

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Hynek Danda

Akutní účinky a adiktivní potenciál nových syntetických drog ze skupiny katoninů – animální studie

Acute effects and addictive potential of new synthetic drugs from cathinone group – an animal study

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Tomáš Páleníček, PhD.
Praha rok 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 08. 2016

Podpis

Poděkování

Velice rád bych poděkoval svému školiteli MUDr. Tomáši Paleníčkovi, Ph.D. za odborné vedení této práce, za jeho cenné připomínky a rady a za jeho trpělivost prokázanou během sepsání této práce. Další nemenší poděkování patří Mgr. Kláře Šíchové, Mgr. et Mgr. Kristýně Štefkové, Mgr. Nikole Pinterové a Ing. Evě Lhotkové za jejich neskonalou trpělivost při provádění experimentů a jejich ochotu ke konzultaci výsledků práce. Nakonec bych rád poděkoval své rodině za velkou podporu během celého studia. Tato práce vznikla v rámci projektu „Národní ústav duševního zdraví (NUDZ)“, registrační číslo ED2.1.00/03.0078, financovaného z Evropského fondu pro regionální rozvoj, dále byla podpořena grantem VG20122015075.

Abstrakt

Nové psychoaktivní substance (NPS) jsou současným problémem drogové scény. Jedná se o látky, které napodobují účinky „klasických“ nelegálních drog, jelikož ale mají jinou chemickou strukturu, často nespádají pod legislativní kontrolu. Jejich účinky jsou v mnohých případech popsány pouze uživateli, exaktně prostudovány však nejsou. Cílem této práce je zhodnotit akutní účinky nafyronu ze skupiny katinonů a jeho adiktivní potenciál na potkanech kmene Wistar. Vysoká koncentrace nafyronu v mozkové tkáni zjištěná při farmakokinetické analýze prokazuje jeho vysokou prostupnost hematoencefalickou bariérou. Maximální koncentrace bylo dosaženo přibližně po 30 minutách po aplikaci, téměř ve stejnou dobu jako v séru. Podání nafyronu mělo signifikantní vliv na zvýšení tělesné teploty, stejně tak lokomoční aktivitu, kde je patrný jeho stimulační efekt. Ve studii se nepodařil prokázat účinek nafyronu na sensorimotorické zpracování informací, schopnost vyvolat podmíněnou preferenci místa byla pouze naznačena. Tato práce přináší nové poznatky o vlivu nafyronu na fyziologické parametry s použitím animálního modelu účinků drog.

Klíčová slova:

Nafyron, animální model, katinony, adiktivní potenciál, test otevřeného pole, sensorimotorické zpracování informací, prepulzní inhibice (PPI) akustické úlekové reakce (ASR), podmíněná preference místa (CPP)

Abstract

Novel psychoactive substances (NPS) are a novel problem of the drug scene. NPS mimic effects of the „classic“ illicit drugs, but since they have a different chemical structure, they are usually not covered by legislative control. The exact nature of the aforementioned effects depends merely on the description by users, with a proper scientific assessment still absent. Aim of this study is to evaluate effects and addictive potential of naphyrone (a derivative of cathinone) in Wistar rats. High concentration of naphyrone in the brain tissue discovered by pharmacokinetic analysis proved its high blood-brain barrier permeability. Brain level of naphyrone peaked at approximately 30 min after the treatment, nearly at the same time as in the serum. Since naphyrone administration significantly rises body temperature and increases overall locomotion, its stimulant effect is prominently apparent. Our study failed to prove any effect of naphyrone on sensorimotor gating. Tendency to produce conditioned place preference was observed but was not significant. My thesis reports on initial and novel findings about impact of naphyrone administration on physiological parameters of the animal model.

Key words:

Naphyrone, animal model, cathinones, addictive potential, open field test, sensorimotor gating, prepulse inhibition (PPI) of acoustic startle (ASR), conditioned place preference (CPP)

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1. Úvod	8
2. Literární přehled	9
2.1. Nové psychoaktivní substance	9
2.1.1. Charakteristika jednotlivých skupin NPS	10
2.1.2. Mechanismus účinků	14
2.1.3. Epidemiologie	16
2.1.4. Zdravotní rizika	17
2.2. Katinony	18
2.2.1. Charakteristika	18
2.2.2. Farmakodynamika a farmakokinetika katinonů	19
2.2.3. Rizika spojená s užíváním katinonů	20
2.3. Nafyron	21
2.3.1. Charakteristika	21
2.3.2. Farmakodynamika a farmakokinetika	22
2.3.3. Dávkování a nepříznivé účinky	22
2.4. Neurobiologie závislosti	23
2.5. Animální modely	24
2.5.1. Test otevřeného pole (OFT)	24
2.5.2. Prepulzní inhibice akustické úlekové reakce (PPI ASR)	25
2.5.3. Test podmíněné preference místa (CPP)	25
3. Cíle a hypotézy	27
4.1 Experimentální zvířata	28
4.2 Látky	28
4.3 Farmakokinetická analýza	28
4.4. Behaviorální experimenty	30
4.4.1. Test otevřeného pole	30
4.4.2. Prepulzní inhibice akustické úlekové reakce	31
4.5. Měření tělesné teploty	32
4.6. Test podmíněné preference místa	33
4.7. Statistická analýza	34
5. Výsledky	36
5.1. Farmakokinetická analýza	36
5.2. Test otevřeného pole (OFT)	37

5.3. Test prepulzní inhibice akustické úlekové reakce	40
5.4. Měření tělesné teploty	42
5.5. Test podmíněné preference místa	43
6. Diskuze	45
7. Závěr.....	49
8. Seznam použité literatury	50

Seznam použitých zkratek

ANOVA	Analýza variance
ASR	Akustická úleková reakce
CNS	Centrální nervová soustava
CPP	Podmíněná preference místa, conditioned place preference
DAT	Dopaminový transportér
EMCDDA	Evropské monitorovací centrum pro drogy a drogovou závislost
LC/HRMS	Kapalinová chromatografie s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem, liquid chromatography/high resolution mass spectrometry
LSD	N,N-diethylamid kyseliny lysergové
MDMA	3,4-methylendioxy-N-methylamfetamin, extáze
MDPPP	3,4,-methylendioxy-alfa-pyrrolidinopropiofenon
MDPV	3,4-methylendioxyprovaleron
MS	Hmotnostní spektrometrie, mass spectrometry
NPS	Nové psychoaktivní substance
OFT	Test otevřeného pole, open field test
OPS	Omamné a psychotropní látky
PCP	Fencyklidin
PPI	Prepulzní inhibice
PMMA	Para-methoxy-metamfetamin
SEM	Střední chyba průměru
SERT	Serotoninový transportér
SPE	Extrakce na pevné fázi, solid phase extraction
THC	Δ^9 -tetrahydrokanabinol

1. Úvod

Nové syntetické drogy (v současné době se častěji používá termín nové psychoaktivní substance) jsou stále akutnějším problémem na drogové, zejména taneční scéně. K masivnímu nárůstu jejich výskytu dochází především kvůli snaze výrobců a prodejců obejít současnou legislativu a vyhnout se tak možnému právnímu postihu. Jejich prodej je vždy po určitou dobu zcela legální, čímž také vzrůstá prevalence jejich užívání. Postupně jsou zařazovány na seznam zakázaných omamných a psychotropních látek (OPS), a proto se výrobci snaží vyvíjet stále nové a nové substance. Jednou z největších a nejrozšířenějších skupin látek patřící mezi nové psychoaktivní substance jsou katinony, deriváty alkaloidu katinonu. Tato látka je obsažena v katě jedlé (*Catha edulis*), rostlině pocházející z východní Afriky.

V první části své práce se zaměřuji na základní shrnutí teoretických poznatků vztahujících se k fenoménu NPS. Jsou zde představeny nejzásadnější informace o jejich rozdělení, charakteristice a mechanismu účinků, důraz je pak kladen na nejrozšířenější katinony. Pro většinu katinonů je k dispozici pouze minimum dat, ať už humánních, či animálních, týkajících se akutních účinků, rizik, chronické toxicity a návykovosti. Podrobněji se pak tato práce zabývá katinonem se stimulačními účinky - nafyronem.

V experimentální části své práce posoudím jeho akutní účinky na chování potkana kmene Wistar a především pak zhodnotím jeho adiktivní potenciál. Akutní účinky nafyronu jsme měřili pomocí testu otevřeného pole, prepulzní inhibice akustické úlekové reakce a měření tělesné teploty. Adiktivní potenciál byl zhodnocen pomocí testu podmíněné preference místa (conditioned place preference, CPP).

2. Literární přehled

2.1. Nové psychoaktivní substance

Nové psychoaktivní substance (NPS) označované také jako „designer drugs“ či také „legal highs“ jsou psychoaktivní látky s širokým spektrem účinků od látek stimulačních přes halucinogeny až po látky tlumivé (Corazza et al., 2013; Johnson et al., 2013). Jde o sloučeniny s podobným účinkem jako drogy tradiční (např. marihuana, heroin, extáze, stimulanty) avšak s rozdílnou chemickou strukturou, přičemž je zachován farmakologický a behaviorální účinek (King and Kicman, 2011). Kvůli odlišné chemické struktuře nejsou však tyto látky z počátku na seznamu zakázaných omamných a psychotropních látek a jejich výroba a šíření nepodléhá legislativní kontrole. Postupně se však na něj dostávají, avšak legislativa není dostatečně pružná a v době zařazení na seznam, již je často na trhu nová analoga. Částečným řešením tohoto problému by mohla být generická legislativa, která zajišťuje automatické přidání látek z určité větší skupiny na seznam OPS automaticky (van Amsterdam et al., 2013).

NPS byly prodávány prostřednictvím internetu již od konce 90. let minulého století, avšak v České republice se jejich rozšíření zvýšilo koncem roku 2010 díky síti kamenných prodejen. Nejznámější z nich fungovaly pod názvem Amsterdam shop, kde se tyto látky prodávaly jako osvěžovače vzduchu, soli do koupele, hnojiva, chemikálie pro výzkum, vonné směsi, dárkové předměty atd. Prodej v těchto kamenných obchodech byl ukončen 22. dubna 2011, kdy na seznamu omamných a psychotropních látek přibylo 33 nových látek, z toho 30 spadalo mezi NPS. Po uzavření kamenných prodejen jsou NPS stále k dostání na internetu, nebo podpultovém prodeji (EMCDDA, 2013).

V České republice se NPS těšily oblibě převážně na taneční scéně jako levnější náhražka extáze či stimulantů, ale díky kamenným prodejnám se jejich nabídka rozšířila mezi širší populaci rekreačních uživatelů drog. Mezi spotřebiteli se hojně vyskytovali i nezkušení uživatelé, často školního věku, kteří začínali experimentovat s drogami a byli povzbuzeni jejich legalitou, a proto také často považovali tyto látky za zcela bezpečné. Druhou skupinou jsou pak závislí uživatelé tradičních drog, kteří zde hledají alternativu ke klasickým drogám, především pervitinu.

