforylaatiota hiiren etuaivokuorella (**Kuva 4**) (Kohtala ym. 2019). Sekä PI3K-MAPK44/42- että PLC γ -CaMK -viestiketjut on yhdistetty ketamiinin masennuslääkevaikutukseen. MAPK44/42:n aktivoivan mitogeenin aktivoiva proteiinikinaasi kinaasin (MEK) ja CAMK:n inhibiittorit estävät ketamiinin aikaansaaman antidepressiivisen käyttäytymisen masennuslääkevasteen rotta- tai hiirimalleissa (Réus ym 2014; Adaikkan ym. 2018).

Fosfoinositidi-3-kinaasit (PI3K) välittävät hermosolujen selviytymistä estämällä pro-apoptoottisen glykokeenin syntaasikinaasi 3 β :n eli GSK3 β :n toimintaa fosforyloimalla sen seriinitähte-9 kohdalta (Huang ja Reichardt 2003; Jope ja Johnson 2004). GSK3 β :n fosforylaatio voi joko vähentää tai lisätä sen aktiivisuutta, riippuen fosforyloituvan seriinitähteen kohdasta. GSK3 β :n aktiivisuus on lisääntynyt masennusta sairastaneiden ihmisten postmortem aivoissa (Karege ym. 2007). Ketamiini sen sijaan lisää GSK3 β :n

inhiboivaa seriini-fosforylaatiota hiiren etuaivokuorella ja hippokampuksessa (Kohtala ym. 2019). Masennusta kuvaavassa opitun avuttomuuden eläinmallissa ketamiinin antidepressiivinen vaikutus estyy GSK3 β :n aktiivista muotoa ilmentävillä muuntogeenisillä hiirillä (Beurel ym. 2011).



Kuva 3. BDNF-TrkB-GSK3 β -signalointi. Aivoperäisen hermokasvutekijän BDNF:n kohdereseptori TrkB voi fosforyloitua usean eri tyrosiinitähteen kohdalta aktivoiden eri toisiolähteitä (Huang ja Reichardt 2003). Tyr515 fosforylaatio johtaa PI3K-MAPK44/42 signalointiketjun aktivoitumiseen, kun taas Tyr816 fosforylaatiota seuraa PLC γ -CaMK -viestiketju.



Kuva 4. Ketamiinin 100 mg/kg annos aiheuttaa TrkB, GSK3 β ja p70s6k fosforylaation lisääntymisen hiirien etuaivokuorella (PFC) verrattuna saliiniin tai 10 mg/kg ketamiiniin 30min i.p. annostelusta. Muokattu lähteestä Kohtala ym. 2019.

Akuutti ketamiinin annostelu lisää BDNF-proteiinin määrää rotan hippokampuksessa (Garcia ym. 2008; Yang ym. 2013). Ketamiini ei aiheuta antidepressiivistä käyttäytymistä pakotetussa uintitestissä aikuisiässä indusoiduilla *BDNF* -poistogeenisillä (induced knockout) hiirillä eli hiirillä, jotka eivät tutkimushetkellä ilmennä BDNF-proteiinia etuaivokuorella ja hippokampuksessa (Autry ym. 2011). Samoin ketamiinin masennuslääkevaikutus estyy, kun BDNF:n toiminta estetään aivoissa paikallisesti vasta-aineen avulla (Lepack ym. 2015). Geneettiseltä perimältään muokkaamattomissa hiirissä ketamiini lisää uintiaikaa ja vähentää immobilisaatiota eli paikallaan oloa (Garcia ym. 2008; Autry ym. 2011; Yang ym. 2013). Immobilisaation väheneminen pakotetussa uintitestissä ennustaa luotettavasti toimivaa masennuslääkevastetta (Petit-Demouliere ym. 2004).

3.1.4 Käyttö masennuslääkkeenä

Ensimmäinen plasebo-kontrolloitu, kaksoissokkoutettu kliininen tutkimus ketamiinin antidepressiivisistä vaikutuksista julkaistiin vuonna 2000 (Berman ym. 2000). Perinteisistä masennuslääkkeistä poiketen ketamiinin antidepressiiviset vaikutukset ovat havaittavissa jo muutaman tunnin sisällä annostelusta (Zarate ym. 2006). Antidepressiivisen vaikutuksen huippu saavutetaan 24–72 tunnin sisällä (Berman ym. 2000; Zarate ym. 2006; Murrough ym. 2013; Lapidus ym. 2014). Ketamiinin teho lääkeresistenttiä

masennusta sairastavilla sekä akuutisti itsetuhoisilla potilailla on osoitettu useissa eri tutkimuksissa (Zarate ym. 2006; DiazGranados ym 2010; Murrough ym. 2013; Lapidus ym. 2014.) DiazGranados työryhmineen suorittamassa avoimessa tutkimuksessa (2010) lääkeresistenttiä masennusta sairastavien potilaiden itsemurha-ajatukset vähenivät merkittävästi jo 40 minuutin sisällä ketamiini-infuusion annostelusta. Ketamiinin masennusoireita lievittävän vaikutuksen kesto on kuitenkin tilapäistä ja yksittäisen annostelukerran jälkeen masennusoireet palaavat lähtötilanteeseen noin 7–14 päivän kuluessa (Berman ym. 2000; Zarate ym. 2006).

Ketamiinin laajempaa terapeutista käyttöä rajoittaa PCP:n tavoin sen aiheuttamat psykotomimeettiset haittavaikutukset, kuten aistiharhat ja sekavuus (Peltoniemi ym. 2016). Ketamiinin aikaansaaman dissosiatiivisen anestesian aikana aivokuoren tietoa yhdistelevät assosiaatioalueet voivat vastaanottaa viestejä potilaan kokemista aistihavainnoista, mutta eivät tulkita niitä (Corssen ja Domino 1966). Tämä voi aiheuttaa esimerkiksi kehosta irtautumisen tunnetta tai muistihäiriöitä. Dissosiatiiviset haittavaikutukset ovat kuitenkin PCP:tä heikompia ja lyhytkestoisempia. Myös hemodynaamiset haitat, kuten systolisen verenpaineen tilapäinen nousu, ovat yleisiä (Murrough ym 2013; Lapidus ym. 2014). Ketamiinin aiheuttamat akuutit psykoaktiiviset ja hemodynaamiset haittavaikutukset hälvenevät keskimäärin 2–4 tunnin sisällä annostelusta (Berman ym. 2000; Zarate ym. 2012).

3.2 Muut psykoaktiiviset aineet

3.2.1 Kliiniset tutkimukset

Laajamittaisia kliinisiä tutkimuksia psykedeelien käytöstä masennuksen hoidossa ei ole vielä tehty, mutta alustavat tulokset ovat lupaavia. Madonlakki-suvun (*Psilocybe*) sienissä luontaisesti esiintyvää kasviaikaloidia psilosybiiniä on tutkittu lupaavin tuloksin terminaalisesti sairaiden sekä lääkeresistenttien potilaiden masennuksen hoidossa (Grob ym. 2011; Griffiths ym. 2016; Ross ym. 2016; Carhart-Harris ym. 2016). Psilosybiinistä käytettiin maltillisia 0,2–0,3 mg/kg peroraalisia annoksia, joiden annostelu oli yhdistetty psykoterapeuttisen tukeen kaikissa tutkimuksissa. Psykedeelisen kokemuksen kesto oli

4–6 tuntia ja masennuksen sekä ahdistuksen lieventyminen havaittiin heti annostelua seuraavana päivänä. Psilosybiinin aikaansaama masennuksen lieventyminen oli pitkäkestoista ja merkittävää vielä tutkimuksen viimeisessä mitattavassa aikapisteessä, eli 6–6,5 kuukautta yksittäisen annoksen jälkeen (Grob ym. 2011; Ross ym. 2016). Psilosybiinillä ei havaittu vakavia tai odottamattomia haittavaikutuksia.

Ensimmäinen psykedeeliavusteisessa terapiassa käytetty hallusinogeeni on Albert Hoffmannin kehittämä lysergihapon dietyyliamidi eli LSD, joka eteni 1950-luvulla lääketehdas Sandoz:n markkinoimana klinisiin tutkimuksiin sekä psykoterapeuttien vastaanotoille (Nichols 2004). LSD:n aiheuttama psykedeelinen kokemus on kestoltaan hieman psilosybiiniä pidempi, eli noin 8 tuntia. Gasser työryhmineen (2014) suorittamassa pilottitutkimuksessa psykoterapiaan yhdistetty 200 µg annos LSD:tä aikaansai ahdistusoireiden lieventymisen vakavasti sairailta potilailla. Anksiolyyttinen vaikutus säilyi jopa 12 kuukautta annostelun jälkeen.

Myös kasviperäisiä hallusinogeeniä sisältävä kasviuutejuoma Ayahuasca aiheuttaa nopean masennusoireiden lieventymisen hoitoresistenttiä tai uusiutuvaa masennusta sairastavilla potilailla (Santos ym. 2018; Palhano-Fontes ym. 2019). Oireiden lieventyminen oli merkitsevää vielä 7–21 päivää yksittäisen annoksen jälkeen. Ayahuasca on perinteisesti amazoninajahuaskaliaanin (*Banisteriopsis caapi*) kuoresta ja shamaanikahvikin (*Psychotria viridis*) lehdistä valmistettava juoma, jonka pääasiallisina hallusinogeenisinä yhdisteinä toimivat serotonerginen dimetyylitryptamiini (DMT) ja MAO-inhibiittori harmiini (McKenna 2006).

3.2.2 Neurobiologinen mekanismi

Klassiset hallusinogeenit, kuten psykedeelit lysergihapon dietyyliamini (LSD) ja psilosybiini, ovat serotoniinianalogeja joiden vaikutukset välittyvät pääasiassa 5-HT_{2A}-reseptorin kautta. Prekliinisten tutkimusten perusteella klassiset psykedeelit indusoivat neuronaalista plastisiteettia akuutisti jo yhden annostelukerran jälkeen (Frankel ja Cunningham 2002; Nichols ja Sanders-Bush 2002; Ly ym. 2018). Eri ryhmiin kuuluvat hallusinogeenit lisäävät uusien dendriittien haarakkeiden sekä synapsien muodostumista TrkB-välitteisen signaaloinnin kautta rotan aivokuoren hermosoluissa (Ly ym. 2018).

DMT (10 mg/kg) lisää uusien dendriittien haarakkeiden muodostumista eli spinogeneesiä rotan etuaivokuoren pyramidaalineuroneissa 24 tuntia myös intraperitoneaalisen (i.p.) annostelun jälkeen. Psilosybiinin on havaittu annoksesta riippuen sekä lisäävän (0,1 mg/kg) että vähentävän (1 mg/kg) hiiren hippokampuksen neurogeneesiä (Catlow ym. 2013). Molemmat annokset lievensivät klassisen pelkoehdollistumisen aiheuttamaa käyttäytymisreaktiota, mutta matalampi annos sai muutoksen aikaan nopeammin.

Klassiset psykedeelit lisäävät neuronaaliseen plastisiteettiin yhdistettyjen välittömien-aikaisten geenien (IEG) *c-fos*:n ja *Arc*:n ekspressiota rottien etuaivokuorella (Frankel ja Cunningham 2002; Nichols ja Sanders-Bush 2002). IEG ovat geenejä, jotka aktivoituvat nopeasti ja lyhytaikaisesti suorana vasteena soluviestintään (Sheng ja Greenberg 1990). Ne ilmentävät usein myöhäisten geenien (engl. late response gene) aktivaatiota sääteleviä proteiineja, kuten transkriptiotekijöitä. Fos-proteiineja ilmentävä *c-fos* IEG voi aktivoitua useiden eri signaalintireittien kautta, esimerkiksi cAMP- tai Ca^{2+} -indusoiman CREB:n fosforylaation seurauksena (Herrera ja Robertson 1996).

Matala annos LSD:tä (5µg–20 µg) lisää terveiden vapaaehtoisten veriplasman BDNF pitoisuutta 4–6 tuntia annostelun jälkeen (Hutten ym. 2020). Sama muutos havaittiin terveiden ja masentuneiden seerumin BDNF-pitoisuudessa 48 tuntia psykedeelisen ayahuasca-annoksen jälkeen (Almeida ym. 2019). Klassisten psykedeelien masennuslääkevaikutuksen taustalle onkin esitetty ketamiinin disinhibitio-hypoteesin kaltaista mallia, jossa psykedeelien indusoima etuaivokuoren eksitaatio johtaa BDNF:n ilmenemisen lisääntymiseen ja aktiivisuudesta riippuvaan plastisuuteen (Vollenweider ja Kometer 2010).

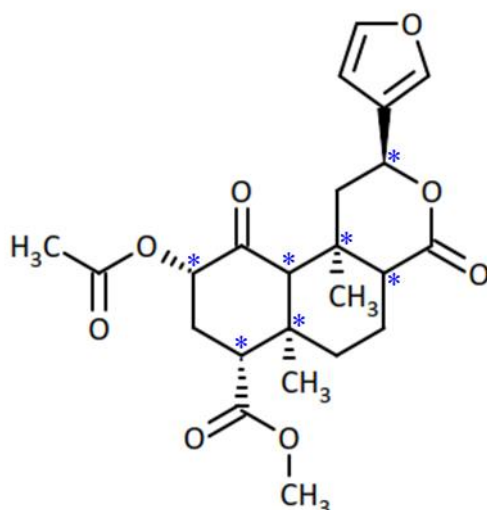
4 SALVIA DIVINORUM JA SALVINORIINI A

4.1 *Salvia divinorum*

Huulikukkaisheimoon kuuluvan salvia-perheen kasveja tunnetaan yli 900, mutta vain *Salvia divinorum* -lajilla on havaittu psykoaktiivisia ominaisuuksia (Reisfield 1993). *S. divinorum* on monivuotinen perenna, joka kasvaa luontaisesti Eteläisen Meksikon vuoristoisissa pilvimetsissä 500–1500 metrin korkeudessa (Valdés ym. 1983; Reisfield 1993). Kasvi vaatii kostean, varjoisan tai puolivarjoisan kasvualustan, jossa se voi kasvaa 1–1,5 m korkuiseksi. *S. divinorum*in tunnistaa sen suurien vihreiden lehtiensä lisäksi valkoisista, violetin verhiön omaavista kukista. Tiettävästi ensimmäinen kasvitieteellinen kuvaus *Salvia divinorum* -kasvista on vuodelta 1962, Gordon Wassonin Oaxacasta keräämän holotyypin päätyessä Eplingin ja Játivan tutkittavaksi (Wasson 1962).

4.2 Salvinoriini A

Salvinoriini A on *S. divinorum* -kasvin lehtien sisältämistä terpeeneistä yleisin, sekä sen psykoaktiivisista ominaisuuksista vastaava yhdiste (Ortega 1982; Valdes ym. 1984). Se on rakenteeltaan seitsemän kiraliakeskusta sisältävä neo-klerodaani diterpeeni eli kymmenestä hiiliatomista koostuvan bisyklisen dekalinin, kuuden hiiliatomin muodostaman sivuketjun sekä neljän dekaliniin kiinnittyneen hiiliryhmän sisältävä yhdiste (**Kuva 5**) (Li ym. 2016a). Neo-klerodaaneilla tarkoitetaan yhdisteitä, joiden stereorakenne on samanlainen kuin klerodaaniperheen ensimmäisellä yhdisteellä klerodiinilla (Merritt ja Ley 1992). Suurin osa kasvipärisistä psykotrooppisista aineista on alkaloidirakenteisia (Feng ym. 2017). Niistä poiketen salvinoriini A ei sisällä lainkaan tyyppiä.



Kuva 5. Salvinoriini A on seitsemän kiraliakeskusta (*) sisältävä neo-klerodaani diterpeeni.

4.2.1 Farmakokinetiikka

Salvinoriini A:n aiheuttamat psykoaktiiviset vaikutukset alkavat nopeasti ja niiden kesto on lyhyt (Siebert 1994). Sen oraalinen hyötyosuus on huono, sillä se inaktivoituu maha-suolikanavassa. Tällä hetkellä yleisin raportoitu käyttötapa *Salvia divinorum* -kasville onkin polttamalla sen kuivattuja lehtiä tai lehtiutetta (Baggott ym. 2004; González ym. 2006). Inhaloidun salvinoriini A:n psykoaktiiviset vaikutukset alkavat noin 30–60 sekunnin kuluessa annostelusta ja kestävät keskimäärin 5–15 minuuttia (Siebert 1994; Baggott ym. 2004; González ym. 2006). Vaikutukset poistuvat yleensä kokonaan 20–30 minuutin kuluessa, mutta niiden kesto voi olla pidempi annosta suurennettaessa (Siebert 1994).

Nopean vaikutuksen alun taustalla on salvinoriini A:n tehokas kulkeutuminen veri-aivoesteen läpi (Hooker ym. 2008; Teksin ym. 2009). Salvinoriini A on erittäin lipofiilinen molekyyli (jakautumiskerroin $XlogP=2,3$), jonka hyvä läpäisevyys perustuu todennäköisesti passiiviseen diffuusioon. Lisäksi sen vaikutukset ilmenevät jo hyvin pienillä annoksilla. Hooker työryhmineen (2008) arvioi, että psykoaktiivinen vaikutus saavutetaan, vaikka aivoihin päätyvän salvinoriini A:n määrä olisi alle 10 µg.

Naaraspaviaaneille tehdyn PET-tutkimuksen perusteella radioleimatun salvinoriini A:n huippupitoisuus aivoissa saavutetaan 40 sekunnin kuluessa i.v. annostelusta (Hooker ym. 2008). Noin 3,3 % salvinoriini A:sta päätyi aivoihin, jossa se jakautui laajasti sekä aivokuoreen ja sen alaisiin osiin. Suurin konsentraatio havaittiin pikkuaivoissa ja merkittävä määrä näköaivokuorella. Eliminaation puoliintumisaika oli keskimäärin 8 minuuttia ja noin 75 % salvinoriini A:sta oli poistunut aivoista 30 minuutin kuluessa. Jyrsijöillä tehdyssä tutkimuksessa huippupitoisuus aivoissa saavutettiin i.p. annostelun jälkeen 10–15 minuutissa, eliminaation puoliintumisajan ollessa keskimäärin 36 minuuttia (Teksin ym. 2009). Ihmisillä huippupitoisuus veressä saavutetaan 1–4 minuutin kuluessa ja salvinoriini A on kokonaan poistunut verestä 90 minuutin aikana (Johnson ym. 2016). Salvinoriini A:n eliminaation puoliintumisaika veressä on eläinkokeiden perusteella 55–75 minuuttia, eli merkittävästi pidempi kuin aivoissa (Schmidt ym. 2005a; Teksin ym. 2009). Myös jyrsijöillä aivoihin päätyvät pitoisuudet ovat merkittävästi plasmapitoisuuksia pienempiä (Teksin ym. 2009).

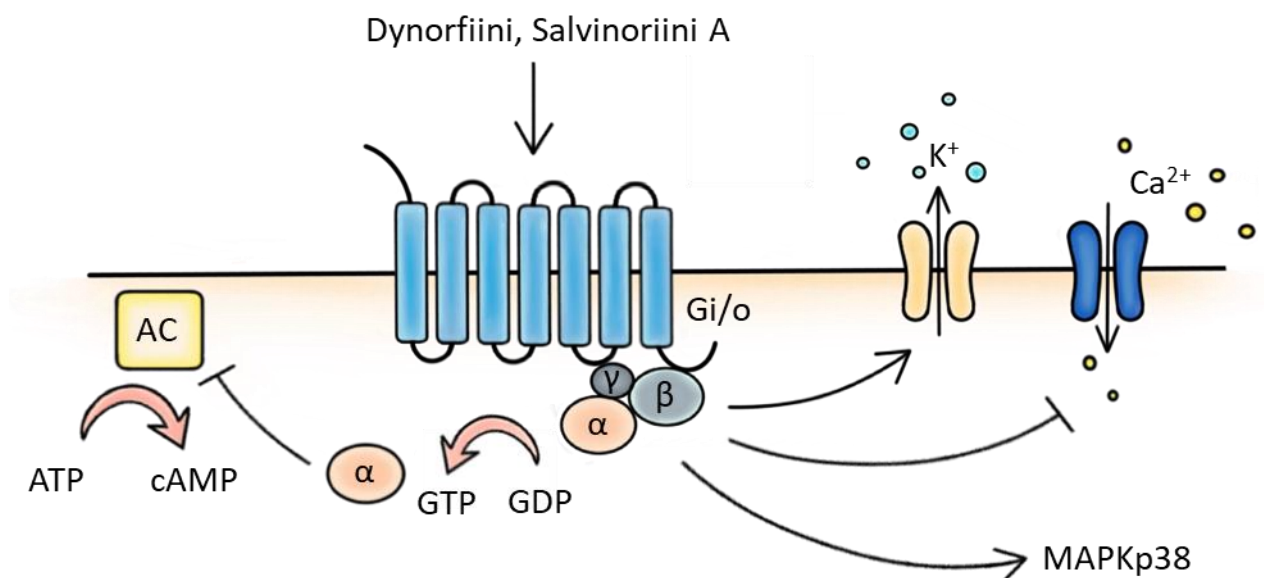
Salvinoriini A metaboloituu nopeasti inaktiivisiksi metaboliiteiksi. Sen pääasiallinen metaboliitti on karboksyyliesteriisien katalysoiman hydrolysaation seurauksena muodostuva salvinoriini B (Schmidt ym. 2005b). Muita mahdollisia metaboliareittejä ovat maksan mikrosomien CYP450-entsyymit sekä UGT-entsyymien katalysoima glukuronidaatio (Teksin ym. 2009). Lipofiilisten metaboliittien poistuminen elimistöstä tapahtuu mahdollisesti sappihappojen kautta, hydrofiilisten metaboliittien poistuessa munuaisfiltraation avulla (Hooker ym. 2008).

4.2.2 Kappa-opioidijärjestelmä

Salvinoriini A on ei-serotonerginen selektiivinen kappa-opioidireseptorin (κ -opioidireseptori, KOR) agonisti, jonka vaikutusmekanismi näin ollen poikkeaa muista tällä hetkellä tunnetuista hallusinogeenistä (Roth ym. 2002; Chavkin ym. 2004). Kappa-opioidireseptorin lisäksi tunnetaan kolme muuta opioidireseptoria: myy- (μ) , delta- (δ) sekä nosiseptiini-opioidireseptorit (Waldhoer ym. 2004). Kaikkien opioidireseptorien aktivaatio aikaansaa analgesiaa eli kivunlievitystä, mutta niiden vaikutus mielialaan vaihtelee euforiasta eli hyvänolontunteesta sen vastakohtaan, dysforiaan.

Opioidikipuläkkeet vaikuttavat pääasiassa myy- ja delta-reseptoreihin ja niille on euforian lisäksi tyypillistä fysiologisen riippuvuuden ja toleranssin muodostuminen.

Opioidireseptorit ovat G-proteiinikytkentäisiä reseptoreja, jotka koostuvat seitsemästä transmembraanisesta proteiinista sekä inhibitorisia vaikutuksia välittävästä intrasellulaarisesta Gi/o-proteiiniosasta (**Kuva 6**) (Waldhoer ym. 2004; Al-Hasani ja Bruchas 2011). Gi/o-proteiini vähentää cAMP:n muodostumista estämällä adenylaattisyklaasi-entsyymin (AC) toimintaa. Lisäksi se sulkee jänniteriippuvaisia Ca^{2+} -kanavia ja aktivoi jänniteriippuvaisia K^{+} -kanavia. Tästä seuraa K^{+} -ionien ulosvirtaus, solukalvon hyperpolarisaatio ja vähentynyt neuronaalinen eksitaatio. Lisäksi KOR aktivaatio aikaansaa p38MAPK-fosforylaatiota (Bruchas ym. 2007).



Kuva 6. Salvinoriini A:n kohdereseptori on inhibitorisen Gi/o-proteiiniosan sisältävä kappa-opioidireseptori. Gi/o-proteiini estää cAMP-välitteistä viestiketjua, salpaa Ca^{2+} -kanavia ja avaa K^{+} -kanavia aiheuttaen solukalvon hyperpolarisaation (Waldhoer ym. 2004).

Opioidireseptoreja aktivoivat endogeeniset eli elimistön itse tuottamat opioidit muodostuvat ja varastoituvat elimistöön niiden inaktiivisina esiasteproteiineina (Waldhoer ym. 2004). KOR-ligandina toimivia dynorfiineja tunnetaan kuusi erilaista,

joiden kaikkien esiasteena toimii prodynorfiini (Schwarzer 2009). Ihmisaivoissa prodynorfiinia ilmentävän *PDYN* geenin mRNA:ta löytyy erityisesti tunteiden säätelyä ja stressiä käsitteleviltä alueilta, kuten hippokampuksesta ja amygdalasta (Hurd 1996).

Dynorfiinien erityis lisääntyy stressin seurauksena (Land ym. 2008). Kortikotropiinia vapauttavan hormonin (CRH) ohella dynorfiini on elimistön tärkeimpiä stressin vaikutuksia viestiviä välittäjäaineita. Akuutisti stressaavassa tilanteessa sen vaikutus todennäköisesti parantaa selviytymismahdollisuuksia: dynorfiini-KOR järjestelmän aktivaatio poistaa kivun tunnetta ja herättää aversiivisen tarpeen poistua paikalta (Knoll ja Carlezon 2010). Aversiolla tarkoitetaan vastenmielisyyden tunnetta ja siitä seuraavaa välttämiskäyttäytymistä. Kroonisessa stressissä dynorfiini-KOR -järjestelmän jatkuvalla aktivaatiolla on todennäköisesti haitallisia vaikutuksia. Stressin ja masennuksen yhteisvaikutuksia voidaan kuvailla noidankehänä, jossa krooninen tai voimakas akuutti stressi altistaa masennukselle ja masentunut ihminen ajautuu sairautensa vuoksi tervettä henkilöä useammin stressaaviin tilanteisiin (Hammen 2005).

Masennuksen eläinmalleissa dynorfiini-KOR -järjestelmän aktivaatio johtaa yleensä prodepressiiviseen käyttäytymiseen (Mague ym. 2003; Carlezon 2006). KOR-antagonismi sen sijaan vähentää aversiota: toistuvien stressaavien tilanteiden aiheuttama paikka-aversio poistui hiiriltä, joille annettiin KOR-antagonistia tai jotka olivat prodynorfiini-poistogeenisiä (Land ym. 2008). Eläintutkimusten perustella KOR-reseptorien aversiiviset vaikutukset välittyvät osittain tai kokonaan p38MAPK-signaaloinnin kautta (Bruchas ym. 2007).

4.2.3 Käyttäytymistutkimukset

Salvinoriini A:lla on havaittu eläimillä suoritetuissa käyttäytymistutkimuksissa sekä anti-että prodepressiivisiä vaikutuksia. Carlezon työryhmineen (2006) suorittamassa pakotetussa uintiestissä 0,25–2 mg/kg i.p. annos salvinoriini A:ta lisäsi Sprague-Dawley rottien prodepressiivistä käyttäytymistä. Braidan työryhmineen (2009) samanlaisella pakotetun uintitestin protokollalla suorittamassa tutkimuksessa 0,001–1000 µg/kg s.c. annokset aiheuttivat päinvastaisesti antidepressiivistä käyttäytymistä. Lisäksi salvinoriini A toimi anksiolyyttisesti eli ahdistusta vähentävästi kohotetussa ristikko-sokkelo

(elevated plus maze) -testissä. Antidepressiivisyyteen viittaavia tuloksia on saatu myös masennuksen anhedoniaa eli mielihyvän puutetta kuvaavassa käyttäytymismallissa, jossa päivittäinen 1 mg/kg i.p. annos salvinoriini A:ta kumosi kroonisen stressin aiheuttaman sakkaroosimieltymyksen vähenemisen Long-Evans -rotilla (Harden ym. 2012).

Eläintutkimusten perusteella salvinoriini A:n anti- ja prodepressiivisyydet vaikuttavat mahdollisesti annoksesta riippuvaisista. Selkeä annosriippuvuus havaitaan ehdollistetun paikkahakuisuuden tutkimuksissa (CCP, conditioned place preference). 0,1–40 µg/kg annokset lisäsivät rottien paikkahakuisuutta, kun taas 160 µg/kg annos aiheutti aversiota (Baird ym. 2008). Vastaavasti seeprakaloilla 0,2–0,5 µg/kg annokset aiheuttivat salvinoriini A:ta suosivaa käytöstä, 1 µg/kg annos ei vaikuttanut paikkahakuisuuteen ja suuri 80 µg/kg annos aiheutti aversiota (Baird ym. 2007).

4.3 Lääkinnällinen ja hengellinen käyttö

S. divinorum on käytetty perinteisesti Meksikolaisen alkuperäiskansan Mazatecien pyhissä rituaaleissa, selvännäkemisessä ja parantamisessa (Wasson 1962). “Ska maria pastora” tai “Hojas de la pastora” eli Paimentytö Marian lehdet -nimellä tunnettua kasvia pidettiin feminiinisyyden sekä neitsyt Marian maallisenä ilmentymänä (Wasson 1962; Valdés ym. 1983). Kasvi yhdistettiin vesielementtiin, eikä sitä tämän vuoksi annosteltu koskaan polttamalla. Perinteisesti *S. divinorum* nautittiin pureskelemalla tuoreita lehtiä tai juomalla niistä puristettua mehua (Valdés ym. 1983; Siebert 1994). Oraalisesti imeytyvän Salvinoriini A:n määrä on pieni ja kasvia pidettiinkin virheellisesti psykedeelista heikoimpana (Valdés ym. 1983). *S. divinorum* käytettiin pieninä annoksina yliluonnollisten ongelmien, kuten kirousten poistamisen lisäksi myös erilaisten fyysisten sairauksien hoitoon. Vain muutamasta lehtiparista valmistetulla juotavalla hauteella voitiin hoitaa pääkipua, nivelreumaa, ripulia sekä muita suoliston vaivoja. Selvännäkemiseen käytettävät *S. divinorumin* annokset saattoivat olla monikymmenkertaisia ja sisältää 30–50 lehtiparia (Wasson 1962; Valdés ym. 1983)

Poltettu *Salvia divinorum* aiheuttaa lyhytkestoisia, voimakkaita muutoksia aistimuksissa ja mielialassa, sekä mahdollisia visuaalisia hallusinaatioita (Siebert ym. 1994; Baggott

ym. 2004; González ym. 2006). Muihin psykedeelisiin verrattuna *Salvia divinorumin* aiheuttamalle psykedeelisellemme kokemukselle erityisen tyypillistä on derealisaatio tai depersonalisaatio, eli ympäristön tai oman itsensä tunteminen ulkopuoliseksi tai vieraaksi. Henkilö on usein kyvytön vuorovaikutukseen ympäristönsä kanssa. Roth työryhmineen (2004) kuvaili kokemusta spatiotemporaaliseksi dislokaatioksi; tilaksi jossa ajan virtaava rakenne hajoaa, menneisyys ja tulevaisuus sulautuvat yhteen ja henkilö kokee siirtyvänsä toiseen paikkaan tai olevansa useassa paikassa samanaikaisesti.