2.1.1. Charakteristika jednotlivých skupin NPS

Pro nové psychoaktivní substance je typické, že neustále dochází k modifikacím jejich struktury, proto je problematické vytvořit komplexní seznam všech těchto látek. Tuto skutečnost potvrduje i jejich rostoucí počet, jen během roku 2015 bylo do systému včasného varování EU (EU early warning system) nahlášeno 101 nových látek (EMCDDA, 2015). Aktuálně se NPS rozdělují buď podle struktury, nebo dle svých účinků do několika hlavních skupin. Dle struktury se NPS dělí na látky odvozené od fenylethylaminu, tryptaminu, piperazinu, katinonu, dále na skupinu syntetických opioidů, disociativní anestetika, celou řadu nových drog typu aminoindanů, benzofuranů a v neposlední řadě také na skupinu chemicky velmi různorodých látek, syntetických kanabinoidů. Dle účinku se nejčastěji dělí na stimulanty, entaktogeny, halucinogeny, sedativní látky, disociativní anestetika a kanabinoidy.

2.1.1.1. Fenylethylamin

Fenylethylamin se řadí mezi přírodní látky přirozeně se vyskytující v lidském mozku. Zde je sekretován septem limbického systému a zastává funkci neurotransmiteru a neuromodulátoru (Burden and Philips, 1980; Saavedra, 1974). Můžeme ho znát také pod pojmem "hormon lásky". Ve větším množství se vyskytuje i v řadě rostlin, či potravinách. Sám o sobě není psychotropně aktivní, ale jeho deriváty se řadí do nejširší skupiny látek s rozmanitým spektrem účinků. Bylo popsáno přes 200 různých derivátů, z nichž většina má vliv na psychické funkce člověka. Do této skupiny patří látky s entaktogenním, stimulačním či halucinogenním účinkem. Jedny z nejznámějších a nejrozšířenějších látek odvozených od fenylethylaminu jsou klasické drogy amfetamin, metamfetamin, extáze (3,4-methyldioxy-N-methylamfetamin, MDMA) (Degenhardt et al., 2014), ale i halucinogen mezkalin. Mezi NPS odvozené od fenylethylaminu patří například i extrémně silné a dlouhodobě působící halucinogeny jako DOB (2,5-dimethoxy-4-bromolamfetamin) či 25I-NBOMe (4-iodo-2,5-dimethoxy-N-(2-methoxybenzyl)fenethylamin) (Rose et al., 2013), náhražky drogy extáze, např. MBDB (N-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamin) či 2C-B (4-bromo-2,5-dimethoxyfenethylamin), nebo modifikované varianty klasických stimulantů (Giroud et al., 1998; Schifano, 2005). Velmi nebezpečné jsou pak paramethoxyamfetamin

(PMA) a paramethoxymetamfetamin (PMMA), které mají účinky velmi podobné MDMA, ovšem mají pomalejší nástup účinků, uživatelé tak mohou mít tendenci užít více dávek, což může mít fatální následky (Johansen et al., 2003; Lin et al., 2007; Refstad, 2003).

2.1.1.2. Katinony

Velkou skupinou, která je z fenylethylaminů často vyčleňována do samostatné skupiny, přestože má podobný strukturální základ, jsou tzv. katinony. Nejznámější drogou z této skupiny je mefedron (4-methylmethkatinon, 4-MMC) (Winstock et al., 2011b). Jeho pouliční název je mňau mňau, mef, dron, nebo MCAT. Jedná se o látku s entaktogenními a stimulačními účinky, v době kdy ještě nebyla kontrolována a masivně se distribuovala přes internet, si ve Velké Británii získala během 1 roku stejnou popularitu jako kokain (Schifano et al., 2011). Dnes existuje obrovská paleta nových syntetických analog, která mefedron po zakázání na trhu postupně nahrazovala. Byly to například methylon (bk-MDMA), nafyron, pentedron (2-methylamino-1-fenylpentan-1-on), pentylon (2-methylamino-1-(3,4-methylendioxyfenyl)pentan-1-on), metedron (bk-PMMA, 4-methoxymethkatinon), bufedron (bk-MBDB, 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)butan-1-on) a 3-MMC (3-methylmethkatinon) (Prosser and Nelson, 2012; Westphal et al., 2012), ale třeba i mírně vzdálenější substance jako např. MDPV (3,4-methylendioxyprovaleron), MDPP (3,4-methylendioxy-alfa-pyrrolidinopropiofenon) případně 6-APB (6-(2-aminopropyl)benzofuran) (Coppola and Mondola, 2012; Kelly, 2011).

2.1.1.3. Tryptaminy

Tryptamin je také látkou tělu vlastní, vyskytující se v mozku savců a plnicí funkci neuromodulátoru. Mnohem důležitější funkci ovšem plní jeho derivát serotonin (5-hydroxytryptamin), který se řadí mezi nejdůležitější neuromodulátory a jehož receptory jsou cílem pro většinu látek z této skupiny. Syntetické deriváty tryptaminu tvoří druhou velkou skupinu látek s psychotropními účinky. Většina tryptaminů má halucinogenní účinky (Blough et al., 2014). Nejznámějšími představiteli této skupiny jsou psilocin (stejně tak jeho fosfátová sůl psilocybin), N,N-diethylamid kyseliny lysergové (LSD) a dimethyltryptamin (DMT). Další známé látky z této skupiny jsou: 5-MeO-DMT (5-methoxy-dimethyltryptamin),

AMT a 5-MeO-AMT (alfa-methyltryptamin a jeho 5 methoxy varianta), DIPT a 5-MeO-DIPT (diisopropyltryptamin a jeho 5 methoxy varianta) (Schifano et al., 2015).

2.1.1.4. Piperaziny

Piperazin ve své čisté formě není psychoaktivní, řada jeho nepsychoaktivních derivátů je dlouhodobě využívána v humánní medicíně, tyto sloučeniny se používají jako antihistaminika, antidepressiva, či farmaka potlačující erektilní dysfunkci, z nichž nejvýznamnější je sildenafil, který je známější pod svým obchodním názvem viagra (Boolell et al., 1996; Terrett et al., 1996). Mnoho látek odvozených od piperazinů má na druhou stranu psychotropní účinky. Nejčastěji mírné entaktogenní a stimulační, a proto se objevují na drogové scéně především jako náhražka extáze (3,4-methylendioxy-N-methylamfetamin, zkráceně MDMA). Čtyři nejznámější látky, které patří do této skupiny, jsou TFMPP (3-trifluoromethylphenylpiperazin); BZP (benzylpiperazin), mCPP (m-chlorofenylpiperazin), MeOPP (4-methoxyfenylpiperazin) (Arbo et al., 2012; Bockaert et al., 1987; de Boer et al., 2001).

2.1.1.5. Syntetické kanabinoidy

Syntetické kanabinoidy jsou velmi nesourodou skupinou látek, patří sem např. naftoylindoly a fenylacetylindoly (např. JWH-018, JWH-073, JWH 250; JWH 203) (EISOHLY et al., 2014), cyklohexylfenoly zkráceně nazývané CP sloučeniny (např. CP-47 a 497-C8) (KOLLER et al., 2014), indoly (např. 5F-PB-22, AM-2201 apod.), indazoly (např. AB-CHIMNACA, APINACA, 5F-AB-PINACA apod.) a tzv. klasické kanabinoidy, avšak synteticky vyrobené. V čistém stavu se jedná buď o pevné látky, nebo olejovité tekutiny, které se aplikují na rostlinný nosič a následně se konzumují nejčastěji kouřením. Zpravidla se jedná o výrobky, které se označují jako směs exotického koření či bylinné směsi a jsou prodávány pod názvem SPICE či SCOPE (Obr. 2) (EISOHLY et al., 2014) Syntetické kanabinoidy jsou účinky podobné THC (Δ^9 -tetrahydrokanabinol) a původně byly vyvinuty jako účinnější či selektivnější ligandy pro serotoninové receptory s potenciálním využitím ve výzkumu ke studiu kanabinoidního systému a i pro potenciální využití v medicíně. Není ovšem pravidlem, že by byly stejně

bezpečné, jako klasické kanabinoidy. Řada z nich je mnohem účinnější než přírodní THC (Schifano et al., 2015), po na některých z nich byly popsány i somatické příznaky z odvykání a po některých byla popsána i řada úmrtí v souvislosti s akutní toxicitou



Obr. 1: Balení drogy spice. Převzato z <http://www.drugfreehomes.org>

2.1.1.6. Disociativní anestetika

Mezi disociativní anestetika se řadí zejména analoga ketaminu, jako jsou methoxetamin ((RS)-2-(ethylamino)-2-(3-methoxyfenyl)cyklohexanon) známý také pod názvy MXE, METH-O případně MEXXY a 3-MeO-PCE (N-ethyl-1-(3-methoxyfenyl)cyklohexanamin). Dále se do této skupiny řadí dextrometorfan (DXM) a deschlorketamin (2-methylamino-2-fenylcyklohexanon) (Bryner et al., 2006; Frison et al., 2016; Tortella et al., 1989). Mezi disociativní anestetika řadíme také substance odvozené od fencyklidinu (PCP), mezi které patří zejména jeho 3- a 4-methoxy analoga, 3-methoxy-PCP (1-[1-(3-methoxyfenyl)cyklohexyl]piperidin) a 4-methoxy-PCP (1-[1-(4-methoxyfenyl)cyklohexyl]piperidin) (Roth et al., 2013). Tyto látky působí na glutamátové receptory, kde především fungují jako antagonisté NMDA subtypu. Jejich účinky jsou prakticky stejné jako u ketaminu nebo PCP. Způsobují změny emotivity, živé sny, derealizaci a depersonalizaci, prožitky blízké smrti, ve vyšších dávkách pak anestezii. Intenzivní psychedelický prožitek je mezi uživateli popisován jako K-hole (Curran and Monaghan, 2001).

2.1.1.7. Syntetické opioidy

Mezi nové syntetické opioidy patří např. substance s názvem AH-7921 ([3,4-dichloro-*N*-(1-(dimethylamino)cyclohexylmethyl)benzamid]), která je zodpovědná již za několik případů úmrtí (Karinen et al., 2014; Kronstrand et al., 2014; Vorce et al., 2014). AH-7921 je stejně jako většina látek z této skupiny selektivním agonistou μ -opioidních receptorů s částečným účinkem také na κ -receptory (Wohlfarth et al., 2016). Dále k syntetickým opioidům řadíme deriváty fentanylu, například butyrfentanyl (N-[1-(2-fenylethyl)-4-piperidinyl]-*N*-fenylbutyramid) a 4-fluorobutyrfentanyl (N-(4-fluorofenyl)-N-[(1-(2-fenylethyl)-4-piperidinyl)]butanamid) (Bäckberg et al., 2015). Látky patřící mezi syntetické opioidy sdílí většinu svých farmakologických vlastností s morfinem. Vyvolávají analgesii, sedaci, případně euforii (Schifano et al., 2015).

2.1.2. Mechanismus účinků

Účinky nových psychoaktivních substancí, většinou imitující původní drogy, jsou díky uživatelům velmi rychle známy, avšak jejich působení na zdraví je v mnoha případech neznámé, protože většina těchto substancí zatím nebyla podrobněji zkoumána (Wood and Dargan, 2012). Ještě méně informací je pak dostupné o možných interakcích s farmaky či dalšími psychoaktivními látkami (Measham et al., 2010). Již drobná změna v chemické struktuře látky může značně ovlivnit její farmakologický či toxikologický profil, aniž by došlo k výraznější změně jejich účinků (Buchanan and Brown, 1988). Nedostatečná znalost těchto faktů proto může mít v krajních případech dokonce fatální důsledky.

NPS ovlivňují především neurotransmiterové systémy centrální nervové soustavy. Nejzásadněji ovlivňují serotonergní, dopaminergní a noradrenergní synapse, dále působí i na synapse acetylcholinergní, glutamatergní (především disociativní anestetika), kanabinoidní a opioidní.

Podle výsledného účinku látky na organismus můžeme rozdělit NPS na stimulanty, entaktogeny, tlumivé látky a psychedelika, kam patří tradiční halucinogeny, delirogeny, disociativní anestetika ale i kanabinoidy. V případě stimulantů, entaktogenů a klasických halucinogenů, jenž působí na monoaminergní systémy, může jedna látka vykazovat kombinovaný efekt, například stimulační i entaktogenní. **Stimulanty** působí zejména na

dopaminový a noradrenalinový systém. Nejčastěji brání zpětnému vychytávání dopaminu/noradrenalinu nebo zvyšují jejich vyplavování. Zvýšená dostupnost a aktivita těchto neurotransmiterů vede k celkové stimulaci a euforii. Stimulační efekt mají např. syntetické katinony, pyrovalerony, benzofurany a halogenované deriváty klasických stimulantů amfetaminu a metamfetaminu, z klasických drog pak především amfetamin, metamfetamin či kokain. **Entaktogenní** účinky vyvolávají látky zasahující do serotoninového systému. Zvyšují vyplavování serotoninu, zabraňují jeho zpětnému vychytávání či blokují degradaci. Výsledným efektem je tedy jeho zvýšená koncentrace na synapsi. Entaktogeny navozují výraznou euforii, pocity štěstí a lásky, potřebu lidské blízkosti, doteku a sdílnosti, klasickým příkladem je droga extáze (MDMA, 3,4-metyhlendioxyamfetamin) a její nejbližší analoga MDA (3,4-metyhlendioxyamfetamin), MDEA (3,4-metyhlendioxy-N-ethylamfetamin) a MBDB (N-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butamin, dále sem patří některé fenyletylaminy např. 2C-B (4-bromo-2,5-dimetyoxyfenyletylamin) a aminoindany, např. MDAI (5,6-metyhlendioxy-2-aminoindan). **Klasické halucinogeny** působí také na serotoninový systém, na rozdíl od entaktogenů však přímo aktivují konkrétní typ serotoninového receptoru (5-HT_{2A}). Mezi nové syntetické halucinogeny patří řada látek ze skupiny tryptaminů a fenylethylaminů, z klasických drog pak psilocybin, LSD (N,N-dietylamid kyseliny lysergové) či mezkalin.

Syntetické kanabinoidy (stejně jako THC) mohou reagovat s velkým počtem různých typů struktur. Nejčastěji s kanabinoidními receptory CB1, které jsou rozmístěny v celém těle, nejvíce pak v CNS, a CB2, které jsou hlavně na buňkách imunitního systému a v tkáních na periférii, ale přítomny jsou i v mozku (Galiegue et al., 1995; Van Sickle, 2005), ale také například s transportérem pro anandamid či FAAH, vaniloidními a serotonergními receptory. Tomu odpovídá i stejný účinek jako má marihuana – uvolnění, útlum, euforie. V porovnání s THC jsou ale účinky navozené syntetickými kanabinoidy v některých případech efektivnější a mají delšího trvání.

Disociativní anestetika působí jako antagonisté glutamátových NMDA receptorů. Při vysokých dávkách, kdy se již zcela rozvíjejí jejich anestetické účinky, působí také na opioidní receptory (Hirota and Lambert, 1996).

2.1.3. Epidemiologie

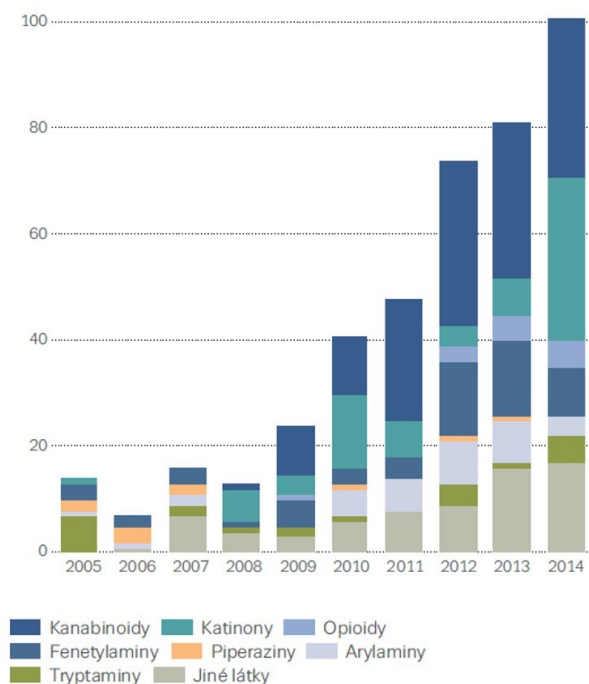
Začátek využívání syntetických drog se datuje již do 40. let 20. století. V této době se objevují i případy předávkování neznámými látkami (Ziporyn, 1986).

Díky systému včasného varování EU, bylo v roce 2015 zachyceno 101 nových psychoaktivních látek, což byl zatím vůbec nejvyšší počet v historii (Graf 1). V roce 2015 pak bylo zachyceno 98 nových látek (EMCDDA, 2016). Od roku 2009 do roku 2013 tvořily nejvyšší podíl z nově zachycených látek syntetické kanabinoidy (EMCDDA, 2015). V roce 2014 se však dostávají na první místo syntetické katinony, kdy v roce 2014 jich bylo zachyceno 31, v roce 2015 pak 26, přitom kanabinoidy patří stále k druhým nejzastoupenějším (EMCDDA, 2016). Populární jsou NPS zejména ve Velké Británii, Nizozemsku, severských státech a Maďarsku.

V České republice je výskyt nových psychoaktivních substancí zaznamenán přibližně od roku 2010. Avšak díky dominanci drog klasických jde stále o výskyt spíše sporadický. V roce 2014 bylo hlášeno dohromady 22 nových psychoaktivních substancí, 13 z nich se na území ČR objevilo poprvé a u 2 z nich se jednalo o první výskyt v rámci celé Evropské unie. Nejčastěji šlo o katinony a fenetylaminy. Látkou s největším zachyceným množstvím byl katinon MDPPP, konkrétně šlo celkem o 2,2 kg. Oproti roku 2013 však došlo ke snížení počtu substancí, v tomto roce bylo hlášeno 48 NSD, 12 z nich poprvé v ČR a 3 z nich poprvé v rámci EU (Mravčík et al., 2014).

NPS jsou aktuálně dostupné zejména na internetu a to především díky redukci nabídky kamenných obchodů v dubnu roku 2011. Národní monitorovací středisko (NMS) v roce 2015 objevilo 33 internetových obchodů se stránkami v českém jazyce, 9 z nich se specializovalo výhradně na NPS. V jejich nabídce byly nejhojněji zastoupeny syntetické katinony (35 substancí), kanabinoidy (34) a fenetylaminy (24). Látkou nejčastěji se vyskytující v nabídce těchto obchodů byl katinon α -PVP, který nabízelo dohromady 9 obchodů. Dohromady bylo nabízeno 145 různých látek, což je více než trojnásobek oproti roku 2014, kdy bylo na internetu možno zakoupit pouze 42 substancí (Mravčík et al., 2015).

Počet a kategorie nových psychoaktivních látek hlášených do systému včasného varování EU, 2005–2014



Graf 1: Převzato z EMCDDA (2015). Evropská zpráva o drogách. Luxemburg: Úřad pro publikace Evropské unie.

2.1.4. Zdravotní rizika

Z uživatelského hlediska je v současné době velmi málo vědecky či klinicky podložených informací zabývajících se akutní či chronickou toxicitou NPS. Důsledkem jsou nedostatečné, mnohdy chybějící údaje o potencionálním nebezpečí, které je spojeno s jejich užíváním. Většina informací o akutních a chronických účincích NPS je dostupná zejména na základě subjektivních hodnocení uživatelů a následného sdílení zkušeností na internetových fórech. Veřejné průzkumy, dotazníky nebo případové studie jsou dalším způsobem sběru dat (Carhart-Harris et al., 2011; Crew, 2011; Winstock et al., 2011a).

Užívání NPS může mít neblahý vliv jak na fyzický, ale tak i psychický stav lidského organismu. Důležitým rizikovým faktorem, společným pro všechny psychoaktivní látky, je současný psychický stav a psychiatrická anamnéza jedince a jeho rodiny. Pokud se v rodině vyskytuje psychiatrické onemocnění, existuje statisticky nezanedbatelná šance, že NPS mohou být aktivačním mechanismem pro vznik či rozvoj problémů psychiatrického rázu (Krebs and Johansen, 2013). Dalšími nezanedbatelnými faktory, které se podílejí na

zvyšování zdravotního rizika spojeného s užíváním NPS, mohou být: velikost dávky NPS, frekvence užívání, způsoby podání NPS, zdravotní stav a v neposlední řadě jejich interakce s jinými drogami nebo farmaceutickými léčivy (Cosbey et al., 2014; Dickson et al., 2010; EMCDDA and Europol, 2010; UNODC, 2013).

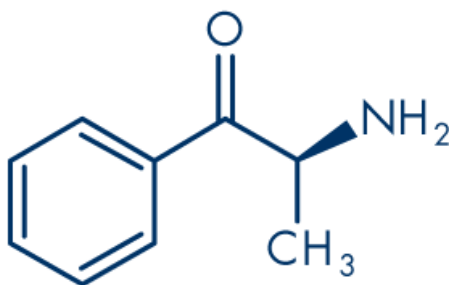
Rizikový způsob podání NPS je intravenózní aplikace. Užívání injekčních stříkaček je spojeno se zvýšeným rizikem nákazy krví přenosnými, ale také ostatními, infekčními chorobami. Mezi nejčastější infekce přenášené krví v této skupině obyvatel patří virus lidské imunodeficiency (HIV) a virus hepatitidy typu B a C (EMCDDA, 2014).

Jelikož se experimentální část diplomové práce zabývá akutními účinky nafyronu, syntetického katinonu, zaměříme se v následujících kapitolách na zdravotní rizika a farmakologický profil NPS z řad katinonů.

2.2. Katinony

2.2.1. Charakteristika

Katinon (Obr. 2) je látka obsažená v rostlině Katě jedlé (*Catha edulis*). V oblastech západní Afriky a na Arabském poloostrově jsou listy tohoto keře používány jako stimulanty (Brenneisen et al., 1990). Již po dlouhá staletí hraje žvýkání listů Katy důležitou roli v kulturních a sociálních tradicích tamějších komunit (Valente et al., 2014). Identifikace katinonu jakožto hlavní psychoaktivní složky listů Katy vykazující farmakologické vlastnosti podobné amfetaminu postupně vedla k syntéze mnoha derivátů této látky. Tyto sloučeniny, jejichž účinek je často mnohem silnější než je tomu u katinonu, byly původně určeny k terapeutickým účelům, avšak záhy začaly být zneužívány pro svůj euforický účinek (Valente et al., 2014).