Eläintutkimusten tapaan salvinoriini A:sta löytyy sekä anti- että prodepressiivisyyteen viittaavia tutkimustuloksia myös ihmisillä. Baggott työryhmineen (2004) suorittamassa internet-kyselyssä 25,8 % *Salvia divinorum* -kasvin viihdekäyttäjistä raportoi yli 24 tuntia kestäviä positiivisia vaikutuksia, kuten lisääntynyttä hyvinvoinnin tunnetta. 4,4 % käyttäjistä raportoi pitkäkestoisia negatiivisia vaikutuksia ja 0,6 % tutkimukseen osallistuneista oli hakenut ammattiapua salvinoriinin käytöstä johtuviin ongelmiin. Vuosina 2006–2008 Amerikassa suoritettun kansallisen terveystutkimuksen mukaan *S. divinorum* viihdekäyttäjät olivat olleet kuluneen vuoden aikana todennäköisemmin masentuneita, kuin henkilöt jotka eivät olleet käyttäneet kasvia (Wu ym. 2011). Kyselyn mukaan viihdekäyttäjät käyttivät suurella todennäköisyydellä myös muita päihteitä, joiden osallisuutta masennuksen ilmenemiseen ei voida poissulkea.

S. divinorumin käytöstä masennuksen hoidossa löytyy yksittäisiä tapauskuvauksia. Ensimmäisessä tapauskuvauksessa hoitoresistenttiä masennusta sairastava potilas saavutti remission nauttimalla oraalisesti 2–3 *Salvia divinorum* -kasvin lehteä (0,5–0,75 g) noin kolme kertaa viikossa (Hanes 2001). Hoitoprotokolla esiteltiin edelleen kuudelle hoitoresistenttiä tai toistuvaa masennusta sairastavalle potilaalle, joista suurin osa kertoi saaneensa pitkäaikaista hyötyä kasvin käytöstä (Hanes 2003).

OSA II: KOKEELLINEN OSA

5 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tämän Pro gradu -tutkielman tarkoituksena on selvittää salvinoriini A:n vaikutusta aivojen masennuslääkevasteeseen yhdistettyihin molekulaarisiin muutoksiin tutkimalla aikuisilla hiirillä:

- 1) TrkB-GSK3 β viestiketjun proteiinien fosforylaatiota
- 2) Aktiivisuudesta riippuvien välittömien-aikaisten geenien mRNA:n määrää

Lisäksi salvinoriini A:n akuutteja vaikutuksia tarkasteltiin tutkimalla hiirten lokomotorista aktiivisuutta.

6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

6.1 Eläimet

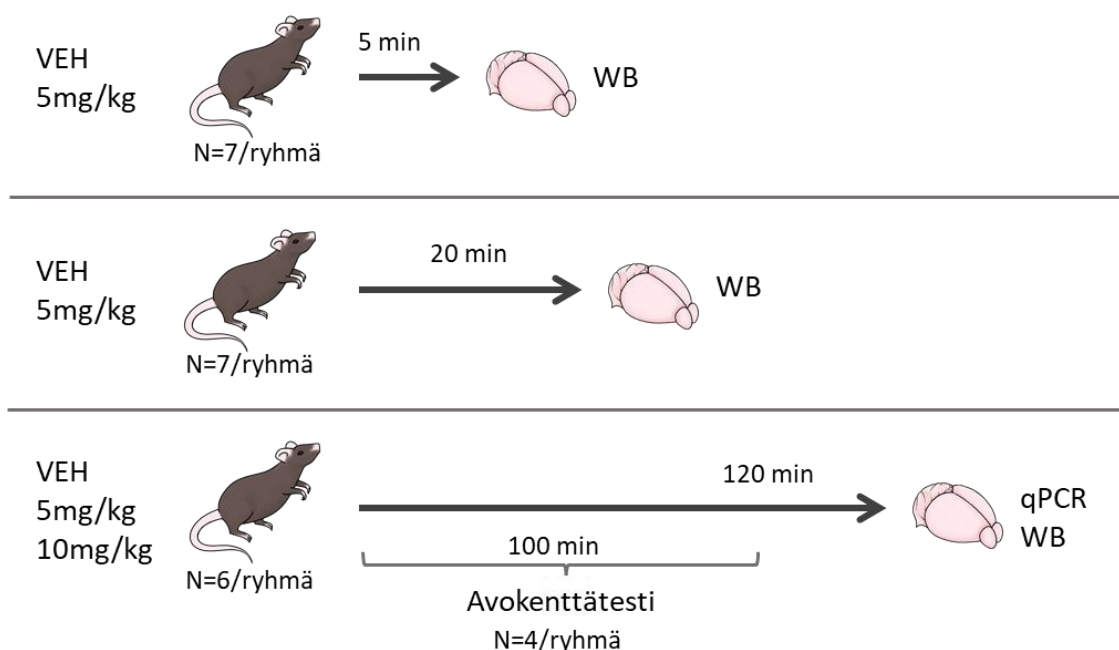
Kokeissa käytettiin C57BL/6 kannan uroshiiriä (Harlan Laboratories, Venray, Alankomaat). Eläimet olivat tutkimushetkellä 8–11 viikon ikäisiä ja painoivat 25–34 g. Hiiriä pidettiin 12/12 tunnin valorytmissä (valot päällä 6.00–18.00) ja valvotuissa ympäristöolosuhteissa (21 °C, ilmankosteus 40 %) Helsingin yliopiston koe-eläinkeskuksen Viikin toimintayksiköissä. Ruokapellettejä ja vettä oli saatavilla *ad libitum*. Eläimiä pidettiin 2–8 hiiren häkkikunnissa. Eläintutkimukset suoritettiin Neurotieteen yhdistyksen (the Society for Neuroscience) ohjesääntöjen mukaisesti ja niille oli myönnetty lupa Etelä-Suomen Aluehallintovirastolta.

6.2 Käsittelyt

Salvinoriini A (Jordi Riba, Hospital De St. Paul, Barcelona) liuotettiin joko DMSO/Tween-80/fysiologinen suolaliuos -liuokseen (3:3:14) niin, että injektion tilavuus oli 10 μ l/g tai 100 % DMSO:n jolloin injektoitava tilavuus säädettiin 1 μ l/g (i.p.).

Vehikkelinä käytettiin samaa liuosta, mihin salvinoriini A oli kussakin kokeessa liuotettu. Salvinoriini A tai vehikkeli annosteltiin hiirille intraperitoneaalisenä (i.p.) injektiona.

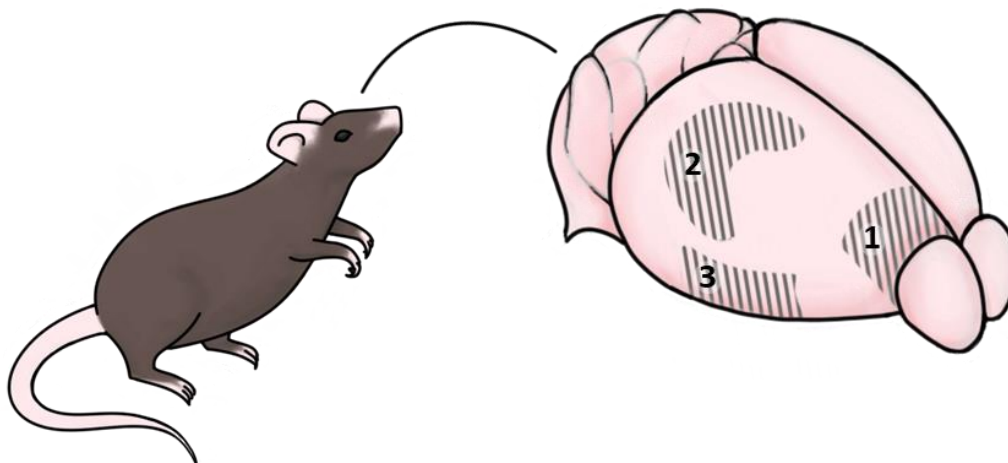
Tutkimuksessa käytettiin yhteensä 46 hiirtä (**Kuva 8**). Salvinoriini A:n vaikutusta masennuslääkevasteeseen yhdistettyjen proteiinien fosforylaatioon hiiren aivoissa tutkittiin Western Blot menetelmän avulla kolmessa eri aikapisteessä: 5, 10 ja 120 minuutin kohdalla annostelusta. Käytetyt salvinoriini A:n annokset olivat 5 mg/kg 5 ja 10 minuutin aikapisteissä (N=7/ryhmä) sekä 5 mg/kg ja 10 mg/kg 120 minuutin aikapisteessä (N=6/ryhmä). 120 minuutin aikapisteessä otettuja näytteitä käytettiin myös qPCR analyysiin. Lokomotorinen aktiivisuus videoitiin 100 minuutin ajalta yhteensä 12 hiireltä (N=4/ryhmä). Kaikki hiiret siirrettiin salvinoriini A:n tai vehikkelin annostelun jälkeen pois niiden kotihäkeistä, jotta tulokset olisivat vertailukelpoisia avokenttätestiin osallistuneiden hiirien kanssa.



Kuva 8. Tutkimuksessa käytetyt eläimet ja niiden saamat käsittelyt. Hiirille annosteltiin joko salvinoriini A:ta (5 mg/kg ja 10 mg/kg) tai vehikkeliä (VEH) i.p. injektiona. Eläimet lopetettiin 5, 20 tai 120 minuutin kuluttua annostelusta. Kerättyjä aivonäytteitä tutkittiin Western blot (WB) ja qPCR menetelmillä.

6.3 Näytteenotto

Hiiret lopetettiin niskanmurrolla. Nukutusaineita ei käytetty, sillä ne vaikuttavat tutkittujen proteiinien fosforylaatioon (Kohtala ym. 2016). Niskanmurron jälkeen hiirten aivot poistettiin ja upotettiin jääkylmään fosfaattipuskuroituun keittosuolaliuokseen (PBS) noin 10 sekunnin ajaksi. Aivoista leikattiin mediaalinen etuaivokuori (PFC), hippokampus (HC) ja mediaalitemporaalilohko (MTL) kuvan osoittamalla tavalla molemmilta aivopuoliskoilta (**Kuva 7**). Työskentely suoritettiin jäiden päällä olevalla viileällä alustalla ja leikatut kudokset jäädettiin laskemalla ne kuivajäähän upotetulle metallilevylle. Näytteet siirrettiin 1,5 ml Eppendorf-putkiin siten, että eri aivopuoliskoilta otetut palat olivat joko unilateraalisina omissa putkissaan tai bilateraalisisa samassa putkessa. Näytteet säilytettiin -80 °C ennen jatkokäsittelyä.



Kuva 7. Hiiren aivoista eristettiin mediaalinen etuaivokuori (1), aivokuoren alla sijaitseva hippokampus (2) sekä mediaalitemporaalilohko (3) kuvan osoittamalla tavalla.

6.4 Western Blot

6.4.1 Näytteenkäsittely ja proteiinkonsentraation määrittäminen

Proteiinit eristettiin kudostenäytteistä käyttämällä proteaasi- ja fosfataasi-inhibiittoreita (Pierce™ Protease/Phosphatase Inhibitor Mini Tablets, Thermo Scientific) sisältävää NP-lyysispuskuria (liite 1). Bilateraalisiin tai unilateraalisiin etuaivokuorinäytteisiin käytetty puskurin määrä oli 150 ja 300 µl ja hippokampusiin 250 ja 500 µl. Mediaalitemporaalilohkon unilateraalisiin näytteisiin käytettiin 100–125 µl puskuria.

NP-puskuri pipetoitiin Eppendorf-putkeen syväjäädetytyn kudoksenäytteen päälle ja näyte homogenisoitiin välittömästi muovisen survimen avulla. Homogenisoidut näytteet pidettiin koko työskentelyn ajan jäällä. NP-lyysispuskurin annettiin vaikuttaa 15 minuuttia, jonka jälkeen näytteet sentrifugoitiin (16100 g, 15 min, +4 °C) ja supernatantti kerättiin talteen. Liukenematon materiaali, kuten lipidit ja solumembraani jäävät sentrifugoinnissa syntyneeseen pellettiin, kun taas liukoiset proteiinit (tutkittava näyte) ovat supernatantissa. Tutkittavat näytteet siirrettiin säilytettäväksi -80 °C ennen jatkokäsittelyä.

Näytteiden proteiinikonsentraation määrittämiseen käytettiin kaupallista DC™ Protein Assay -pakkausta (Bio-Rad), joka perustuu Lowryn menetelmään (Lowry ym. 1951). Menetelmässä näytteen sisältämä proteiini reagoi emäksisen kuparitartraattiliuoksen kanssa ja pelkistää Folin-Ciocalteu -reagenssin värilliseksi lopputuotteeksi, jolloin proteiinikonsentraatio voidaan mitata kolorimetrisesti. 5 µl proteiininäytettä laimennettiin ionivaihdetulla vedellä 1:5 ja laimennetut näytteet pipetoitiin triplikaatteina 96-kuoppalevylle (5 µl/kaivo). Standardisuoran tekemiseen käytettiin ionivaihdettuun veteen laimennettua 2 mg/ml naudan seerumialbumiiniiliuosta (Protein Standard II, Bio-Rad). Emäksinen kuparitartraattiliuos (Reagent A), surfaktantti (Reagent S) ja Folin-Ciocalteu -reagenssi (Reagent B) sekoitettiin DC™ Protein Assay -pakkauksen ohjeiden mukaisesti. Näytteet ja standardisuora pipetoitiin 96-kuoppalevyn kaivoihin ja levy asetettiin levyravistelijalle 10–15 minuutin ajaksi. Kaivojen absorbanssi 750 nm aallonpituudella mitattiin Victor-kuoppalevynlukijalla (Perkin Elmer) ja näytteiden proteiinikonsentraatio laskettiin sijoittamalla niiden absorbanssi standardisuoralle.

6.4.2 SDS-PAGE-elektroforeesi ja Western blot -siirto

Näytettä pipetoitiin 40 µg proteiinia sisältävä määrä 1,5 ml Eppendorf-putkiin, joihin oli lisätty valmiiksi sama mikrolitramäärä kaksinkertaista Laemmli-näytepuskuria (2x Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad). Näytepuskurin sisältämät merkaptotaetanolit ja natriumlauryylisulfaatti (SDS) denaturoivat proteiinit niiden primäärirakenteiksi. Proteiineihin sitoutuva SDS aikaansaa negatiivisen varauksen, joka mahdollistaa proteiinien erottelun sähkövirran avulla. Laemmliä sisältäviä näytteitä kuumennettiin 3 minuutin ajan 100 °C (Digital Heat block, VWR) ennen geelille ajoa.

SDS-PAGE -geelin (4–12 % Bis-Tris, NuPage™, Thermo Fisher) kaivot puhdistettiin ajopuskurilla (liite 1) ja näytteet sekä proteiinistandardi (Bio-Rad Dual Color) pipetoitiin kaivoihin. Elektroforeesi ajettiin 180 V jännitteellä noin 1 tunnin ajan, kunnes kaikki proteiinistandardin molekyylipainot olivat erottuneet selkeästi. Sekä elektroforeesiin että Western blot -siirtoon käytettiin PowerPac™ Basic -virtalähdettä (Bio-Rad). Molekyylipainonsa mukaan geelille erottuneet proteiinit siirrettiin Western Blot -siirrossa eli transferissa polyvinyyliideenifluoridi-kalvolle (PVDF-kalvo, Amersham Hybond, pore size: 0,45 µm). Kalvo esikäsiteltiin metanolilla, ja siirtokasetti kasattiin wet transfer -metodilla siirtopuskuria (liite 1) sisältävässä astiassa. Ajokammioon laitettiin kylmävaraaja ja sitä pidettiin jäällä täytetyssä polystyreenilaatikossa siirron ajan (300 mA, 1 h, +4 °C). Western Blot -siirron jälkeen kalvoja eli membraaneja säilytettiin TBS-liuoksessa +4 °C.