Obr. 2: Strukturální vzorec katinonu. Převzato z www.emcdda.europa.eu

Katinony jsou nejčastěji prodávány v práškové či krystalové formě, mají bílou, hnědou či žlutou barvu a jsou bez zápachu (Zawilska and Wojcieszak, 2013). K jejich výrobě dochází nejspíše v Indii a Číně, odkud jsou do Evropy dováženy, kde následně dojde k jejich prodeji na černém trhu, nebo jsou k dostání jako legal-highs (EMCDDA, 2015). K rozvoji jejich prodeje došlo především díky snižující se kvalitě a dostupnosti drog běžně prodávaných na černém trhu a také díky jejich přechodně legálnímu statusu (Katz et al., 2014). Obvykle se dají zakoupit pod označením „koupací sůl“, „hnojivo pro rostliny“ či „research chemical“, většina z nich je také opatřena varováním „nevhodné pro konzumaci“, případně „netestováno na toxické účinky“, avšak jsou prodávány se záměrem vyvolat stejný efekt jako některé jiné již rozšířené drogy, například kokain, extáze, případně metamfetamin (Zawilska and Wojcieszak, 2013).

2.2.2. Farmakodynamika a farmakokinetika katinonů

Katinony zvyšují synaptickou hladinu katecholaminů, především serotoninu, dopaminu a noradrenalinu. Zvýšení hladiny těchto neurotransmiterů je docíleno blokací transportérových systémů, které jsou zodpovědné za zpětné vychytávání těchto neurotransmiterů ze synaptické štěrbině (Cozzi et al., 1999), avšak jejich selektivita pro transportérové systémy DAT, SERT a NET se mezi jednotlivými substancemi značně liší (Simmler et al., 2013a). Dalším mechanismem vedoucím k navýšení jejich hladiny je zvýšené vyplavování z presynaptického zakončení neuronu, inhibice enzymů zodpovědných za jejich odbourávání (Osorio-Olivares et al., 2004). Zvýšená hladina neurotransmiterů v synaptické štěrbině vede ke zvýšení stimulace postsynaptických receptorů jak v mozku, tak na periférii.

Obecně syntetické katinony přecházejí přes hematoencefalickou bariéru hůře než amfetaminy a to především díky β -keto skupině, která značně zvyšuje jejich polaritu (Coppola and Mondola, 2012, Krikorian, 1984), proto je pro vyvolání účinku srovnatelného s amfetaminy nutno užít vyšší dávku (Krikorian, 1984). Výjimku z tohoto pravidla však tvoří pyrolidinové deriváty (Gibbons and Zloh, 2010), mezi které patří například MDPV, MDPPP a nafyron.

2.2.3. Rizika spojená s užíváním katinonů

Po požití katinonů jsou nejčastěji pozorovány kardiovaskulární (tachykaridie, arteriální hypertenze, palpitace, dyspnoe, bolest na hrudi, vazokonstrikce), neurologické sympatomimetické (bolest hlavy, mydriáza, parestezie, záchvaty, třes), psychiatrické (agitace, agrese, zmatení, halucinace, paranoia, úzkost, anhedonie, nespavost a psychózy), metabolické (hyponatrémie, hypokalémie a acidóza), případně gastrointestinální (pocit na zvracení, zvracení, bolest břicha) a další (myoklonus, horečka, bruxismus) symptomy (Murphy et al., 2013; Ross et al., 2011; Spiller et al., 2011; Wood et al., 2010).

U oblíbené drogy mefedronu byly popsány i závažnější dopady na zdraví uživatelů jako např. akutní myokarditida, přisuzována přímému toxickému působení na myocyty případně skrze účinek na imunitní systém (Nicholson et al., 2010). Další závažná rizika spojená s užíváním katinonů jsou metabolické acidózy, multiorgánové selhání, neurotoxicita, hepatotoxicita, hypertermie a serotoninový syndrom (Maurer et al. 2004). Serotoninový syndrom je stav, kdy dojde k obrovskému zvýšení hladin extracelulárního serotoninu, typicky za situace kdy je současně omezeno jeho zpětné vychytávání a/nebo degradace. Tato nadměrná serotoninová aktivita vytváří mnoho symptomů od málo závažných až po ty fatální: třes, pocení, tachykardie, hypertenze, hypertermie, halucinace, zvracení, mentální zmatení, kóma (Karch, 2015; Rasimas, 2012).

Hlavním rizikem spojeným s užíváním katinonů, podobně jako u ostatních nových syntetických drog, je předávkování. Uživatel, který drogu zakoupí, si nikdy nemůže být naprosto jistý jejím složením. Ve studii (Brandt et al., 2011) jsou všechny produkty zakoupené na internetu pod označením NRG-1 a NRG-2 směsí různých katinonů. V předchozí studii (Brandt et al., 2010a) byl nalyon obsažen dokonce pouze v jednom ze třinácti vzorků NRG-1. Většina ze vzorků byla také směsí různých katinonů, nejčastěji mefedronu, butylonu, 4-metyl-N-etyl katinonu, flephedronu a MDPV (3,4-metylendioxypyrovaleron). Některé vzorky obsahovaly pouze kofein a v některých byla nalezena lokální anestetika. Ve studii Páleníček a Kuchař (2011) byl přes internetové stránky zakoupen preparát s názvem Kamikadze, který dle následné analýzy obsahoval mefedron, MDPV a 4-MEC.

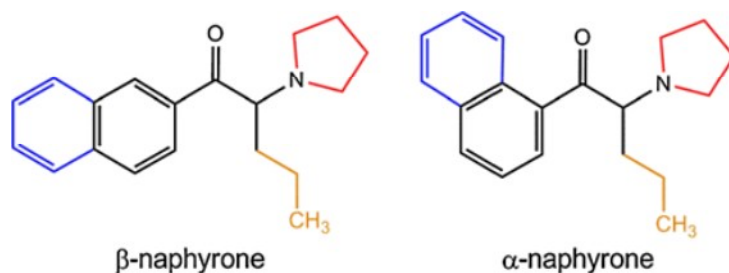
V souvislosti s požitím syntetických katinonů jsou zaznamenány i fatální případy intoxikací. V roce 2010 bylo v Anglii zaznamenáno 46 případů úmrtí, která jsou spojována s přítomností mefedronu (EMCDDA, 2011), v letech 2008 a 2009 k úmrtí dvou mladých mužů

ve Švédsku (Wikstrom et al., 2010). Tamtéž došlo v roce 2012 po proniknutí drogy s názvem 5-IT či 5-API (5-(2-aminopropyl)indol) na trh k další sérii úmrtí (Kronstrand et al., 2013). Mezi katinony, jejichž užití mělo smrtelné následky, patří také methylon (Pearson et al., 2012), methoxetamin ([2-(3-methoxyfenyl)-2-(ethylamono-cyklohexanon)]) (Wikstrom et al., 2013), mefedron (Loi et al., 2015) a pentedron (Sykutera et al., 2015). Elliott and Evans (2014) dále poukazují na vysokou prevalenci (41 %) katinonů forenzně detekovaných *post mortem* u mechanických sebevražd.

2.3. Nafyron

2.3.1. Charakteristika

Nafyron (naftylpyrovaleron), někdy také nazýván NRG-1 ,O-2482, případně Energy 1 je syntetická droga ze skupiny katinonů. Ačkoli se dříve předpokládalo, že jako NRG-1 se na nelegálním trhu vyskytuje pouze β -izomer nafyronu, nyní je již jasné, že nafyron se vyskytuje na trhu v obou isomerech (Obr. 3), buď jako 1-naftalen-2-yl-2-pyrrolidin-1-ylpentan-1-on (β -nafyron), případně 1-naftalen-1-yl-2-pyrrolidin-1-ylpentan-1-on (α -nafyron) (Brandt et al., 2010b).



Obr. 3: α - a β -izomer nafyronu, upraveno podle Valente et al. 2014

Nafyron se objevil na trhu spolu s dalšími syntetickými katinony brzy po přidání mefedronu na seznam zakázaných látek (Schifano et al. 2011).

2.3.2. Farmakodynamika a farmakokinetika

Nafyron se chová jako neselektivní inhibitor vychytávání monoaminů, inhibuje kanály SERT, DAT a NET (Simmler et al., 2013). Z tohoto důvodu bývá někdy také spolu s dalšími látkami se stejným mechanismem účinku označován jako triple reuptake inhibitor (Vardakou et al., 2012). Všechny monoaminové transportéry tedy blokuje s přibližně stejnou selektivitou. *In vitro* DAT/SERT ratio je 2,0 (1,5 - 2,7), podobně jako u některých dalších katinonů – etylonu, mefedronu, butylonu a metylonu a jako u kokainu (Simmler et al., 2013a).

Nafyron je přibližně tisíckrát lipofilnější než jemu příbuzné metamfetaminové deriváty, MDMA a mefedron (Meltzer et al., 2006). Vysoká lipofilita zajišťuje vyšší prostupnost látky hematoencefalickou bariérou. Studie *in vitro* naznačují, že nafyron inhibuje všechny 3 monoaminové transportéry s potencí zhruba desetkrát vyšší než je tomu u kokainu (Meltzer et al., 2006).

Doba, za kterou klesne koncentrace nafyronu v krevní plasmě na polovinu, může dosahovat přibližné délky až 34 hodin (Derungs et al., 2011). Tento odhad je ovšem nutno brát s rezervou, avšak eliminace je pravděpodobně výrazně delší, než je tomu u jiných amfetaminů, včetně MDMA a metamfetaminu, jejichž koncentrace v krevní plasmě klesá na polovinu za 8-12 hodin. (Derungs et al., 2011).

2.3.3. Dávkování a nepříznivé účinky

Uživatelé uvádějí, že dávka potřebná k dosažení efektu se pohybuje mezi 20-25 mg. Vzhledem k tomu, že jde o dávku velice nízkou, při záměně nafyronu za jinou substanci, či při pouhé neznalosti tohoto faktu, vzniká vysoké riziko předávkování (Vardakou et al., 2012). Ačkoli je dostupné velice málo toxikologických informací o působení nafyronu, předpokládá se, že hlavní nepříznivé účinky budou podobné jako u mefedronu, případně dalších katinonů (Zaitso et al., 2014).

V případové studii Derungs et al. (2011) se 40 hodin po požití jednorázové dávky 100 mg nafyronu dostavil 31 letý muž na místní pohotovost. Neměl zkušenosti s dávkováním, proto použil stejné dávkování jako u MDMA. Zhruba 5 hodin po požití se u něj objevili první problémy, zhoršená koncentrace, rozostřené vidění a zvyšující se neklid. Pacient nemohl dvě

noci spát a cítil se velmi nervózní. Jako další příznaky udal vizuální, akustické a taktilní halucinace a strach ze smrti.

2.4. Neurobiologie závislosti

Drogová závislost se projevuje jako komplexní onemocnění CNS charakterizované kompulsivním, nekontrolovaným bažením po droze, a snahou obstarat si drogu, přestože její užívání má mnoho nepopíratelně závažných, někdy dokonce zdraví a život ohrožujících, následků. Snaha získat další dávku drogy se může stát středobodem života závislé osoby (Vetulani, 2001).

Pouze malé procento osob, které je během svého života drogám vystaveno, se na nich stane závislým. Faktory ovlivňující vznik této závislosti jsou jednak genetické predispozice, fáze vývoje jedince včetně psychologických aspektů, a v neposlední řadě prostředí (sociální faktory), v němž se jedinec vyskytuje (Volkow and Li, 2005).

Vznik a rozvoj závislosti lze rozdělit do tří hlavních fází. První z nich je rozvoj závislosti, druhá přesun k závislosti a třetím stádiem je již formovaná závislost. Klíčová pro rozvoj závislosti je role dopaminu, který hraje nezastupitelnou úlohu v systému odměny (Volkow et al., 2011). Nejdůležitější je patrně mesolimbická dopaminergní dráha. Nigrostriatální dráha spolu s mesokortikální dráhou pravděpodobně také hrají svou úlohu jak v systému odměny, tak i při vzniku závislosti, ale ne tak významnou (Wise, 2009). Kromě dopaminu se zde v menší míře uplatňuje i acetylcholin (Vetulani 2001). Závislost kromě systému odměny ovlivňují patrně také další okruhy, zapojené do procesů podmiňování, exekutivních funkcí a motivace (N. D. Volkow et al. 2011).

Dopaminergní transmise je za normálních okolností zvýšená při jednání, které způsobuje uspokojení, jde například o pití, stravování a sexuální aktivitu. Jak tyto přirozené stimuly, tak také umělé chemické stimuly, které aktivují centrum odměny, působí na stejná místa mozku, avšak oproti přirozeným stimulům nejsou umělé kontrolovány zpětnovazebnými mechanismy, které aktivují averzivní centra (Vetulani 2001). Drogy tak narušují přirozenou funkci systému odměny a potlačují schopnost ostatních stimulů tento systém aktivovat, pro navození příjemných pocitů je pak nutné opětovné užití drogy (Hyman et al., 2006)

Důsledkem chronického užívání jsou neuroadaptační změny, tolerance a senzitivace. Toleranci navozuje většina substancí, které jsou schopny vytvořit závislost. Je charakterizována postupným sníženým účinkem drogy, tedy postupným snížením pocitu uspokojení po aplikaci stejné dávky (Vetulani, 2001).

2.5. Animální modely

2.5.1. Test otevřeného pole (OFT)

Test otevřeného pole (Open Field test, OFT) je jedním z nejčastěji používaných behaviorálních testů. S jeho použitím je možno stanovit míru spontánní aktivity, exploračního chování a anxiety (Archer, 1973; Hall, 1934). Test zpravidla probíhá ve stěnami ohraničené aréně čtvercového tvaru, používají se ovšem i aparatury kruhové, nicméně důležitým předpokladem je vždy výrazně větší plocha podstavy, než je plocha podstavy domovského boxu zvířete (Hall, 1934). Velmi důležitá je také intenzita nasvícení aparatury, která je přímo úměrná vyvolané míře anxiety a stresu (Stanford, 2007; Walsh and Cummins, 1976).

Nejčastěji měřenými parametry jsou celková délka trajektorie lokomoce prostorová distribuce pohybu zvířete v jednotlivých částech aparatury, kdy setrvávání u stěn aparatury (tigmotaxe) je považováno za přímo úměrné míře vyvolané anxiety (Stanford, 2007; Walsh and Cummins, 1976). Míra anxiety je rovněž přímo úměrná intenzitě defekace (počet bolusů). Dále lze hodnotit prvky chování jako vztyčování, čištění, nehybnost, čichání apod. (Stanford, 2007; Walsh and Cummins, 1976).

Podání psychoaktivních látek často vede k výrazným změnám chování, které lze s použitím OFT zachytit. Přirozený vzorec exploračního chování lze popsat následovně - zvíře se po umístění do OFT aparatury nejdříve pohybuje podél jejích stěn (tigmotaxe), po uplynutí několika minut (zpravidla pět, např. Archer, 1973) se odvažuje prozkoumat i centrální část aparatury, poté se zpravidla již zdržuje na jednom místě, kde se čistí - toto chování je považováno za ukazatel temporální habituace (Eilam and Golani, 1989).

Po podání psychoaktivních látek je tento přirozený vzorec narušen (Páleníček et al., 2011), což se projevuje zkrácením či úplným vymizením temporální habituace, neadekvátní mírou lokomoce (hyperlokomoce či její významná inhibice) nebo nadměrným výskytem

stereotypických prvků chování (typicky točení v kruhu, oklepávání). Tyto změny jsou pro některé skupiny látek typické - např. stimulanty vyvolávají zpravidla hyperlokomoci a zvyšují frekvenci výskytů stereotypických prvků chování, zatímco halucinogeny mají zpravidla inhibiční či bifázický účinek na lokomoci (např. Páleníček et al. 2005).

2.5.2. Prepulzní inhibice akustické úlekové reakce (PPI ASR)

Test prepulzní inhibice akustické úlekové reakce (Prepulse Inhibition of Acoustic Startle Reaction, PPI ASR) měří hodnotu úlekové reakce po náhlém akustickém podnětu a následně porovnává reakci na podnět stejné intenzity, zaznamenanou po krátkém akustickém prepulzu, o intenzitě jen o málo větší, než je intenzita pozadí (šum). Po prezentaci prepulzu dochází za běžných okolností ke snížení úlekové reakce - prepulzní inhibici (Geyer et al., 2001), což odráží schopnost adekvátně filtrovat informace z okolního prostředí (Braff et al., 2001). Prepulzní inhibice je regulována neuronálním okruhem skládajícím se ze struktur středního mozku a mozkového kmene, v regulaci jsou zapojeny neurotransmitery glutamát, dopamin, acetylcholin a serotonin (Dissanayake et al., 2013).

Test se používá jak při testování na animálních modelech, tak u lidských pacientů (Abel et al., 1998). Typicky se využívá pro testování účinku potenciálních antipsychotik v animálním modelu (Rigdon and Viik, 1991) a to proto, že k narušení senzomotorického zpracování informací dochází typicky u pacientů s psychózami (Perry et al., 2001). Také některé z psychoaktivních látek, především halucinogeny, ale také stimulanty, výrazně mění hodnoty naměřené při testu oproti kontrolám (Páleníček et al. 2005).

2.5.3. Test podmíněné preference místa (CPP)

Test podmíněné preference místa (conditioned place preference, CPP) je založen na principu klasického podmiňování. Principem je spojení nepodmíněného podnětu (snadno rozpoznatelného prostředí) a stimulu specifického pro toto prostředí jako podmíněného podnětu (Pearce and Hall, 1980). Prostřednictvím CPP testu je mimo jiné možné ohodnotit adiktivní potenciál drog.

Existuje řada variant CPP sloužícího k ohodnocení adiktivního potenciálu drog, nicméně základní princip je vždy stejný. První den je zvíře přivyknuto na prostředí aparatury

(zpravidla 15 min expozice), následující den probíhá test před začátkem podmiňování (zpravidla 15 min expozice), kdy je zvířeti umožněn pohyb po celém prostoru aparatury, zjištěná preference pro jednotlivé kompartmenty je následně brána jako základní (baseline). Následuje podmiňovací fáze, kdy je zvířeti podávána studovaná látka, bezprostředně po její aplikaci je umístěno do asociovaného kompartmentu CPP aparatury, následující den je mu administrováno pouze vehikulum a po jeho podání je umístěno do neasociovaného kompartmentu. Podmiňovací fáze trvá zpravidla osm dní (čtyři sezení - aktivní látka, čtyři sezení - vehikulum). Délka jednotlivých sezení se odvíjí od farmakokinetiky sledované látky, v případě stimulantů je to zpravidla 30 minut (Cunningham et al., 2006) Po skončení podmiňování následuje test po podmiňování - zvířeti je umožněn volný pohyb po všech částech aparatury (15 min expozice), zjištěná preference je srovnána se základní (baseline) preferencí. Pokud se zvířata zdržují signifikantně delší dobu v asociovaném kompartmentu, lze mluvit o vzniku podmíněné preference místa a ohodnotit účinek látky jako adiktivní (Cunningham et al., 2006).

3. Cíle a hypotézy

Cílem diplomové práce je v animálním modelu:

1. Ohodnotit behaviorální (lokomoce, anxieta a prepulzní inhibice akustické úlekové reakce) a fyziologické (tělesná teplota) změny vyvolané akutním podáním nafyronu.
2. Stanovit adiktivní potenciál nafyronu pomocí testu podmíněné preference místa.

Testovány jsou tyto hypotézy:

H1 a: Akutní podání nafyronu vede ke změně intenzity lokomoce.

- Změna intenzity lokomoce je závislá na velikosti podané dávky.
- Intenzita lokomoce se mění v závislosti na čase, který uplynul od podání látky.

H1 b: Akutní podání nafyronu vede ke změně hladiny anxiety.

- Velikost změny hladiny anxiety je závislá na velikosti podané dávky.

H2: Akutní podání nafyronu vede k narušení prepulzní inhibice akustické úlekové reakce.

- Míra narušení prepulzní inhibice akustické úlekové reakce je závislá na velikosti podané dávky.

H3: Akutní podání nafyronu povede ke změně tělesné teploty.

- Velikost změny tělesné teploty se liší u zvířat držných po podání látky samostatně a zvířat držných ve skupině.
- Velikost změny tělesné teploty je závislá na velikosti podané dávky.

H4: Chronické podávání nafyronu povede ke vzniku podmíněné preference místa.

- Míra vyvolané preference je závislá na velikosti podávané dávky.

4. Materiál a metody

4.1 Experimentální zvířata

Experimenty open field test a PPI byly provedeny na potkaních samcích kmene Wistar (Hannoverský chov, Velaz) o hmotnosti 200 – 250 g. Test CPP byl proveden na potkanech Wistar (CharlesRiver). Potkani byli drženi po třech ve standardních chovných nádobách umístěných ve zvěřinci se stálými podmínkami (teplota: $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, vlhkost: 30 - 70%) a 12 hodinovým světelným režimem (světelná fáze 8 – 16 hod). Přístup k vodě a potravě byl po celou dobu trvání experimentů *ad libitum*. Po doručení byla zvířata 10 dní navykána na prostředí zvěřince a experimentátory (handling min. 5 min/zvíře/den). Před pokusy byly zvířatům injekčně s.c. aplikovány látky - nafyron či vehikulum (fyziologický roztok) a to vždy v objemu 2 ml/kg. Experimenty byly prováděny mezi 7:00 a 13:00 hod. V případě měření tělesné teploty a testu podmíněné preference místa byla manipulace se zvířaty delší, její trvání však nikdy nepřekročilo 17:00.

Veškeré experimenty byly provedeny v souladu s platnou legislativou týkající se ochrany zvířat.