6.4.3 Immunoblottaus

Immunoblottaus perustuu proteiinien tunnistamiseen niihin spesifisesti sitoutuvien vasta-aineiden avulla. Vasta-aineiden epäspesifisten sitoutumispaikkojen peittämiseen käytettiin blokkauслиuosta (3 % BSA, liite 1), jossa membraaneja inkuboitii keinuttajalla (Digital rocker, Thermo Fisher) huoneenlämmössä tunnin ajan. Primaarivasta-aineet (1:1000–5000) laimennettiin blokkauслиuokseen, johon lisättiin natriumatsidia (1:1000) säilyvyyden parantamiseksi (Taulukko 1). Vasta-aine tunnistaa halutun kohdeproteiinin PVDF-kalvolta ja muodostaa sen kanssa kompleksin. Membraaneja inkuboitii primaarivasta-aine laimennoksessa yön yli (keinuttaja, +4°C). Sen jälkeen membraanit pestiin neljä kertaa TBST:llä (50–200 ml, 10–15 min) ja niitä inkuboitii 5 % maitojauheliuokseen (5 % NFDM, liite 1) laimennetussa sekundaarivasta-aineessa (1:10000) tunnin ajan huoneenlämmössä (keinuttaja). Sekundaarivasta-aine tunnistaa sen eläinlajin proteiineille tyypillisiä rakenteita, jossa primaarivasta-aine on valmistettu. Tässä tutkimuksessa käytetty sekundaarivasta-aine on konjugoitu piparjuuriperoksidaasin (HRP) kanssa, ja sen merkitsemät proteiinit voidaan havainnoida eli detektoida kemiluminesenssitekniikan (ECL) avulla. ECL-substraatti reagoi HRP:n kanssa muodostaen akridiiniestereitä, joiden kemiluminesenssia tuottavaa reaktiota peroksidaasi katalysoi. Proteiininäytteiden emittoima valo kuvannettiin

kemiluminesenssidetektolaitteella (Bio-Rad ChemiDoc) ja sen intensiteetti analysoitiin ImageJ-ohjelmalla.

Taulukko 1. Immunoblottauksessa käytetyt primääri- ja sekundäärivasta-aineet, eläimet jossa ne on tuotettu sekä niiden valmistajat. Fosforyloitava aminohappotähde tyrosiini- (Tyr), seriini- (Ser) tai treoniini (Thr).

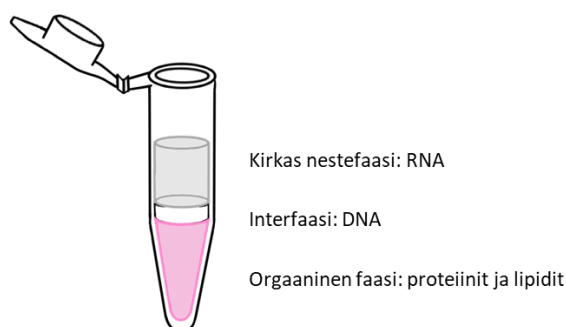
Tyyppi	Vasta-aineen kohde	Tuottajaeläin	Laimennos	Valmistaja
Primäärivasta-aine	pTrkb (Tyr816)	Kani	1:1000	CST #4168
	Trkb	Kani	1:1000	CST #4603
	pGSK3 β (Ser9)	Kani	1:1000	CST #9336
	GSK3 β	Kani	1:2000	CST #9315
	p-p70s6k (Thr421/Ser424)	Kani	1:1000	CST #9204
	p70s6k	Kani	1:1000	CST #2708
	p-p44/42MAPK (Thr202/Tyr204)	Hiiri	1:1000	CST #9106
	p44/41MAPK	Kani	1:1000	CST #9102
	p-CREB (Ser133)	Kani	1:1000	CST #9191
	CREB	Kani	1:1000	CST #9197
	Arc	Kani	1:1000	CST #38916
	GAPDH	Kani	1:5000	CST #2118
Sekundäärivasta-aine	Kani IgA	Vuohi	1:10000	Bio-Rad
	Hiiri IgA	Vuohi	1:10000	Bio-Rad

6.5 RT-qPCR

6.5.1 RNA:n eristys

RNA eristettiin guanidiinitiosyanaatti-fenoli-kloroformi ekstraktion avulla (Chomczynski ja Sacchi 1987). Kudosnäytteet sisältäviin 1,5 ml Eppendorf-putkiin lisättiin nukleoproteiinikompleksien hajottamiseksi 500 μ l fenolista TRIzol reagenssia (Thermo Fisher) ja näytteet homogenisoitiin manuaalisesti muovisen survimen avulla. Näytteitä inkuboitin huoneenlämmössä 5 minuuttia, jonka jälkeen niihin lisättiin 100 μ l kloroformia ja syntyneet faasit sekoitettiin koeputkiravistelijan avulla. Sekoitettujen näytteiden annettiin olla huoneenlämmössä 5 minuuttia ennen sentrifugointia (12 000 g,

15 min, +4 °C). Sentrifugoinnissa RNA:n sisältävä kirkas nestefaasi erottuu alemmista orgaanisista faaseista, joihin jäävät DNA, rasvat ja proteiinit (**Kuva 9**). Vesifaasi pipetoitiin uuteen Eppendorf-putkeen, johon lisättiin 100 µl isopropanolia RNA:n saostamiseksi. Näyte sekoitettiin koeputkiravistelijalla ja siirrettiin jälle 10 minuutiksi ennen sentrifugointia (12 000 g, 10 min, +4 °C). Sentrifugoinnin jälkeen saostunut RNA-pelletti havaitaan putken pohjalla valkoisena tai geelimäisenä kappaleena. Supernatantti poistettiin pipetoimalla ja näyte pestiin kahdesti etanolilla: pelletin päälle lisättiin 1 ml nukleaasivapaaseen eli nukleiinihappoja hajottavia enstyymejä sisältämättömään veteen laimennettua etanolia (75 %), näyte sentrifugoitiin (12 000 g, 15 min, +4 °C) ja supernatantti poistettiin. Toisen pesun jälkeen supernatantti poistettiin mahdollisimman tarkasti ja RNA-pelletin annettiin kuivua avonaisessa Eppendorf-putkessa 5–10 minuuttia, tai kunnes kaikki etanoli oli haihtunut. Kuivattamisen jälkeen pelletti liuotettiin 30–50 µl nukleaasivapaata vettä. RNA-näytteitä kuumennettiin (60 °C, 10 min), jonka jälkeen ne varastoitiin jatkokäsittelyä varten -80 °C.



Kuva 9. Fenoli-kloroformi eristyksessä RNA erottuu päällimmäiseen kirkkaaseen nestekerrokseen, DNA jää kesimmäiseen maitomaiseen interfaasiin ja proteiinit sekä lipidit pohjimmaiseen orgaaniseen faasiin.

6.5.2 RNA-pitoisuus ja näytteiden puhtaus

Näytteiden RNA-pitoisuus (ng/µl) mitattiin niiden absorbanssia mittaavalla Nanodrop2000-spektrofotometrillä (Thermo Fisher). Aallonpituudella 260 nm mitattu absorbanssi ($A_{260\lambda}$) kertoo näytteen sisältämistä nukleiinihapoista ja laite käyttää tätä arvoa RNA-pitoisuuden laskemiseen. Näytteen puhtaus voidaan arvioida vertaamalla

$A_{260\lambda}$ -arvoa mahdollisten kontaminaatioiden absorbanssiin. TRIzol-reagenssin sisältämä fenoli ja guanidiinitiosyanaatti, sekä RNA-pelletin pesuun käytettävä etanoli absorboivat valoa aallonpituudella 230 nm ($A_{230\lambda}$). Proteiinikontaminaatio havaitaan aallonpituuden 280 nm absorbanssina ($A_{280\lambda}$). Puhtaassa näytteessä nukleiinihapoista ja kontaminaatioista kertovien aallonpituuksien absorbanssien suhde on mahdollisimman lähellä kahta. Käyttökelpoisessa näytteessä $A_{260\lambda}/A_{230\lambda} > 1,7$ ja $A_{260\lambda}/A_{280\lambda} \approx 1,8 - 2,2$.

6.5.3 cDNA synteesi

RNA käännettiin komplementaariseksi DNA:ksi kaupallisen cDNA synteesipakkauksen avulla (Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase, Thermo Fisher). RNA-näytteitä, reagensseja ja nukleaasivapaata vettä pidettiin jäällä koko työskentelyn ajan. 500 ng RNA-templaattia sisältävä määrä kutakin näytettä pipetoitiin 96-kuoppaisen PCR-levyn kaivoihin. Näytteiden tilavuus säädettiin samaksi lisäämällä nukleaasivapaata vettä *ad* 10 μ l. Sarjan viimeinen näyte pipetoitiin kahteen eri kaivoon, joista toista käytettiin negatiivikontrollina. Kontrollisuoraa varten näytteet 1-8 pipetoitiin samoin kahdesti. Jäännös-DNA:n pilkkomiseksi jokaiseen näytettä sisältävään kaivoon lisättiin 2 μ l dsDNase-entsyymien ja -puskurin seosta (1:1). Entsyymi hajottaa kaksijuosteisen DNA:n fosfodiesterisidoksia, pilkkoen näytteeseen mahdollisesti jääneen DNA:n ilman vaikutusta RNA:han tai yksijuosteiseen cDNA:han. PCR-levy peitettiin, näytteet sekoitettiin koeputkiravistelijalla ja levy sentrifugoitiin nopeasti. Näytteitä inkuboitiin 37 °C 10 minuuttia, sillä entsyymi toimii tehokkaimmin tässä lämpötilassa. Sekä inkubointiin että cDNA-synteesiin käytettiin Thermal Cycler PCR -laitetta (Bio-Rad). Levyn annettiin viilentyä jäällä noin minuutin ajan. Maxima Enzyme mix -reaktioliuos (Thermo Fisher) sekoitettiin synteesipakkauksen ohjeiden mukaisesti. Liuos sisältää käänteistranskriptaasientsyymien, ribonukleaasi-inhibiittorin sekä alukkeita, joiden avulla RNA-templaatti saadaan syntetisoitua komplementaariseksi DNA-juosteeksi. Valmis reaktioliuos pipetoitiin kaikkiin muihin kaivoihin, paitsi kontrollikaivoon. Kontrollikaivoon lisättiin reaktioliuos ilman käänteistranskriptaasientsyymiä. cDNA-synteesi ajettiin PCR-laitteella asetuksin 10 minuuttia 25 °C, 30 minuuttia 55 °C ja 5 minuuttia 85 °C. Eri entsyymit toimivat parhaiten tietyissä lämpötiloissa, joten lämpötilaa vaihtamalla reaktio saadaan etenemään

oikeassa järjestyksessä alukkeiden kiinnittymisestä cDNA:n muodostumiseen ja lopuksi reaktioliuoksen inaktivointiin. Reaktion päätyttyä PCR-levy viilennettiin jäiden päällä ja näytteet sekä kontrollikaivo laimennettiin 1:10 nukleasivapaalla vedellä. Standardisuoraa varten pipetoituja näytteiden 1-8 duplikaatteja ei laimennettu, vaan ne koottiin ensin kaikki samaan kaivoon, josta muodostettiin standardisuoran antava sarjalaimennos. cDNA-templaattit sisältävä levy siirrettiin -20 °C odottamaan jatkokäsittelyä.

6.5.4 qPCR

Kvantitatiiviseen reaaliaikaiseen PCR:n (qPCR) käytettiin lämpöstabiilin DNA-polymeraasientsyymien sisältävää Maxima SYBR Green Master Mix 2X -liuosta (Thermo Scientific), johon lisättiin *GAPDH*, *BDNF IV* sekä *c-fos* -geenejä vastaavat etu- ja takalukkeet (Taulukko 2). Alukkeet sisältävä reaktioliuos pipetoitiin 384-kuoppaiselle PCR-levylle, jonka jälkeen kaivoihin lisättiin triprikaatteina cDNA-templaattit. Yhteen reaktioon käytettiin 6 µl reaktioliuosta ja 2 µl templaattia. Ilman käänteistranskriptaasia olevan näytteen lisäksi luotiin toinen negatiivikontrolli pipetoimalla jokaisen eri alukkeen kohdalle kolme kaivoa ilman cDNA-templaattia. Polymeerasiketjureaktio ajettiin 45 syklin ajan LightCycler® 480 -laitteella (Roche), joka mahdollistaa reaktion tarkastelun reaaliajassa.

Taulukko 2. qPCR-menetelmässä käytetyt alukkeet 5' – 3' ja niiden emäsjärjestys. Kaikki alukkeet on suunnitellut Dr. Wiebke Theilmann.

Nimi	Sekvenssi 5' – 3'
<i>BDNF IV</i> Fw	ACCGAAGTATGAAATAACCATAGTAAG
<i>BDNF IV</i> Rev	TGTTTACTTTGACAAGTAGTGACTGAA
<i>c-fos</i> Fw	CGGGTTTCAACGCCGACTA
<i>c-fos</i> Rev	TTGGCACTAGAGACGGACAGA
<i>GAPDH</i> Fw	GGTGAAGGTCGGTGTGAACGG
<i>GAPDH</i> Rv	ATGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG

6.6 Avokenttätesti

Hiiret tuotiin koehuoneeseen vähintään puoli tuntia ennen kokeen aloitusta. Eläimille annosteltiin vatsaontelonsisäisesti vehikkeliä, 5 mg/kg tai 10 mg/kg salvinoriini A:ta ja ne laitettiin välittömästi läpinäkyviin avokenttälaitteisiin (30 cm x 30 cm). Hiirien liike videoitiin ja analysoitiin Ethovision-ohjelmalla (Noldus).

6.7 Tilastollinen analyysi

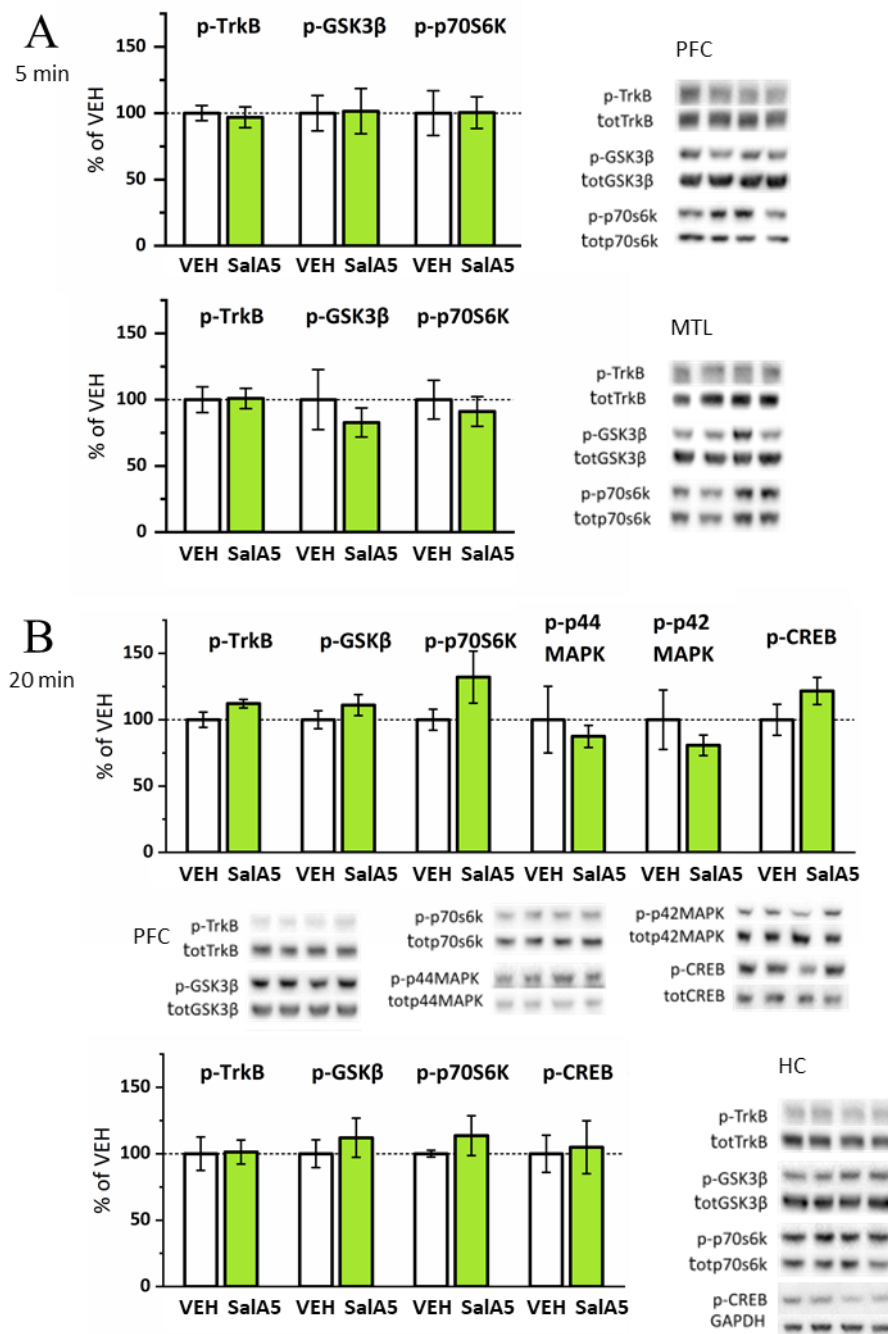
Tilastolliseen analyysiin käytettiin SPSS-ohjelmaa (IBM statistics, versio 27). Kahden toisistaan riippumattoman ryhmän testauksessa käytettiin paritonta t-testiä. Kolmen ryhmän testauksessa käytettiin Kruskal-Wallis H -analyysia ja Dunn's post hoc -testiä. Ei-parametrinen testi valittiin sen takia, ettei tulosten normaalijakautumista voida arvioida luotettavasti ryhmäkoon ollessa pieni. Tulokset joiden $p \leq 0,05$ tulkittiin merkitseviksi. Kuvaajat piirrettiin Origin-ohjelmalla (OriginLab, versio 2018b).

Western blot ja qPCR Tulokset normalisoitiin kokonaisproteiinin tai glyseraldehydi-3-fosfaatti -dehydrogenaasin (GAPDH) määrään. *GAPDH* on niin sanottu "housekeeping-gene", sillä sen ekspressio pysyy stabiilina vaihtelevissakin olosuhteissa.

7 TULOKSET

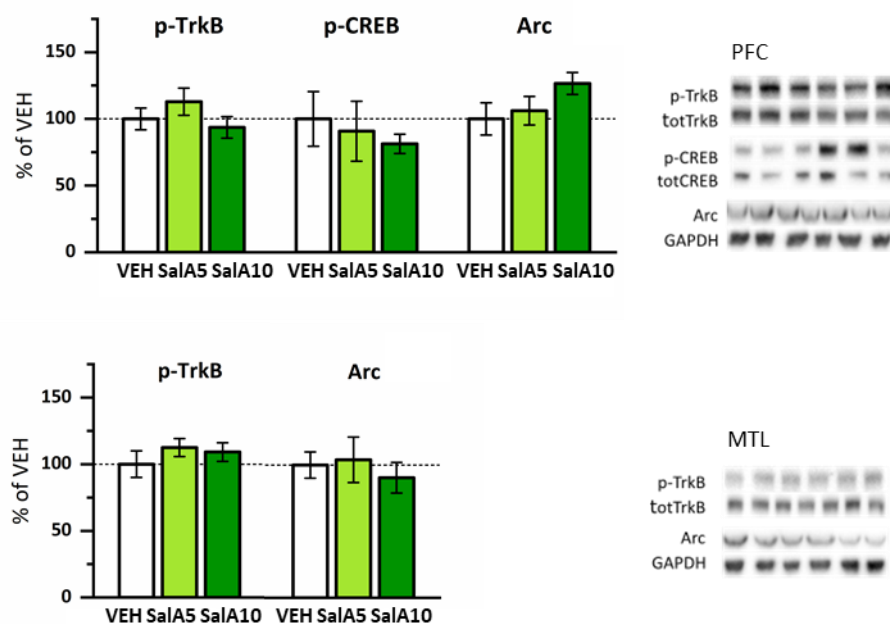
7.1 Salvinoviiri A:n vaikutukset TrkB - GSK3 β fosforylaatioon hiiren aivoissa

Salvinoriini A:n vaikutusta TrkB - GSK3 β fosforylaatioon tutkittiin Western blot -menetelmällä. Salvinoriini A (5 mg/kg) ei aiheuttanut muutosta hiiren etuaivokuoren TrkB, GSK3 β ja p70s6k -proteiinien fosforylaatioissa 5 tai 20 minuuttia i.p.annostelun jälkeen (**Kuva 10**, Liite 2). TrkB, GSK3 β ja p70s6k fosforylaatioissa ei havaittu muutoksia myöskään hippokampuksen (20 min) tai mediaalitemporaalilohkon (5 ja 120 min) alueilla. Etuaivokuoren p44/42 MAPK ja CREB sekä hippokampuksen CREB -fosforylaatio 20 minuuttia annostelun jälkeen pysyi samoin muuttumattomana.



Kuva 10. 5 mg/kg Salvinoriini A (SalA5) verrattuna vehikkeliin (VEH) ei aiheuta muutoksia etuaivokuoren (PFC) ja mediaalitemporaalilohkon (MTL) TrkB, GSK3β ja p70S6K -fosforylaatiossa 5 minuuttia (**A**) tai etuaivokuoren ja hippokampuksen TrkB, GSK3β, p70S6K ja CREB -fosforylaatiossa 20 minuuttia (**B**) i.p. annostelun jälkeen hiirillä (N=7). Fosforyloituneet proteiinit on normalisoitu totaali proteiineihin. Näytteiden järjestys kuvissa VEH-SalA-VEH-SalA. Virhe esitetty $\pm$ S.E.M.

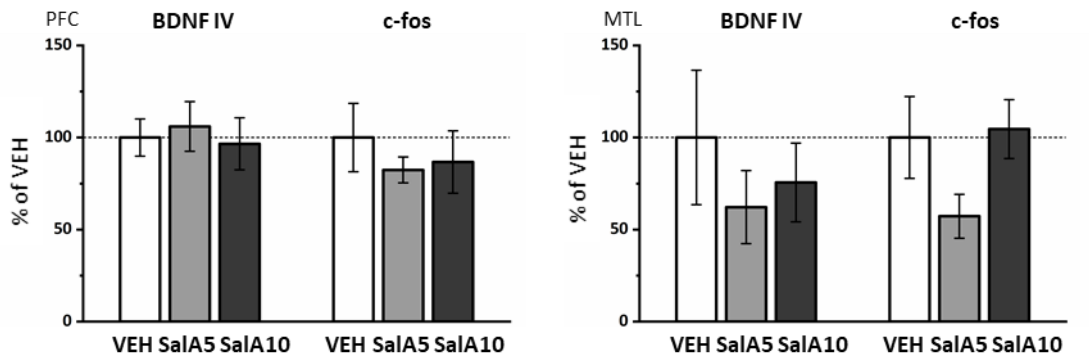
TrkB ja Arc -proteiinien fosforylaatioissa hiiren etuaivokuorella tai mediaalitemporaalilohkossa ei havaittu muutoksia 120 minuuttia 5 mg/kg tai 10 mg/kg Salvinoriini A:n i.p. annostelun jälkeen (**Kuva 11**). Muutoksia ei havaittu myöskään samassa aikapisteessä tutkitun CREB-proteiinin fosforylaatioissa etuaivokuorella.



Kuva 11. 5 mg/kg ja 10 mg/kg Salvinoriini A (SalA5, SalA10) verrattuna vehikkeliin (VEH) ei aiheuta muutoksia etuaivokuoren (PFC) tai mediaalitemporaalilohkon (MTL) TrkB, CREB tai Arc -fosforylaatioissa hiirillä 120 minuuttia i.p. annostelun jälkeen (N=6). Fosforyloituneet proteiinit on normalisoitu totaali proteiineihin tai GAPDH. Näytteiden järjestys kuvissa VEH-SalA5-SalA10-VEH-SalA5-SalA10. Virhe esitetty $\pm$ S.E.M.

7.2 Salvinoviiri A:n vaikutukset valikoituihin mRNA-transkripteihin

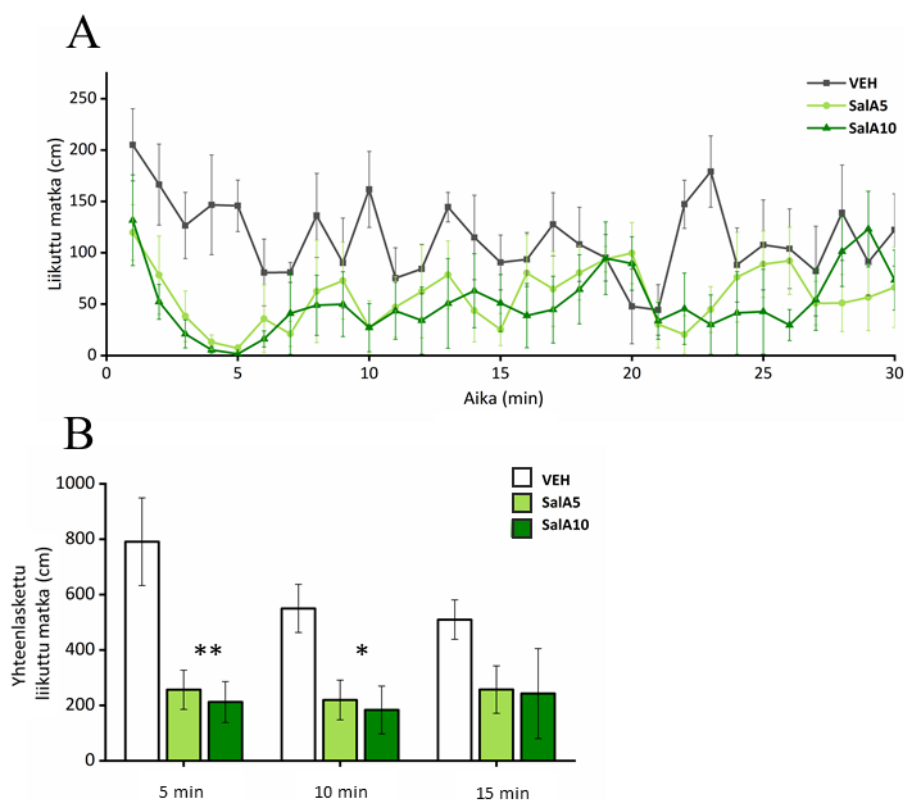
Salvinoriini A:n vaikutusta *BDNF IV* ja *c-fos* IEG mRNA -tasoihin tutkittiin qPCR-menetelmällä. Tulokset normalisoitiin *GAPDH* mRNA:n määrään. Salvinoriini A ei aiheuttanut tilastollisesti merkitsevää muutosta *BDNF IV* ja *c-fos* mRNA:n määrässä hiiren etuaivokuorella tai mediaalitemporaalilohkossa 120 minuuttia i.p. annostelun jälkeen (**Kuva 12**, Liite 3).



Kuva 12. 5 mg/kg ja 10 mg/kg Salvinoriini A (SalA5, SalA10) verrattuna vehikkeliin (VEH) ei aiheuta muutoksia etuaivokuoren (PFC) tai mediaalitemporaalilohkon (MTL) *BDNF IV* ja *c-fos* mRNA:n esiintymisessä hiirillä 120 minuuttia i.p. annostelun jälkeen (N=6). Normalisoitu *GAPDH*. Virhe esitetty $\pm$ S.E.M.

7.3 Salvinoviiri A:n vaikutus lokomotoriikkaan

Salvinoriini A:n vaikutusta lokomotoriikkaan tutkittiin avokenttätestin avulla. Hiirien liikettä analysoitiin 100 minuutin ajan, josta kuvassa on esitetty ensimmäiset 30 minuuttia (**Kuva 13**). Salvinoriini A aiheutti molemmissa koeryhmissä (5 mg/kg ja 10 mg/kg) tilastollisesti merkitsevän lokomotorisen aktiivisuuden vähenemisen 5 minuuttia ($p=0,0077$) ja 10 minuuttia ($p=0,0215$) annostelun jälkeen.



Kuva 13. Salvinoriini A 5 mg/kg (SalA5) ja 10 mg/kg (SalA10) verrattuna vehikkeliin (VEH) aiheuttaa hiirillä merkitsevän lokomotorisen aktiivisuuden vähenemisen 5 minuuttia ($p=0,0077$) ja 10 minuuttia ($p=0,0215$) i.p. annostelun jälkeen. $N=4$. Virhe esitetty $\pm$ S.E.M.

8 POHDINTA

8.1 Salvinoriini A:n vaikutus masennuslääkevasteeseen yhdistettyihin viestiketjuihin

Tämä tutkimuksen perusteella salvinoriini A ei aiheuta akuutteja muutoksia masennuslääkevaikutukseen yhdistettyjen signaalintiketujen proteiinien fosforylaatiossa hiiren etuaivokuorella, hippokampuksessa tai mediaalitemporaalilohkossa. Tuloksia tukee se, ettei muutoksia havaittu myöskään näiden signaalintiketujen seurauksena aktivoituvien välittömien-aikaisten geenien *BDNF*:n tai *c-fos*:n mRNA:n määrässä. Salvinoriini A:lla ei myöskään ollut vaikutusta synapsien rakennusaineena toimivan Arc-proteiinin määrään. Tässä tutkimuksessa käytettiin kuitenkin suhteellisen suuria salvinoriini A:n annoksia.

Salvia divinorum -kasvin aiheuttamat psykotomimeettiset vaikutukset ilmenevät jo hyvin pienillä, noin 200 µg salvinoriini A:ta vastaavilla annoksilla (Siebert ym. 1994, Hooker ym. 2008). Kehon pinta-alaa käyttävän muuntokaavan avulla laskettuna tämä vastaa hiirellä noin 2,5 mg/kg annosta (Reagan-Shaw ym. 2008). Eläintutkimuksissa antidepressiivisiä vaikutuksia aikaansaaneet annokset vastaavat ihmisillä annoksia, jotka eivät tyypillisesti aiheuta psykedeelistä kokemusta (Brida ym. 2009; Harden ym. 2012). Hanes (2001; 2003) julkaisemissa tapauskuvauksissa käytetyt *Salvia divinorum* -annokset olivat matalia ja hoitoprotokollaa voidaan kuvailla niin sanotuksi mikroannosteluksi.

Mikroannostelulla (engl. microdosing) tarkoitetaan hallusinogeenin toistettua tai säännöllistä käyttämistä annoksilla, jotka eivät aiheuta muutosta henkilön tajunnantilassa (Kuypers ym. 2019). Annokset ovat tyypillisesti noin 1:10 psykedeeliseen kokemukseen käytettävästä annoksesta. Mikroannostelun oletettu terapeutinen vaste liittyy kohentuneeseen mielialaan, lisääntyneeseen luovuuteen tai keskittymiskyvyn paranemiseen. Hutten työryhmineen (2020) suorittaman internet-kyselyn perusteella yleisimmät mikroannosteltavat hallusinogeenit olivat LSD (59,7 %) ja psilosybiini (57,8 %), kun taas salvinoriini A:ta käytti 2,8 % kyselyyn vastanneista. Kuten myös Haneksen (2001, 2003) protokollassa, vastaajat ilmoittivat käyttävänsä salvinoriini A:ta noin 2–3 kertaa viikossa. Yksittäisen annoksen vahvuudeksi arvioitiin keskimäärin 0,2 mg, mutta yli puolet vastaajista ei joko tiennyt käyttämänsä annosta tai jätti vastaamatta tähän kysymykseen. Annos on todennäköisesti arvioitu liian korkeaksi, sillä tutkimus ei eritellyt käyttäjiä annostelutavan (inhaloitu vs. oraalinen) perusteella tai selventänyt oliko kyse *Salvia divinorum* -kasvista vai puhtaasta salvinoriini A:sta.