4.2 Látky

Nafyron (1-naftalen-2-yl-2-pyrrolidin-1-ylpentan-1-on) byl pořízen přes internet a následně přečištěn na 98 až 99 % (Alfarma, s.r.o). Pro aplikaci byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku tak, aby mohl být pokusným zvířatům aplikován v objemu 2 ml/kg. Nejvyšší koncentrace musela být při rozpouštění zahřívána.

4.3 Farmakokinetická analýza

Určení hladiny nafyronu v séru a mozkové tkáni

Pro farmakokinetickou analýzu byl dohromady 48 zvířatům injekčně aplikován nafyron. Zvířata byla po 30, 60, 120, 240 a 480 minutách usmrcena, vždy v počtu 8 jedinců (byla použita zvířata z behaviorálních experimentů). Séra i celé mozky byly uskladněny při teplotě -20°C až do provedení farmakokinetické analýzy. Veškeré odebrané orgány, tedy mozek, játra, ledviny a krev, byly zaslány na farmakokinetickou analýzu do ÚSLTOX - oddělení Toxikologie, Ke Karlovu 2, 128 08, Praha 2.

Příprava vzorku na LC/HRMS (kapalinová chromatografie s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem)

Sérum

200 µl séra bylo smícháno s 0.5 ml 0.1 M fosfátového pufru (pH=6.0) a vnitřním standardem ISTD (nafyron-D8), dle odpovídajícího kalibračního rozmezí. Poté byla provedena extrakce SPE (extrakce na pevné fázi, Solid phase extraction) na kolonkách Bond Elut Certify.

Tkáně

250 mg tkáně bylo homogenizováno s 5 ml methanolu a s odpovídajícím množstvím vnitřního standardu ISTD (nafyron-D8). Následně se vzorek sonifikoval v ultrazvukové lázni po dobu 20 minut, poté vymrazil při -25 °C a následovně centrifugoval při 10.000 RPM (2 min). Poté byl supernatant odpařen do sucha a odparek rozpuštěn ve 3 ml fosfátového pufru (pH=6.0). Následovalo provedené extrakce SPE.

SPE, BE Certify

1. Kondicionace kolonek: 1 ml MeOH, 1 ml fosfát
2. Nanesení vzorku na kolonku
3. Promytí: 4 ml H₂O, 2 ml 0.1 M HCl a ml směsi MeOH/H₂O (50/50)
4. Eluce: 3 x 0.5 ml čerstvě připravené eluční směsi (CH₂Cl₂ : IPOH : NH₄OH, 8 : 2 : 0.2), následně byl eluát odpařen do sucha a odparek rozpuštěn v 200 µl mobilní fáze a následně nastříknut

LC/HRMS podmínky

Analýzy byly provedeny na kapalinovém chromatografu Dionex Ultimate 3000 UHPLC s hmotnostním detektorem Exactive Plus-Orbitrap MS (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany), s HESI-II iontovým zdrojem. Chromatografická separace vzorků séra a tkání byla provedena na koloně Kinetex PFP 100A (50 × 2.1 mm, 2.6 mm) s předkolonou Security Guard Cartridge PFP 4 × 2.0mm (Phenomenex) při průtoku 400 ml/min, gradientová eluce 10 mM mravenčanem amonným v 0.1% kyselině mravenčí jako mobilní fází B. Gradient 0 min 5% B, 4 min 45% B, 5–6min při 95%.

MS (hmotnostní spektrometrie) podmínky: full MS, pozitivní skenovací mód od 50 do 500 m/z, rozlišení 70.000 FWHM (skenovací rychlost 3 Hz), napětí elektrospreje 3 kV, teplota kapiláry 320 °C.

4.4. Behaviorální experimenty

4.4.1. Test otevřeného pole

Test otevřeného pole (Open Field test, OFT) probíhal v odhlučněné místnosti, v níž byla umístěna rovnoměrně nasvícená plastová aréna čtvercového tvaru (68 x 68 x 30 cm). Na začátku každého sezení do ní bylo šetrně umístěno zvíře (15 nebo 60 minut po aplikaci látky). Následně byla po dobu 30 minut automaticky registrována jeho lokomoční aktivita (délka trvání pokusu vychází z farmakokinetických dat, viz kap. Výsledky). Po skončení každého sezení byla pokusná aréna důkladně vymyta a vytřena 30% roztokem ethanolu s cílem eliminovat případné pachové značky, jejichž přítomnost by mohla vést ke zkreslení výsledků.

Takto bylo otestováno celkem 80 potkanů, rozdělených do pokusných skupin na základě druhu podané látky (nafyron/vehikulum), dávky nafyronu a časového rozestupu aplikace-začátek testu na (i) NAFYRON 5 mg/kg, 15 min, (ii) NAFYRON 10 mg/kg, 15 min, (iii) NAFYRON 20 mg/kg, 15 min, (iv) VEHIKULUM 15 min; (v) NAFYRON 5 mg/kg, 60 min, (vi) NAFYRON 10 mg/kg, 60 min, (vii) NAFYRON 20 mg/kg, 60 min, (viii) VEHIKULUM 60 min; N=10/pokusná skupina.

Registrace dat a extrakce požadovaných parametrů byla provedena v programu EthoVision Color Pro v. 3.1.1 (Noldus, Netherlands). Intenzita lokomoční aktivity byla vyjádřena (i) celkovou délkou trajektorie pohybu zvířete za celou dobu trvání testu a (ii) akutní délkou trajektorie pohybu zvířete v 5 minutových intervalech, míra anxiety byla stanovena na základě (iii) celkového času stráveného v centru arény (suma časů strávených v devíti centrálních zónách, $T_{\text{centre}} = \sum \text{čas}_{1-9}$) a (iv) pravděpodobnosti výskytu zvířete v periferní části arény - thigmotaxe ($\sum f_{\text{periferní zóny}} / \sum f_{\text{všechny zóny}}$; kde f = celkový počet výskytu jedince v každé zóně). Prostorové rozdělení podstavy pokusné arény viz Obr. 4.

periferní	periferní	periferní	periferní	periferní
periferní	centrální	centrální	centrální	periferní
periferní	centrální	centrální	centrální	periferní
periferní	centrální	centrální	centrální	periferní
periferní	periferní	periferní	periferní	periferní

Obr. 4: Prostorové rozdělení podstavy OFT pokusné arény - celkem 25 identických čtverců, z toho 9 centrálních a 16 periferních.

4.4.2. Prepulzní inhibice akustické úlekové reakce

Měření prepulzní inhibice akustické úlekové reakce (*Prepulse Inhibition of acoustic startle*, PPI ASR) bylo realizováno v boxech SR-LAB (San Diego Instruments, California, USA). Akustické stimuly produkoval vysokofrekvenční reproduktor umístěný ve výšce 24 cm nad podložkou. Průměrná úleková reakce byla detekována piezoelektrickým akcelerometrem, digitalizována a použita pro analýzu.

Všechna zvířata byla 2 dny před vlastním testováním aklimatizována na testovací aparaturu, kde byla ponechána po dobu 5 minut a byla vystavena 6 stimulům o intenzitě 115 dB v délce trvání 40 ms. Nastavená intenzita hluku (šumu) pozadí byla 75 dB. V testovací den byla zvířatům 15 nebo 60 minut před započítáním pokusu aplikována látka. Testovací úloha se skládala ze 72 sekvencí. Intervaly mezi jednotlivými sekvencemi (ITI) byly 4–20 s a nastavený šum pozadí byl 75 dB. Aklimatizační perioda trvala 5 min (75 dB). Následovalo 6 sekvencí s akustickým podnětem (pulzem) o intenzitě 125 dB, 40 ms trvání. Experiment pokračoval 60 sekvencemi různého typu v pseudorandomizovaném pořadí. Typy sekvencí byly následující: 1) úlekový pulz 125 dB, 40 ms trvání 2) předpodnět (prepulz) 83 dB, 20 ms trvání, následovaný v intervalu 30, resp. 60, resp. 120 ms úlekovým pulzem 125 dB, 40 ms trvání 3) prepulz 91 dB, 20 ms trvání, následovaný v intervalu 30, resp. 60, resp. 120 ms úlekovým pulzem 125 dB, 40 ms trvání 4) žádný podnět (šum pozadí) 75 dB, 60 ms trvání. Experiment

byl zakončen 6 sekvencemi pulzu o intenzitě 125 dB, 40 ms trvání. Habituační byla vypočítána jako procentuální pokles ASR mezi prvními 6 pulzy a posledními 6 pulzy. PPI byla vypočítána dle následujícího vzorce: $[100 - (\text{průměrná odpověď na prepulz} + \text{úlekový pulz} / \text{průměrná odpověď na úlekový pulz}) * 100]$. Takto bylo otestováno celkem 80 potkanů (N=10/pokusná skupina).

Takto bylo otestováno celkem 80 potkanů, rozdělených do pokusných skupin na základě druhu podané látky (nafyron/vehikulum), dávky nafyronu a časového rozestupu aplikace-začátek analogicky jako v lokomočních experimentech

4.5. Měření tělesné teploty

Teplota těla sledovaných zvířat byla měřena rektálně pomocí digitálního teploměru. Během měření byla zvířata cca 15 s imobilizována v trubici z plexiskla. Časový rozvrh jednotlivých měření a aplikace látky viz Tab. 1. Celkem bylo použito 60 zvířat, která byla do pokusných skupin rozdělena na základě aplikované látky, dávky nafyronu a počtu jedinců, kteří byli v průběhu intoxikace umístěni do jednoho boxu na (i) NAFYRON 10 mg/kg, 1 zvíře v boxu, (ii) NAFYRON 20 mg/kg, 1 zvíře v boxu, (iii) VEHIKULUM, 1 zvíře v boxu a (iv) NAFYRON 10 mg/kg, 5 zvířat v boxu, (v) NAFYRON 20 mg/kg, 5 zvířat v boxu, (vi) VEHIKULUM, 5 zvířat v boxu, N=10/pokusná skupina. Cílem rozdělení zvířat do boxů po 1 a po 5 jedincích bylo simulovat prostředí, ve kterém k užívání NSD velmi často dochází (taneční párty v uzavřených prostorách).

Tab. 1: Časový rozvrh provedených měření a aplikace látky – nafyron (10 nebo 20 mg/kg)/vehikulum - dle příslušnosti k pokusné skupině.

ČAS	PROCEDURA
7:00	1. měření
8:00	2. měření
9:00	3. měření + aplikace látky
9:30	4. měření
10:00	5. měření
10:30	6. měření
11:00	7. měření
12:00	8. měření
13:00	9. měření
14:00	10. měření
15:00	11. měření
16:00	12. měření
17:00	13. měření

4.6. Test podmíněné preference místa

Test podmíněné preference místa, CPP, probíhal v odhlučněné místnosti, v níž byla umístěna rovnoměrně nasvícená plastová aparatura obdélníkovitého tvaru, skládající se ze dvou podmiňovacích a jedné neutrální komory. Podmiňovací komory se vzájemně lišily jak vizuálně, tak tvarem a velikostí taktilních značek vyražených v jejich podlážkách, neutrální zóna byla průhledná s hladkou podlážkou. Výskyt zvířete v jednotlivých částech aparatury a délka trajektorie jeho pohybu byly zaznamenávány a následně vyhodnoceny pomocí softwaru EthoVision 11.5 (Noldus, Netherlands).