Aiempien tutkimusten perusteella olisikin mielekästä tutkia salvinoriini A:n vaikutusta TrkB-GSK3β -viestiketjuun huomattavasti matalammilla annoksilla tai säännöllisessä mikroannostelussa. Eläintutkimuksissa antidepressiivistä käyttäytymistä aikaansaaneet annokset vastaavat hiirillä alle 2 mg/kg salvinoriini A:ta, matalimpien käytettyjen annosten ollessa vain muutamia mikrogrammoja (Brida ym. 2009; Reagan-Shaw ym. 2008; Harden ym. 2013). Mikroannostelua vastaavassa protokollassa salvinoriini A:n

annos voisi siis olla merkittävästi 2 mg/kg matalampi, annostelun tapahtuessa 2-3 kertaa viikossa.

8.2 Lokomotorisen aktiivisuuden väheneminen

Salvinoriini A:n aiheuttama nopeasti alkava, lyhytkestoinen lokomotorisen aktiivisuuden väheneminen korreloi salvinoriini A:n kineettisen profiilin kanssa. Visuaalisesti tarkasteltuna molempien salvinoriini A:ta saaneiden koeryhmien hiiret jähmettyivät paikoilleen lähes välittömästi annostelun jälkeen. Liikkumattomuus oli täydellistä, eikä esimerkiksi sukimista tai muuta videoanalyysin ulkopuolelle jäävää liikettä tapahtunut. Hiirillä ei myöskään esiintynyt salvinoriini A:n annostelun seurauksena pään nykimiskäyttäytymistä, jota esiintyy tyypillisesti serotonergisten psykedeelien annostelun yhteydessä (Hanks ja Gonzales-Maeso 2013). Lokomotorisen aktiivisuuden merkitsevä vähentyminen havaittiin molemmilla salvinoriini A:ta saaneilla ryhmillä (5 mg/kg ja 10 mg/kg), eikä näiden ryhmien välillä havaittu eroavaisuuksia. 22 minuutin kohdalla tapahtuva vehikkeliryhmän lokomotorisen aktiivisuuden lisääntyminen on mitä todennäköisimmin merkityksetön artefakti, joka johtuu pienestä ryhmäkoosta. Mittaustuloksissa ryhmien välillä ei havaittu enää eroavaisuuksia 25 min avokenttäkokeen aloittamisen jälkeen (Liite 5).

Tämän tutkimuksen tulos korreloi pääosin aiemmin julkaistujen tutkimusten kanssa. Rotilla tehdyssä tutkimuksessa 1–10 mg/kg i.p. annos salvinoriini A:ta aiheutti annosriippuvaisesti motorisia häiriöitä ja katalepsiaa eli paikoilleen jähmettymistä (Willmore-Fordham ym. 2007). Vastaava nopeasti annostelun jälkeen ilmenevä sedaation kaltainen tila on havaittu aiemmin reesusapinoilla tehdyssä tutkimuksessa 0,01–0,1 mg/kg annoksilla (Butelman ym. 2012). Paikkahakuisuustestissä aversiivista käyttäytymistä aiheuttavat 1 mg/kg ja 3,2 mg/kg annokset johtivat hiirillä lokomotorisen aktiivisuuden vähenemiseen (Zhang ym. 2005). Akuutti Salvinoriini A:n annostelu (2 mg/kg) esti kokaiinin lokomotorista aktiivisuutta lisäävän vaikutuksen rotilla (Chartoff ym. 2008). Motorista suorituskkyä mittaavassa verkkolevyn kääntämistestissä (inverted screen) 1 mg/kg ja 2 mg/kg annokset salvinoriini A:ta aiheuttivat häiriöitä hiirten motoriikassa ja hidastivat verkkolevyn yli kiipeämistä (Fantegrossi ym. 2005). *Salvia divinorum* aiheuttaa motorisia häiriöitä myös ihmisillä (Siebert ym. 1994). Braidia

työrymineen (2007) seerpakaloilla suorittaman tutkimuksen mukaan myös salvinoriini A:n lokomotoriset vaikutukset voivat olla annoksesta riippuvia: 0,1–0,2 µg/kg annokset vaikuttivat uimiskäyttäytymistä lisäten, kun taas 5–10 µg/kg annokset saivat kalat hidastamaan liikettään tai pysähtymään kokonaan. Muissa tutkimuksissa saaduista tuloksista poiketen Carlezon työryhmineen (2006) ei havainnut muutosta rottien lokomotoriikassa 0,125–2 mg/kg annoksilla, jotka aiheuttivat kuitenkin prodepressiivistä käyttäytymistä pakotetussa uintitestissä.

Lokomotorisen aktiivisuuden väheneminen oli merkitsevintä 5 minuuttia salvinoriini A:n annostelun jälkeen. Samassa aikapisteessä ei kuitenkaan havaittu muutosta masennuslääkevasteeseen yhdistettyjen proteiinien fosforylaatioissa. Salvinoriini A:n lokomotorista aktiivisuutta vähentävien vaikutusten taustalla onkin mahdollisesti täysin erillinen viestiketju. Aivojen dopaminerginen hermovälitys osallistuu olennaisesti motoristen toimintojen välittämiseen (Beninger 1983). Erilaisilla menetelmillä, kuten dopamiinireseptoriantagonistilla tai hermomyrkyn aikaansaamalla solutuholla aiheutettu dopaminergisen hermovälityksen estäminen johtaakin lokomotorisen aktiivisuuden vähenemiseen eläimillä. Zhang työryhmineen (2005) hiirillä suorittamassa mikrodialyysitutkimuksessa lokomotorista aktiivisuutta vähentävät salvinoriini A:n annokset aiheuttivat dopamiinin määrän vähentymistä aivojuovion (striatum) alueella. Soluilla tehdyn tutkimuksen perusteella salvinoriini A lisää dopamiinia synapsista pois kuljettavien dopamiinitransportterien aktivaatiota k-opioidireseptorin välityksellä (Kivell ym. 2014). Listos työryhmineen (2011) esittämän hypoteesin mukaan salvinoriini A:n suuret annokset ovat prodepressiivisiä ja johtavat dopaminergisen hermovälityksen sekä lokomotorisen aktiivisuuden vähenemiseen. Matalat annokset ovat päinvastaisesti antidepressiivisiä ja lisäävät dopaminergistä hermovälitystä sekä lokomotorista aktiivisuutta.

Salvinoriini A:n vähäisen vesiliukoisuuden vuoksi sen liuottamisessa jouduttiin käyttämään 15–100 % dimetyylisulfoksidia eli DMSO:ta. Yli 32 % pitoisuus DMSO:ta voi vaikuttaa hiiren lokomotoriikkaan sitä vähentävästi (Castro ym. 1995). Korkean DMSO-pitoisuuden vaikutusta tuloksiin ehkäistiin käyttämällä vehikkeleitä, jotka sisälsivät saman verran DMSO:ta kun kussakin tutkimuksessa käytetty Salviniini A -liuos.

8.3 KOR-antagonistit

Dynorfiini-KOR järjestelmä on läheisesti kytköksissä masennuksen patofysiologiaan ja onkin todennäköistä, että siihen perustuvia masennuksen hoitoja nähdään vielä tulevaisuudessa (Knoll ja Carlezon 2010). KOR-agonisti salvinoriini A ei tämän tutkimuksen perusteella aiheuta muutoksia *BDNF*:n mRNA:ssa, mutta KOR-antagonisti nor-binaltorpimiini on osoitettu lisäävän *BDNF* mRNA:n ekspressiota rotan hippokampuksessa yksi päivä aivokammionsisäisen annostelun jälkeen (Zhang ym. 2007). Pakotetussa uintitestissä nor-binaltorpimiini aikaansaa antidepressiivistä käyttäytymistä; havainto, joka on toistettu useilla eri KOR-antagonisteilla erilaisissa masennuksen eläinmalleissa (Mague ym. 2003; Zhang ym. 2007; Grimwood 2011; Falcon ym. 2016).

Osa eläinmalleissa lupaavasti suoriutuneista KOR-antagonisteista on myös edennyt kliinisiin faasi I-III -tutkimuksiin (Carlezon 2016; Li ym. 2016b). Erityisesti jo markkinoilla olevan buprenorfiinin käytöstä masennuksen hoidossa on lupaavia tuloksia. Buprenorfiinin virallinen käyttöindikaatio on vaikea kipu, jota se lievittää osittaisen μ -opioidireseptoriagonismin kautta. KOR-poistogeenisillä hiirillä tehdyn tutkimuksen perusteella sen masennusta lievittävät vaikutukset välittyvät kuitenkin KOR-antagonismin kautta (Falcon ym. 2016).

9 JOHTOPÄÄTÖKSET

Subanesteettinen ketamiini on tärkeä osa lääkeresistenttiä masennusta sairastavien ja akuutissa itsemurhavaarassa olevien potilaiden hoitoa (Peltoniemi ym. 2016). Perinteisten masennuslääkkeiden tapaan sen masennuslääkevaikutus perustuu aivojen muovautuvuuden lisäämiseen ja *BDNF*-TrkB -signaaloinnin aktivoimiseen (Rantamäki ym. 2007; Duman 2016). Ketamiinin aikaansaama masennusoireiden lievittyminen ilmenee jo muutaman tunnin sisällä yksittäisestä annostelusta, kun taas perinteiset masennuslääkkeet vaativat useiden viikkojen yhtäjaksoisen annostelun (Mitchell ym. 2006; Zarate ym. 2006).

Myös klassiset psykedeelit aikaansaavat aivojen muovautuvuutta lisääviä muutoksia, kuten hermosolujen spinogeneesiä ja välittömien-aikaisten geenien ekspressiota jo yksittäisen annoksen jälkeen (Frankel ja Cunningham 2002; Nichols ja Sanders-Bush 2002; Ly ym. 2018). Alustavat kliiniset tutkimukset enteilevätkin psykedeeliavusteiselle terapialle lupaavaa tulevaisuutta lääkeresistenttien masennuspotilaiden hoidossa (Grob ym. 2011; Gasser ym. 2014; Griffiths ym. 2016; Ross ym. 2016; Carhart-Harris ym. 2016). Tieto *Salvia divinorum* -kasvin ja salvinoriini A:n mahdollisesta antidepressiivisesta vaikutuksesta rajoittuu toistaiseksi tapauskuvaksiin ja prekliinisiin tutkimuksiin (Hanes 2003; Braidä ym. 2009; Harden ym. 2012).

Salvinoriini A:n yksittäinen suuri (5–10 mg/kg) annos aikaansaa merkitsevän lokomotorisen aktiivisuuden vähenemisen C57BL/6 -kannan hiirillä. Se ei kuitenkaan vaikuta masennuslääkevasteeseen yhdistettyjen TrkB-GSK3 β -proteiinien fosforylaatioon tai *BDNF*:n mRNA:n määrään hiiren aivoissa. Aiempien tutkimusten perusteella Salvinoriini A:n terapeutiset vaikutukset ilmenevätkin mahdollisesti vain matalammilla annoksilla tai säännöllisessä mikroannostelussa (Hanes ym. 2003; Braidä ym. 2009; Harden ym. 2012).

KIRJALLISUUSLUETTELO

Adaikkan C, Taha E, Barrera I, David O, Rosenblum K: Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase Pathways Mediate the Antidepressant Action of Ketamine. *Biol Psychiatry* 84: 65–75, 2018

Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T: Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 85: 525–535, 2007

Al-Hasani R, Bruchas MR: Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology* 115: 1363–1381, 2011

Almeida RN de, Galvão AC de M, da Silva FS, Silva EA dos S, Palhano-Fontes F, Maia-de-Oliveira JP, de Araújo L-SB, Lobão-Soares B, Galvão-Coelho NL: Modulation of Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor by a Single Dose of Ayahuasca: Observation From a Randomized Controlled Trial. *Front Psychol* 10, 2019

Anis NA, Berry SC, Burton NR, Lodge D: The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br J Pharmacol* 79: 565–575, 1983

Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng P, Kavalali ET, Monteggia LM: NMDA Receptor Blockade at Rest Triggers Rapid Behavioural Antidepressant Responses. *Nature* 475: 91–95, 2011

Baggott MJ, Erowid E, Erowid F, Mendelson JE: Use of salvia divinorum, an unscheduled hallucinogenic plant: a web-based survey of 500 users. *Clin Pharmacol Ther* 75: P72–P72, 2004

Beninger RJ: The role of dopamine in locomotor activity and learning. *Brain Res Rev* 6: 173–196, 1983

Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH: Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47: 351–354, 2000

Beurel E, Song L, Jope RS: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 is necessary for the rapid antidepressant effect of ketamine in mice. *Mol Psychiatry* 16: 1068–1070, 2011

Bito H, Deisseroth K, Tsien RW: CREB Phosphorylation and Dephosphorylation: A Ca^{2+} - and Stimulus Duration-Dependent Switch for Hippocampal Gene Expression. *Cell* 87: 1203–1214, 1996

Braida D, Capurro V, Zani A, Rubino T, Viganò D, Parolaro D, Sala M: Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of salvinorin A, the main active ingredient of *Salvia divinorum*, in rodents. *Br J Pharmacol* 157: 844–853, 2009

Braida D, Limonta V, Capurro V, Fadda P, Rubino T, Mascia P, Zani A, Gori E, Fratta W, Parolaro D, Sala M: Involvement of κ -Opioid and Endocannabinoid System on Salvinorin A-Induced Reward. *Biol Psychiatry* 63: 286–292, 2008

Braida D, Limonta V, Pegorini S, Zani A, Guerini-Rocco C, Gori E, Sala M: Hallucinatory and rewarding effect of salvinorin A in zebrafish: κ -opioid and CB1-cannabinoid receptor involvement. *Psychopharmacology* 190: 441–448, 2007

Breier A, Malhotra AK, Pinals DA, Weisenfeld NI, Pickar D: Association of ketamine-induced psychosis with focal activation of the prefrontal cortex in healthy volunteers. *Am J Psychiatry* 154: 805–811, 1997

Bruchas MR, Land BB, Aita M, Xu M, Barot SK, Li S, Chavkin C: Stress-Induced p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Mediates κ -Opioid-Dependent Dysphoria. *J Neurosci* 27: 11614–11623, 2007

Carhart-Harris RL, Bolstridge M, Rucker J, Day CMJ, Erritzoe D, Kaelen M, Bloomfield M, Rickard JA, Forbes B, Feilding A, Taylor D, Pilling S, Curran VH, Nutt DJ: Psilocybin with psychological support for treatment-resistant depression: an open-label feasibility study. *Lancet Psychiatry* 3: 619–627, 2016

Carlezon WA, Béguin C, DiNieri JA, Baumann MH, Richards MR, Todtenkopf MS, Rothman RB, Ma Z, Lee DY-W, Cohen BM: Depressive-like effects of the kappa-opioid receptor agonist salvinorin A on behavior and neurochemistry in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 440–447, 2006

Carlezon WA, Krystal AD: Kappa-Opioid Antagonists for Psychiatric Disorders: From Bench to Clinical Trials. *Depress Anxiety* 33: 895–906, 2016

Castrén E, Antila H: Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses. *Mol Psychiatry* 22: 1085–1095, 2017

Castro CA, Hogan JB, Benson KA, Shehata CW, Landauer MR: Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620. *Pharmacol Biochem Behav* 50: 521–526, 1995

Catlow BJ, Song S, Paredes DA, Kirstein CL, Sanchez-Ramos J: Effects of psilocybin on hippocampal neurogenesis and extinction of trace fear conditioning. *Exp Brain Res* 228: 481–491, 2013

Cattaneo A, Cattane N, Begni V, Pariante CM, Riva MA: The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders. *Transl Psychiatry* 6: 958–958, 2016

Chartoff EH, Potter D, Damez-Werno D, Cohen BM, Carlezon WA: Exposure to the Selective κ -Opioid Receptor Agonist Salvinorin A Modulates the Behavioral and Molecular Effects of Cocaine in Rats. *Neuropsychopharmacology* 33: 2676–2687, 2008

Chavkin C, Sud S, Jin W, Stewart J, Zjawiony JK, Siebert DJ, Toth BA, Hufeisen SJ, Roth BL: Salvinorin A, an Active Component of the Hallucinogenic Sage *Salvia divinorum* Is a Highly Efficacious κ -Opioid Receptor Agonist: Structural and Functional Considerations. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 1197–1203, 2004

Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156–159, 1987

Clements JA, Nimmo WS, Grant IS: Bioavailability, Pharmacokinetics, and Analgesic Activity of Ketamine in Humans. *J Pharm Sci* 71: 539–542, 1982

Committee for Medicinal Product for Human Use (CHMP): Concept Paper on the Need for Revision of Note for Guidance on Clinical Investigation of Medicinal Products in the Treatment of Depression with Regard to Treatment Resistant Depression. EMA, 2009 (viitattu 26.10.2020). Saatavilla internetistä: www.ema.europa.eu

Cook SC, Wellman CL: Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* 60: 236–248, 2004

Corssen GMD, Domino EFMD: Dissociative Anesthesia: Further Pharmacologic Studies and First Clinical Experience with the Phencyclidine Derivative CI-581. *Anesth Analg* 45: 29–40, 1966

Crawford AA, Lewis S, Nutt D, Peters TJ, Cowen P, O'Donovan MC, Wiles N, Lewis G: Adverse effects from antidepressant treatment: randomised controlled trial of 601 depressed individuals. *Psychopharmacology* 231: 2921–2931, 2014

Dias BG, Banerjee SB, Duman RS, Vaidya VA: Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. *Neuropharmacology* 45: 553–563, 2003

DiazGranados N, Ibrahim L, Brutsche N, Ameli R, Henter ID, Luckenbaugh DA, Machado-Vieira R, Zarate CA: Rapid Resolution of Suicidal Ideation after a Single Infusion of an NMDA Antagonist in Patients with Treatment-Resistant Major Depressive Disorder. *J Clin Psychiatry* 71: 1605–1611, 2010

Depressio (online). Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Psykiatriyhdistys ry:n asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2020 (viitattu 26.10.2020). Saatavilla Internetissä: www.käypähoito.fi

Dowlathshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT: Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. *Lancet* 352: 1754–1755, 1998

Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ: A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 54: 597–606, 1997

Duman RS, Aghajanian GK: Synaptic Dysfunction in Depression: Potential Therapeutic Targets. *Science* 338: 68–72, 2012

Duman RS, Aghajanian GK, Sanacora G, Krystal JH: Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nat Med* 22: 238–249, 2016

Duman RS: Ketamine and rapid-acting antidepressants: a new era in the battle against depression and suicide. *F1000Res* 7, 2018

Dwivedi Y, Rao JS, Rizavi HS, Kotowski J, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN: Abnormal expression and functional characteristics of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry* 60: 273–282, 2003a

Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN: Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry* 60: 804–815, 2003b

Falcon E, Browne CA, Leon RM, Fleites VC, Sweeney R, Kirby LG, Lucki I: Antidepressant-like Effects of Buprenorphine are Mediated by Kappa Opioid Receptors. *Neuropsychopharmacology* 41: 2344–2351, 2016

Fantegrossi WE, Kugle KM, Valdes LJ, Koreeda M, Woods JH: Kappa-opioid receptor-mediated effects of the plant-derived hallucinogen, salvinorin A, on inverted screen performance in the mouse. *Behav Pharmacol* 16: 627–633, 2005

Feng LY, Battulga A, Han E, Chung H, Li J-H: New psychoactive substances of natural origin: A brief review. *J Food Drug Anal* 25: 461–471, 2017

Frankel PS, Cunningham KA: The hallucinogen d-lysergic acid diethylamide (d-LSD) induces the immediate-early gene c-Fos in rat forebrain. *Brain Res* 958: 251–260, 2002

Garcia LSB, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Barbosa LM, Andreazza AC, Stertz L, Fries GR, Gavioli EC, Kapczinski F, Quevedo J: Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32: 140–144, 2008

Gasser P, Holstein D, Michel Y, Doblin R, Yazar-Klosinski B, Passie T, Brenneisen R: Safety and Efficacy of Lysergic Acid Diethylamide-Assisted Psychotherapy for Anxiety Associated With Life-threatening Diseases. *J Nerv Ment Dis* 202: 513–520, 2014

GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators: Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 392: 1789–1858, 2018

- Geisslinger G, Hering W, Thomann P, Knoll R, Kamp HD, Brune K: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketamine enantiomers in surgical patients using a stereoselective analytical method. *Br J Anaesth* 70: 666–671, 1993
- González D, Riba J, Bouso JC, Gómez-Jarabo G, Barbanoj MJ: Pattern of use and subjective effects of *Salvia divinorum* among recreational users. *Drug Alcohol Depend* 85: 157–162, 2006
- Griffiths RR, Johnson MW, Carducci MA, Umbricht A, Richards WA, Richards BD, Cosimano MP, Klinedinst MA: Psilocybin produces substantial and sustained decreases in depression and anxiety in patients with life-threatening cancer: A randomized double-blind trial. *J Psychopharmacol* 30: 1181–1197, 2016
- Grimwood S, Lu Y, Schmidt AW, Vanase-Frawley MA, Sawant-Basak A, Miller E, McLean S, Freeman J, Wong S, McLaughlin JP, Verhoest PR: Pharmacological characterization of 2-methyl-N-((2'-(pyrrolidin-1-ylsulfonyl)biphenyl-4-yl)methyl)propan-1-amine (PF-04455242), a high-affinity antagonist selective for κ -opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 339: 555–566, 2011
- Grob CS, Danforth AL, Chopra GS, Hagerty M, McKay CR, Halberstadt AL, Greer GR: Pilot Study of Psilocybin Treatment for Anxiety in Patients With Advanced-Stage Cancer. *Arch Gen Psychiatry* 68: 71, 2011
- Hammen C: Stress and Depression. *Annu Rev Clin Psychol* 1: 293–319, 2005
- Hanes KR: Antidepressant Effects of the Herb *Salvia Divinorum*: A Case Report. *J Clin Psychopharmacol* 21: 634–635, 2001
- Hanes KR: *Salvia divinorum*: clinical and research potential. *MAPS Bull* 13: 18-20, 2003
- Hanks JB, González-Maeso J: Animal models of serotonergic psychedelics. *ACS Chem Neurosci* 4: 33–42, 2013
- Harden MT, Smith SE, Niehoff JA, McCurdy CR, Taylor GT: Antidepressive effects of the κ -opioid receptor agonist salvinorin A in a rat model of anhedonia. *Behav Pharmacol* 23: 710–715, 2012
- Hensch TK: Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6: 877–888, 2005
- Herrera DG, Robertson HA: Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* 50: 83–107, 1996
- Hijazi Y, Boulieu R: Contribution of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 Isoforms to N-Demethylation of Ketamine in Human Liver Microsomes. *Drug Metab Dispos* 30: 853–858, 2002

Hirschfeld RMA: History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *J Clin Psychiatry* 61: 4–6, 2000

Hutten NR, Mason NL, Dolder PC, Theunissen EL, Holze F, Liechti ME, Varghese N, Eckert A, Feilding A, Ramaekers JG, Kuypers KP: Low doses of LSD acutely increase BDNF blood plasma levels in healthy volunteers. *ACS Pharmacol Transl Sci* 2020 (painossa)

Höflich A, Hahn A, Küblböck M, Kranz GS, Vanicek T, Ganger S, Spies M, Windischberger C, Kasper S, Winkler D, Lanzenberger R: Ketamine-dependent neuronal activation in healthy volunteers. *Brain Struct Funct* 222: 1533–1542, 2017

Hooker JM, Xu Y, Schiffer W, Shea C, Carter P, Fowler JS: Pharmacokinetics of the potent hallucinogen, salvinorin A in primates parallels the rapid onset and short duration of effects in humans. *NeuroImage* 41: 1044–1050, 2008

Huang EJ, Reichardt LF: Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annu Rev Biochem* 72: 609–642, 2003

Hurd YL: Differential messenger RNA expression of prodynorphin and proenkephalin in the human brain. *Neuroscience* 72: 767–783, 1996

Hyman SE, Nestler EJ: Initiation and adaptation: a paradigm for understanding psychotropic drug action. *Am J Psychiatry* 153: 151–162, 1996

Johnson MW, MacLean KA, Caspers MJ, Prisinzano TE, Griffiths RR: Time course of pharmacokinetic and hormonal effects of inhaled high-dose salvinorin A in humans. *J Psychopharmacol* 30: 323–329, 2016

Joep RS, Johnson GVW: The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29: 95–102, 2004

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, Mack S: Principles of Neural Sciences. 5. painos. McGraw-Hill Education LLC, New York 2013

Kang HJ, Voleti B, Hajszan T, Rajkowska G, Stockmeier C, Licznarski P, Lepack A, Majik MS, Jeong LS, Banasr M, Son H, Duman RS: Decreased Expression of Synapse-Related Genes and Loss of Synapses in Major Depressive Disorder. *Nat Med* 18: 1413–1417, 2012

Karege F, Vaudan G, Schwald M, Perroud N, La Harpe R: Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res* 136: 29–37, 2005

Karege F, Perroud N, Burkhardt S, Schwald M, Ballmann E, La Harpe R, Malafosse A: Alteration in kinase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 β in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Biol Psychiatry* 61: 240–245, 2007

- Keller S, Sarchiapone M, Zarrilli F, Videtic A, Ferraro A, Carli V, Sacchetti S, Lembo F, Angiolillo A, Jovanovic N, Pisanti F, Tomaiuolo R, Monticelli A, Balazic J, Roy A, Marusic A, Cocozza S, Fusco A, Bruni CB, Castaldo G, Chiariotti L: Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry* 67: 258–267, 2010
- Knoll AT, Carlezon WA: Dynorphin, stress, and depression. *Brain Res* 1314: 56–73, 2010
- Kohtala S, Theilmann W, Rosenholm M, Müller HK, Kiuru P, Wegener G, Yli-Kauhialuoma J, Rantamäki T: Ketamine-induced regulation of TrkB-GSK3 β signaling is accompanied by slow EEG oscillations and sedation but is independent of hydroxynorketamine metabolites. *Neuropharmacology* 157: 107684, 2019
- Kohtala S, Theilmann W, Suomi T, Wigren H-K, Porkka-Heiskanen T, Elo LL, Rokka A, Rantamäki T: Brief Isoflurane Anesthesia Produces Prominent Phosphoproteomic Changes in the Adult Mouse Hippocampus. *ACS Chem Neurosci* 7: 749–756, 2016
- Koolschijn PCMP, van Haren NEM, Lensvelt-Mulders GJLM, Hulshoff Pol HE, Kahn RS: Brain volume abnormalities in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Hum Brain Mapp* 30: 3719–3735, 2009
- Kotermanski SE, Johnson JW: Mg²⁺ imparts NMDA receptor subtype selectivity to the Alzheimer's drug memantine. *J Neurosci* 29: 2774–2779, 2009
- Kuypers KP, Ng L, Erritzoe D, Knudsen GM, Nichols CD, Nichols DE, Pani L, Soula A, Nutt D: Microdosing psychedelics: More questions than answers? An overview and suggestions for future research. *J Psychopharmacol* 33: 1039–1057, 2019
- Land BB, Bruchas MR, Lemos JC, Xu M, Melief EJ, Chavkin C: The Dysphoric Component of Stress Is Encoded by Activation of the Dynorphin κ -Opioid System. *J Neurosci* 28: 407–414, 2008
- Lapidus KAB, Levitch CF, Perez AM, Brallier JW, Parides MK, Soleimani L, Feder A, Iosifescu DV, Charney DS, Murrough JW: A Randomized Controlled Trial of Intranasal Ketamine in Major Depressive Disorder. *Biol Psychiatry* 76: 970–976, 2014
- Lepack AE, Fuchikami M, Dwyer JM, Banasr M, Duman RS: BDNF Release Is Required for the Behavioral Actions of Ketamine. *Int J Neuropsychopharmacol* 18, 2015
- Li N, Lee B, Liu R-J, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li X-Y, Aghajanian G, Duman RS: mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329: 959–964, 2010
- Li N, Liu R-J, Dwyer JM, Banasr M, Lee B, Son H, Li X-Y, Aghajanian G, Duman RS: Glutamate NMDA receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol Psychiatry* 69: 754–761, 2011

- Li R, Morris-Natschke S, Lee K-H: Clerodane diterpenes: Sources, structures, and biological activities. *Nat. Prod. Rep.* 33, 2016a
- Li W, Sun H, Chen H, Yang X, Xiao L, Liu R, Shao L, Qiu Z: Major Depressive Disorder and Kappa Opioid Receptor Antagonists. *Transl Perioper Pain Med* 1: 4–16, 2016b
- Listos J, Merska A, Fidecka S: Pharmacological activity of Salvinorin A, the major component of *Salvia divinorum*. *Pharmacol Rep* 63: 1305–1309, 2011
- Lledo P-M, Alonso M, Grubb MS: Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7: 179–193, 2006
- Lonze BE, Ginty DD: Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35: 605–623, 2002
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951
- Ly C, Greb AC, Cameron LP, Wong JM, Barragan EV, Wilson PC, Burbach KF, Zarandi SS, Sood A, Paddy MR, Duim WC, Dennis MY, McAllister AK, Ori-McKenney KM, Gray JA, Olson DE: Psychedelics Promote Structural and Functional Neural Plasticity. *Cell Rep* 23: 3170–3182, 2018
- Ma Z, Zang T, Birnbaum SG, Wang Z, Johnson JE, Zhang C-L, Parada LF: TrkB dependent adult hippocampal progenitor differentiation mediates sustained ketamine antidepressant response. *Nat Commun* 8: 1668, 2017
- MacDonald JF, Miljkovic Z, Pennefather P: Use-dependent block of excitatory amino acid currents in cultured neurons by ketamine. *J Neurophysiol.* 58: 251–266, 1987
- Mague SD, Pliakas AM, Todtenkopf MS, Tomasiewicz HC, Zhang Y, Stevens WC, Jones RM, Portoghese PS, Carlezon WA: Antidepressant-Like Effects of κ -Opioid Receptor Antagonists in the Forced Swim Test in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 323–330, 2003
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS: Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* 20: 9104–9110, 2000
- McKenna DJ: *Ayahuasca: An ethnopharmacologic history*. Kirjassa: *Sacred vine of spirits: Ayahuasca*. s. 40-62. Toim. Metzner R, Park Street Press, Vermont 2006
- Merritt AT, Ley SV: Clerodane diterpenoids. *Nat Prod Rep* 9: 243–287, 1992
- Mitchell AJ: Two-week delay in onset of action of antidepressants: new evidence. *Br J Psychiatry* 188: 105–106, 2006

Murrough JW, Iosifescu DV, Chang LC, Al Jurdi RK, Green CE, Perez AM, Iqbal S, Pillemer S, Foulkes A, Shah A, Charney DS, Mathew SJ: Antidepressant Efficacy of Ketamine in Treatment-Resistant Major Depression: A Two-Site Randomized Controlled Trial. *AJP* 170: 1134–1142, 2013