Experiment probíhal po dobu 12 dní a měl čtyři fáze: (i) habituace; (ii) testování před podmiňováním; (iii) podmiňování a (iv) testování po podmiňování, a to v následujícím časovém uspořádání:

1. den – HABITUACE: bezprostředně před umístěním do neutrální zóny aparatury je všem zvířatům aplikováno vehikulum a je jim po dobu 15 min umožněn volný pohyb po celém komorovém systému.

2. den – TESTOVÁNÍ PŘED PODMIŇOVÁNÍM: procedura je totožná s habituací.

3. – 10. den – PODMIŇOVÁNÍ: zvířatům je bezprostředně před umístěním do aparatury aplikován nafyron (3., 5., 7. a 9. den) v dávce 5, 10 a 20 mg/kg – dle příslušnosti k pokusné skupině či vehiculum (den 4., 6., 8. a 10. den). Po dobu 30 min je pak zvíře ponecháno v jedné z podmiňovacích komor (vstup do zbylých částí aparatury je zamezen). Volba komory, která je párována slátkou a dávkou aktivní substance je po celou dobu podmiňování neměnná.

11. den – TESTOVÁNÍ PO PODMIŇOVÁNÍ: procedura je totožná s habituací a testováním před podmiňováním.

Ze získaných dat je následně extrahována časoprostorová distribuce zvířete v jednotlivých částech komorového systému (hodnoceno pro fáze: habituace, test před podmiňováním a test po podmiňování) a celková délka trajektorie jeho pohybu za celou dobu trvání experimentu (hodnoceno pro všechny fáze CPP). Celkem bylo použito 21 zvířat, rozdělených do pokusných skupin na základě podané dávky nafyronu - 5, 10 či 20 mg/kg; N=7/ pokusná skupina.

4.7. Statistická analýza

Změny v intenzitě celkové lokomoce, míře anxiety a prepulzní inhibice akustické úlekové reakce byly hodnoceny pomocí dvoucestné analýzy variance (Two-way ANOVA), s proměnnými (faktory): léčba (vehikulum/nafyron v různých dávkách) a časový odstup od aplikace látky - test (15/60 min).

Analýza lokomoce v 5 minutových intervalech byla provedena pomocí třícestné ANOVY pro opakovaná měření (Three-way Repeated Measures ANOVA, RM ANOVA), testován byl vliv časového faktoru (5 min intervaly – opakovaná proměnná) a meziskupinové proměnné (faktory): léčba (vehikulum/nafyron a jeho dávka) a časový odstup aplikace látky - test (15/60 min).

Pomocí třícestné RM ANOVY byly hodnoceny také změny tělesné teploty, kdy: léčba (vehikulum/nafyron v dávce 10 či 20 mg/kg) a počet zvířat v boxu (1 či 5 jedinců) jsou meziskupinové proměnné a čas od měření byl opakovanou proměnnou (faktorem).

Test podmíněné preference místa byl hodnocen pomocí jednocestné ANOVY, srovnáván byl čas strávený v kompartmentu, do kterého bylo během podmiňování

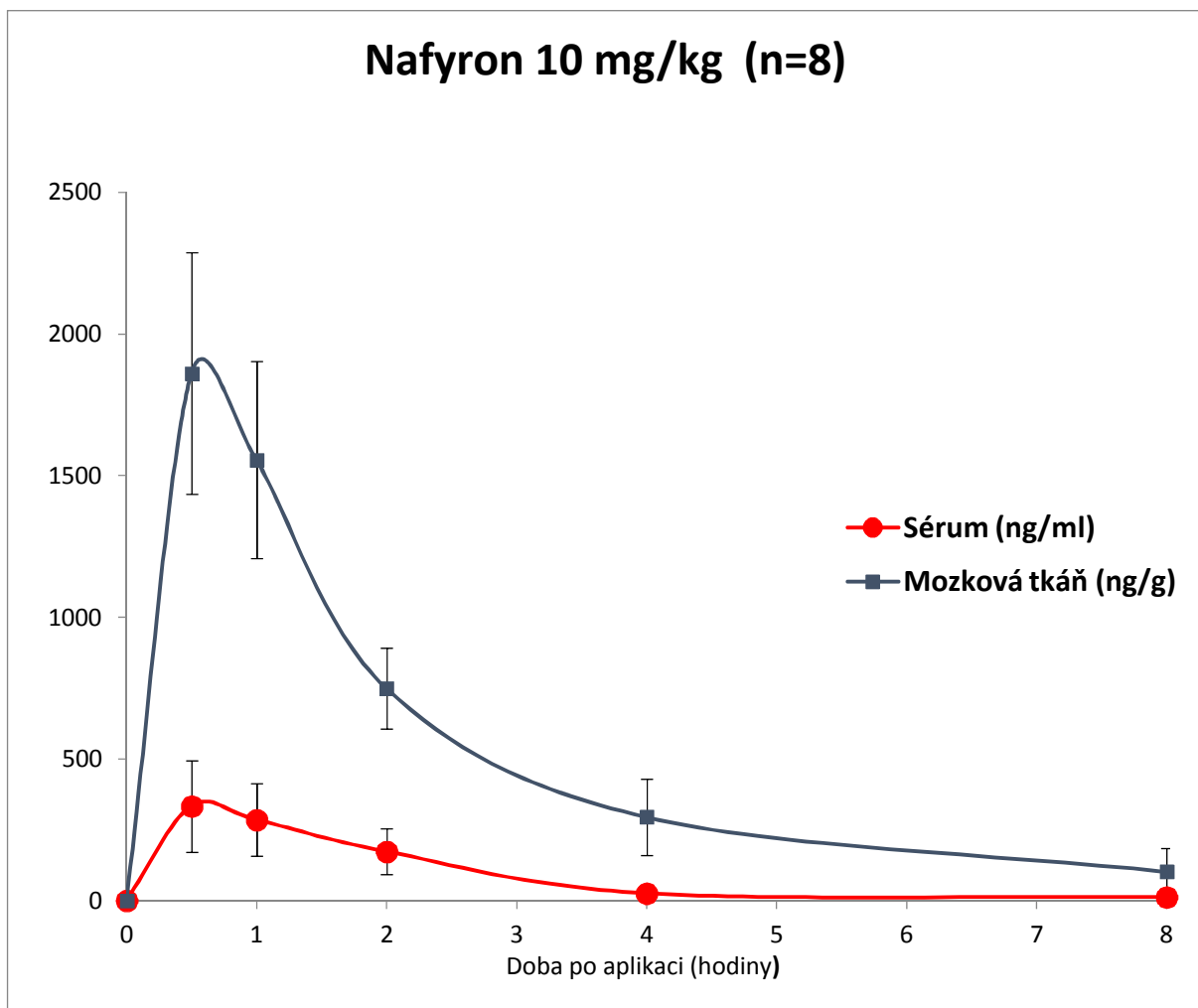
umísťováno zvíře intoxikované nafyronem. Takto byla porovnána data z testu před a po podmiňování.

Jako signifikantní byly brány změny na 5% hladině významnosti, post hoc analýzy byly provedeny Tukey testem. Všechny uvedené analýzy byly provedeny v programu Statistica 7.0.

5. Výsledky

5.1. Farmakokinetická analýza

Průměrné hodnoty koncentrace (n=8) a směrodatné odchylky jsou znázorněny v Grafu 2. Patrná je mírná časová prodleva mezi maximální hodnotou koncentrace v mozkové tkáni v porovnání s koncentrací v séru. Naměřená koncentrace nafyronu v mozkové tkáni značně převyšuje jeho koncentraci v séru, což naznačuje vysokou míru pronikání látky do mozku. Časový profil koncentrace nafyronu v mozku může souviset s časovým průběhem některých z jeho psychotropních účinků.

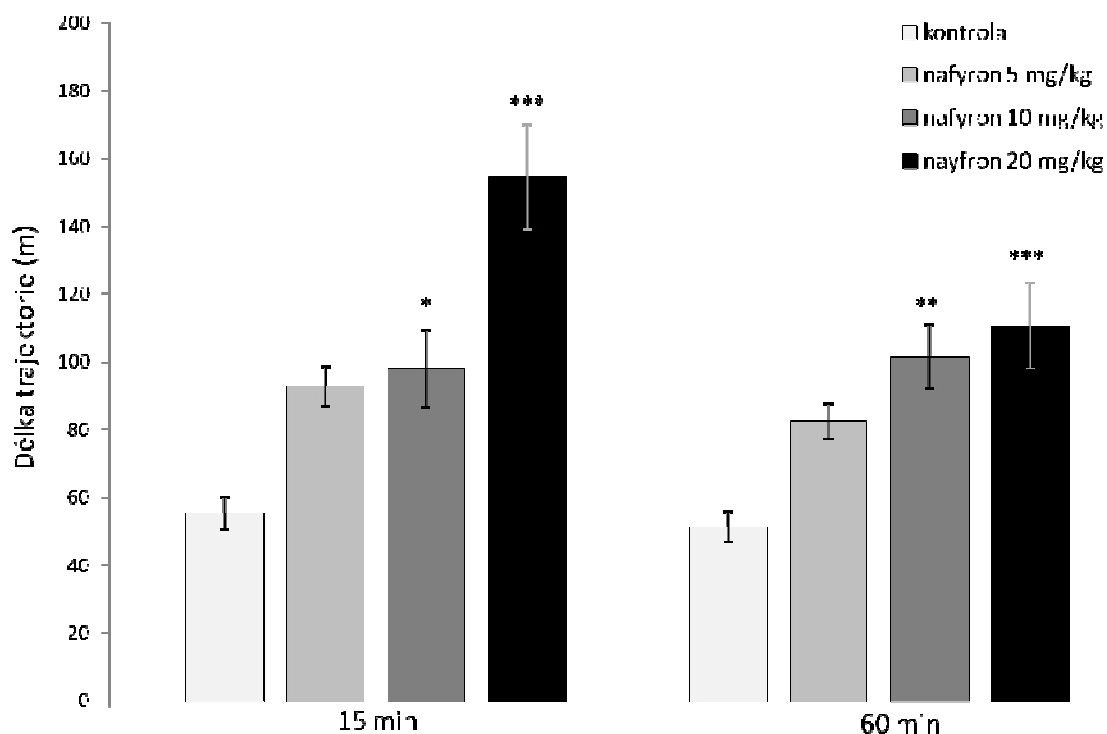


Graf 2: Časový průběh koncentrace nafyronu v séru a mozkové tkáni. Koncentrace nafyronu v séru a mozkové tkáni potkana po subkutánním podání v dávce 10 mg/kg.

5.2. Test otevřeného pole (OFT)

Vliv nafyronu na lokomoci

Délka trajektorie pohybu zvířete v testovací aparatuře byla významně ovlivněna léčbou ($F_{3, 72} = 23.646$, $p < 0.001$) a časovým rozestupem aplikace-test ($F_{1, 72} = 4.092$, $p = 0.047$). Vzájemná interakce mezi faktory byla na hranici průkaznosti ($F_{3, 72} = 2.406$, $p = 0.074$) - zvířata, která byla do OFT umístěna po 15 minutách měla tendence k výraznější hyperlokomoci, než zvířata umístěná po 60 minutách po aplikaci. Vzhledem k tomuto faktu jsme provedli následné post hoc testy pro jednotlivé časové rozestupy zvlášť. Post hoc testy 15 min po aplikaci i 60 min po aplikaci prokázaly významné rozdíly u 10 a 20 mg/kg oproti kontrole ($p < 0.05 - 0.001$), Graf 3.