Nibuya M, Morinobu S, Duman RS: Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15: 7539–7547, 1995

Nibuya M, Nestler E, Duman R: Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci* 16: 2365–2372, 1996

Nichols CD, Sanders-Bush E: A Single Dose of Lysergic Acid Diethylamide Influences Gene Expression Patterns within the Mammalian Brain. *Neuropsychopharmacology* 26: 634–642, 2002

Nichols DE: Hallucinogens. *Pharmacol Therapeut* 101: 131–181, 2004

Ortega A, F. Blount J, S. Manchand P: Salvinorin, a new trans -neoclerodane diterpene from *Salvia divinorum* (Labiatae). *J Chem Soc* 10: 2505–2508, 1982

Palhano-Fontes F, Barreto D, Onias H, Andrade KC, Novaes MM, Pessoa JA, Mota-Rolim SA, Osório FL, Sanches R, Dos Santos RG, Tófoli LF, de Oliveira Silveira G, Yonamine M, Riba J, Santos FR, Silva-Junior AA, Alchieri JC, Galvão-Coelho NL, Lobão-Soares B, Hallak JEC, Arcoverde E, Maia-de-Oliveira JP, Araújo DB: Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomized placebo-controlled trial. *Psychol Med* 49: 655–663, 2019

Paul IA, Nowak G, Layer RT, Popik P, Skolnick P: Adaptation of the N-methyl-D-aspartate receptor complex following chronic antidepressant treatments. *J. Pharmacol Exp Ther* 269: 95–102, 1994

Peltoniemi MA, Hagelberg NM, Olkkola KT, Saari TI: Ketamine: A Review of Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Anesthesia and Pain Therapy. *Clin Pharmacokinet* 55: 1059–1077, 2016

Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M: Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology* 177: 245–255, 2004

Perera TD, Dwork AJ, Keegan KA, Thirumangalakudi L, Lipira CM, Joyce N, Lange C, Higley JD, Rosoklija G, Hen R, Sackeim HA, Coplan JD: Necessity of hippocampal neurogenesis for the therapeutic action of antidepressants in adult nonhuman primates. *PLoS One* 6: e17600, 2011

Persson J, Hasselström J, Maurset A, Öye I, Svensson J-O, Almqvist O, Scheinin H, Gustafsson L, Almqvist O: Pharmacokinetics and non-analgesic effects of S- and R-

ketamines in healthy volunteers with normal and reduced metabolic capacity. *Eur J Clin Pharmacol* 57: 869–875, 2002

Pirkola SP, Isometsä E, Suvisaari J, Aro H, Joukamaa M, Poikolainen K, Koskinen S, Aromaa A, Lönnqvist JK: DSM-IV mood-, anxiety- and alcohol use disorders and their comorbidity in the Finnish general population. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 40: 1–10, 2005

Polyakova M, Stuke K, Schuemberg K, Mueller K, Schoenknecht P, Schroeter ML: BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: A systematic & quantitative meta-analysis. *J Affect Disord* 174: 432–440, 2015

Portmann S, Kwan HY, Theurillat R, Schmitz A, Mevissen M, Thormann W: Enantioselective capillary electrophoresis for identification and characterization of human cytochrome P450 enzymes which metabolize ketamine and norketamine in vitro. *J Chromatogr A* 1217: 7942–7948, 2010

Rantamäki T, Hendolin P, Kankaanpää A, Mijatovic J, Piepponen P, Domenici E, Chao MV, Männistö PT, Castrén E: Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 32: 2152–2162, 2007

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N: Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal* 22: 659–661, 2008

Reisfield AS: The Botany of *Salvia Divinorum* (Labiatae). *SIDA, Contributions to Botany* 15: 349–366, 1993

Réus GZ, Vieira FG, Abelaira HM, Michels M, Tomaz DB, dos Santos MAB, Carlessi AS, Neotti MV, Matias BI, Luz JR, Dal-Pizzol F, Quevedo J: MAPK signaling correlates with the antidepressant effects of ketamine. *J Psychiatr Res* 55: 15–21, 2014

Ross S, Bossis A, Guss J, Agin-Liebes G, Malone T, Cohen B, Mennenga SE, Belser A, Kalliontzi K, Babb J, Su Z, Corby P, Schmidt BL: Rapid and sustained symptom reduction following psilocybin treatment for anxiety and depression in patients with life-threatening cancer: a randomized controlled trial. *J Psychopharmacol* 30: 1165–1180, 2016

Roth BL, Baner K, Westkaemper R, Siebert D, Rice KC, Steinberg S, Ernsberger P, Rothman RB: Salvinorin A: A potent naturally occurring nonnitrogenous κ opioid selective agonist. *PNAS* 99: 11934–11939, 2002

Roth BL, Lopez E, Beischel S, Westkaemper RB, Evans JM: Screening the receptorome to discover the molecular targets for plant-derived psychoactive compounds: a novel approach for CNS drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics, Psychoactive Plants* 102: 99–110, 2004

Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, Niederehe G, Thase ME, Lavori PW, Lebowitz BD, McGrath PJ, Rosenbaum JF, Sackeim HA, Kupfer DJ, Luther J, Fava M: Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am J Psychiatry* 163: 1905–1917, 2006

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R: Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. *Science* 301: 805–809, 2003

Santos RG dos, Sanches RF, Osorio F de L, Hallak JFC: Long-term effects of ayahuasca in patients with recurrent depression: a 5-year qualitative follow-up. *Arch Clin Psychiatry* 45: 22–25, 2018

Schmidt MD, Schmidt MS, Butelman ER, Harding WW, Tidgewell K, Murry DJ, Kreek MJ, Prisinzano TE: Pharmacokinetics of the plant-derived κ -opioid hallucinogen salvinorin A in nonhuman primates. *Synapse* 58: 208–210, 2005a

Schmidt MS, Prisinzano TE, Tidgewell K, Harding W, Butelman ER, Kreek MJ, Murry DJ: Determination of Salvinorin A in body fluids by high performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization. *J Chromatogr B* 818: 221–225, 2005b

Schwarzer C: 30 years of dynorphins — New insights on their functions in neuropsychiatric diseases. *Pharmacol Ther* 123: 353–370, 2009

Shaywitz AJ, Greenberg ME: CREB: A Stimulus-Induced Transcription Factor Activated by A Diverse Array of Extracellular Signals. *Annu Rev Biochem* 68: 821–861, 1999

Sheldrick A, Camara S, Ilieva M, Riederer P, Michel TM: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin 3 (NT3) levels in post-mortem brain tissue from patients with depression compared to healthy individuals - a proof of concept study. *Eur Psychiatry* 46: 65–71, 2017

Sheng M, Greenberg ME: The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4: 477–485, 1990

Siebert DJ: Salvia divinorum and salvinorin A: new pharmacologic findings. *J Ethnopharmacol* 43: 53–56, 1994

Suomen lääketilasto 2009. Helsinki: Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea ja Kansaneläkelaitos. Viitattu 26.10.2020. Saatavilla osoitteesta: www.fimea.fi

Suomen lääketilasto 2018. Helsinki: Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea ja Kansaneläkelaitos. Viitattu 26.10.2020. Saatavilla osoitteesta: www.fimea.fi

Teksin ZS, Lee IJ, Nemieboka NN, Othman AA, Upreti VV, Hassan HE, Syed SS, Prisinzano TE, Eddington ND: Evaluation of the transport, in vitro metabolism and

pharmacokinetics of Salvinorin A, a potent hallucinogen. *E J Pharm Biopharm* 72: 471–477, 2009

The UK ECT Review Group: Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 361: 799-808, 2003

Thoenen H: The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 14: 165–170, 1991

Tilasto lääkekorvauksen saajista ja reseptitiedoista (online). Vuosi 2019. Helsinki: Kela (viitattu 26.10.2020). Saatavilla osoitteesta: <http://raportit.kela.fi/linkki/81757592>

Valdés LJ, Leander J, Díaz JL, Paul AG: Ethnopharmacology of ska maria pastora (*Salvia divinorum*, Epling and Játiva-M.). *J Ethnopharmacol* 7: 287-312, 1983

Valdés LJ, Butler WM, Hatfield GM, Paul AG, Koreeda M: Divinorin A, a psychotropic terpenoid, and divinorin B from the hallucinogenic Mexican mint, *Salvia divinorum*. *J Org Chem* 49: 4716-4720, 1984

Vetencourt JFM, Sale A, Viegi A, Baroncelli L, Pasquale RD, O’Leary OF, Castrén E, Maffei L: The Antidepressant Fluoxetine Restores Plasticity in the Adult Visual Cortex. *Science* 320: 385–388, 2008

Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL: Opioid Receptors. *Annu Rev Biochem* 73: 953–990, 2004

Wasson RG: A New Mexican Psychotropic Drug from the Mint Family. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University* 20: 77–84, 1962

Willmore-Fordham CB, Krall DM, McCurdy CR, Kinder DH: The hallucinogen derived from *Salvia divinorum*, salvinorin A, has κ -opioid agonist discriminative stimulus effects in rats. *Neuropharmacology* 53: 481–486, 2007

Vollenweider FX, Komater M: The neurobiology of psychedelic drugs: implications for the treatment of mood disorders. *Nat Rev Neurosci* 11: 642–651, 2010

World Health Organization: The global burden of disease: 2004 update. WHO Press, Geneva 2008

Wu LT, Woody GE, Yang C, Li J-H, Blazer DG: Recent national trends in *Salvia divinorum* use and substance-use disorders among recent and former *Salvia divinorum* users compared with nonusers. *Subst Abuse Rehabil* 2011: 53–68, 2011

Yanagihara Y, Ohtani M, Kariya S, Uchino K, Hiraishi T, Ashizawa N, Aoyama T, Yamamura Y, Yamada Y, Iga T: Plasma concentration profiles of ketamine and norketamine after administration of various ketamine preparations to healthy Japanese volunteers. *Biopharm Drug Dispos* 24: 37–43, 2003

Yang C, Hu Y-M, Zhou Z-Q, Zhang G-F, Yang J-J: Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test. *Ups J Med Sci* 118: 3–8, 2013

Zarate CA, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK: A Randomized Trial of an N-methyl-D-aspartate Antagonist in Treatment-Resistant Major Depression. *Arch Gen Psychiatry* 63: 856–864, 2006

Zarate CA, Brutsche N, Laje G, Luckenbaugh DA, Venkata SLV, Ramamoorthy A, Moaddel R, Wainer IW: Relationship of ketamine's plasma metabolites with response, diagnosis, and side effects in major depression. *Biol Psychiatry* 72: 331–338, 2012

Zhang H, Shi Y-G, Woods JH, Watson SJ, Ko M-C: Central κ -opioid receptor-mediated antidepressant-like effects of nor-Binaltorphimine: Behavioral and BDNF mRNA expression studies. *European Journal of Pharmacology* 570: 89–96, 2007

Zhang Y, Butelman ER, Schlussman SD, Ho A, Kreek MJ: Effects of the plant-derived hallucinogen salvinorin A on basal dopamine levels in the caudate putamen and in a conditioned place aversion assay in mice: agonist actions at kappa opioid receptors. *Psychopharmacology* 179: 551–558, 2005

Zhao X, Venkata SLV, Moaddel R, Luckenbaugh DA, Brutsche NE, Ibrahim L, Zarate CA, Mager DE, Wainer IW: Simultaneous population pharmacokinetic modelling of ketamine and three major metabolites in patients with treatment-resistant bipolar depression. *Br J Clin Pharmacol* 74: 304–314, 2012

LIITTEET

Liite 1. Käytetyt liuokset. Kaikissa liuoksissa käytetty ionivaihdettu vesi on Milli-Q vedenpuhdistuslaitteen tuottamaa (Merck).

Liuos	Reagenssit	Määrät	Valmistaja
NP-lyysispuskuri	3 M pH 8,0 Tris-HCl	670 µl	HY Media Kitchen
	5M NaCl	2740 µl	HY Media Kitchen
	0.5M NaF	9,6 µl	HY Media Kitchen
	Nonidet-40	1 ml	Thermo Fisher
	Glyseroli	10 ml	HY Media Kitchen.
	Ionivaihdettu vesi	ad. 100 ml	
Ajopuskuri	20x NuPage™ Running buffer	100ml	Thermo Fisher
	Ionivaihdettu vesi	ad. 2000ml	
Siirtopuskuri	20x NuPage™ Transfer buffer	100 ml	Thermo Fisher
	Metanoli	300 ml	Sigma-Aldrich
	Ionivaihdettu vesi	ad. 2000ml	
TBS	10x TBS	100 ml	HY Media Kitchen
	Ionivaihdettu vesi	ad. 1000 ml	
TBST	10x TBS	1000 ml	HY Media Kitchen
	Tween 20	10 ml	Thermo Fisher
	Ionivaihdettu vesi	ad. 10 l	
3 % BSA eli Blokkausliuos 1	BSA	3 g	Sigma-Aldrich
	TBST	100 ml	
Primaarivasta-aine laimennos	Blokkausliuos 1	30 ml	
	Primaarivasta-aine	6-30 µl	CST
	NaN3	30 µl	Sigma-Aldrich
5 % NFDM eli Blokkausliuos 2	NFDM	5 g	Valio
	TBST	100 ml	
Sekundaarivasta-aine laimennos	Blokkausliuos 2	30 ml	
	Sekundaarivasta-aine	3 µl	Bio-Rad

Liite 2. Western blot tulosten analysoinnissa käytetyt tilastolliset testit.

Koe		Testi	P-arvo	
VEH vs. SalA 5 mg/kg				
5 min N=7/ryhmä	PFC			
	p-TrkB	Pariton t-testi	0,753	
	p-GSK3B		0,946	
	p-p70s6k		0,985	
	MTL			
	p-TrkB	Pariton t-testi	0,944	
	p-GSK3B		0,506	
	p-p70s6k		0,637	
VEH vs. SalA 5 mg/kg				
20 min N=7/ryhmä	PFC			
	p-TrkB	Pariton t-testi	0,092	
	p-GSK3B		0,312	
	p-p70s6k		0,154	
	p-p44MAPK		0,643	
	p-p42MAPK		0,432	
	p-CREB		0,154	
	HC			
	p-TrkB	Pariton t-testi	0,937	
	p-GSK3B		0,518	
	p-p70s6k		0,385	
	p-CREB		0,843	
	VEH vs. SalA 5 mg/kg vs. SalA 10 mg/kg			
	120 min N=6/ryhmä	PFC		
p-TrkB		Kruskal-Wallis H	0,178	
p-CREB			0,684	
Arc			0,085	
MTL				
p-TrkB		Kruskal-Wallis H	0,365	
Arc			0,827	

Liite 3. qPCR tulosten analysoinnissa käytetyt tilastolliset testit.

Koe		Testi	P-arvo
VEH vs. SalA 5 mg/kg vs. SalA 10 mg/kg			
120 min N=6/ryhmä	PFC	Kruskal-Wallis H	
			BDNF IV 0,612
			c-fos 0,717
	MTL	Kruskal-Wallis H	
			BDNF IV 0,834
			c-fos 0,135

Liite 4. Avokenttäkokeen tulosten analysoinnissa käytetyt tilastolliset testit

Koe		Testi	P-arvo
VEH vs. SalA 5 mg/kg vs. SalA 10 mg/kg			
100 min N=4/ryhmä	0-5 min	Kruskal-Wallis H	* 0,021
	VEH vs. 5 mg/kg	Dunn's post hoc	* 0,039
	VEH vs. 10 mg/kg	Dunn's post hoc	** 0,008
	5-10 min	Kruskal-Wallis H	* 0,035
	VEH vs. 5 mg/kg	Dunn's post hoc	* 0,050
	VEH vs. 10 mg/kg	Dunn's post hoc	** 0,014
	10-15 min	Kruskal-Wallis H	0,232

Liite 5. Avokenttäkokeen 100 min kuvaaja.