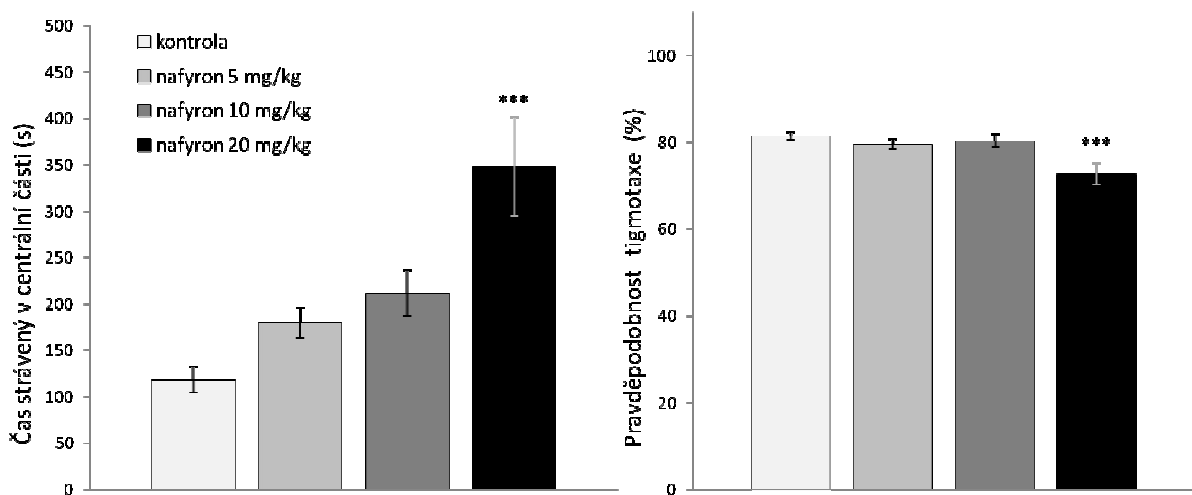


Graf 3: Porovnání délek trajektorií pohybu v OFT testu pro 15 a 60 minutový rozestup aplikace-test. Two-way ANOVA s Tukey post hoc analýzou. Zobrazeny jsou průměry a SEM; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Vliv nafyronu na anxietu

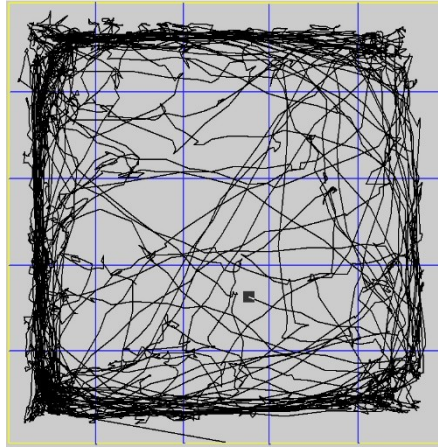
Čas strávený v centru byl významně ovlivněn léčbou ($F_{3, 72} = 9.473$, $p < 0.001$), zatímco vliv časového rozestupu aplikace-test ani interakce faktorů prokázány nebyly (čas: $F_{1, 72} = 0.241$, $p = 0.6253$; interakce: $F_{1, 72} = 1.008$, $p = 0.394$). Zvířata administrovaná nafyronem v nejvyšší dávce (20 mg/kg) strávila signifikantně více času v centrální části aparatury (Obr. 5), než všechny ostatní skupiny ($p < 0.05 - 0.001$), Graf 4.

Míra tigmotaxe, vyjádřená pravděpodobností výskytu v periferní části aparatury, byla významně ovlivněna léčbou ($F_{3, 72} = 5.453$, $p < 0.01$), časový rozestup, stejně jako interakce mezi faktory významný vliv neměly (čas: $F_{1, 72} = 2.286$, $p = 0.135$; interakce: $F_{3, 72} = 0.238$, $p = 0.870$). Zvířata administrovaná nafyronem v nejvyšší dávce (20 mg/kg) projevovala v porovnání s ostatními skupinami nižší míru tigmotaxe ($p < 0.05 - 0.01$), Graf 4.

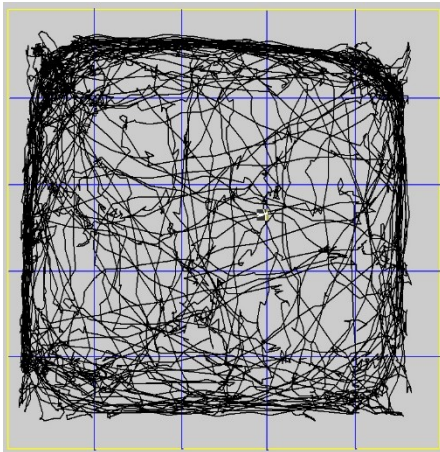


Graf 4: Porovnání celkového času stráveného v centrální části OFT aparatury a pravděpodobnosti výskytu v její periferní části. Two-way ANOVA s Tukey post hoc analýzou. Zobrazeny jsou průměry a SEM; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

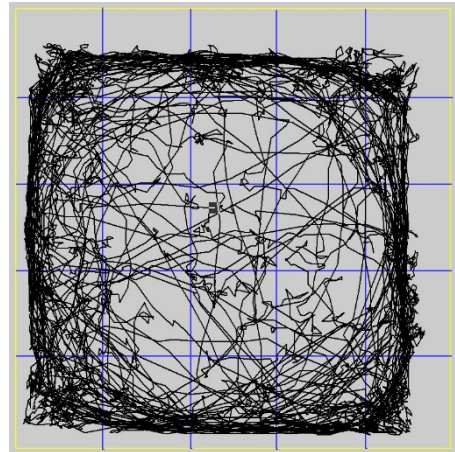
vehikulum



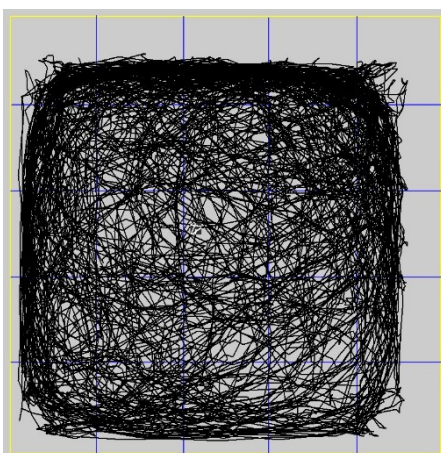
nafyron 5 mg/kg_15 minut



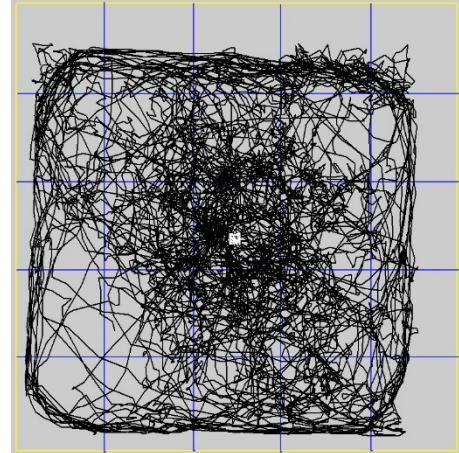
nafyron 10 mg/kg_15 minut



nafyron 20 mg/kg_15 minut, hyperlokomoce



nafyron 20 mg/kg_15 minut, stereotypie



Obr. 5: Příklad charakteristických trajektorií v OFT. Každý z obrázků představuje charakteristickou trajektorii jednoho zvířete zaznamenanou během celého testu (30 minut).

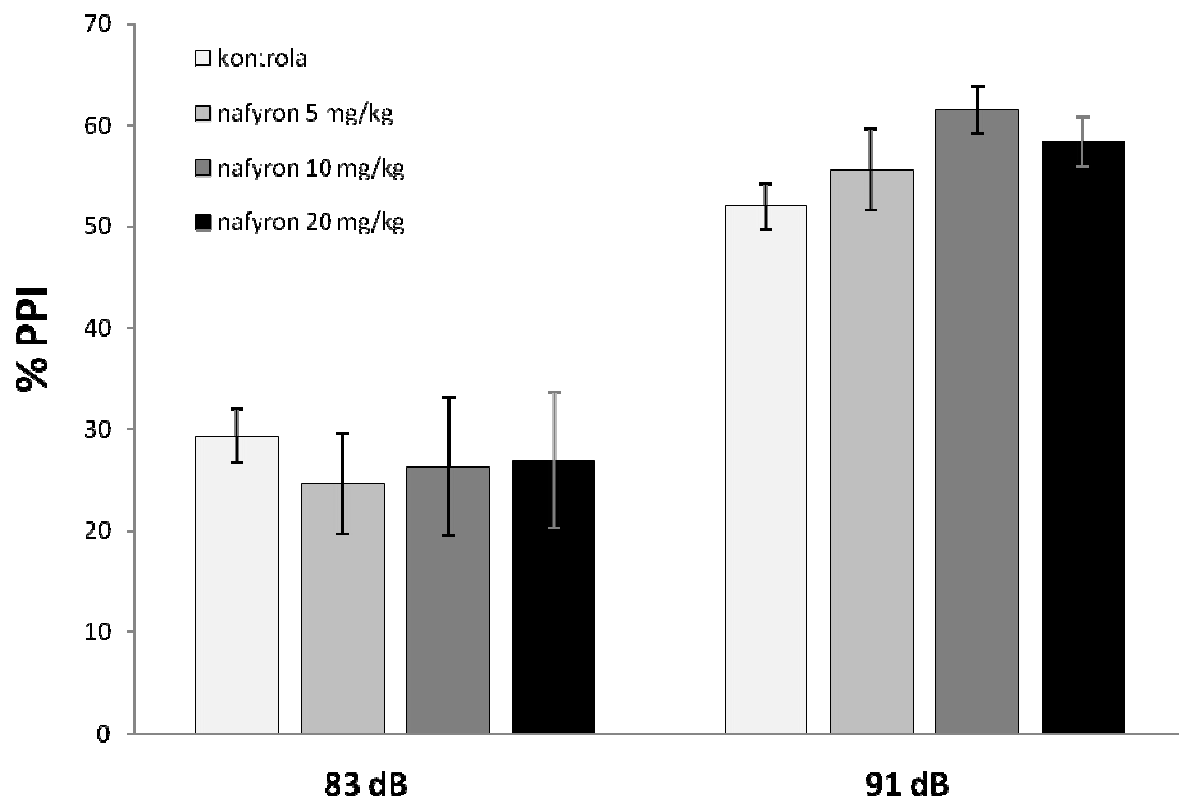
5.3. Test prepulzní inhibice akustické úlekové reakce

Jedinci, jejichž baselinová úleková reakce nepřesáhla hodnotu 10, byli vyřazeni z analýzy - jednalo se o dvě zvířata z pokusné skupiny NAFYRON 5 mg/kg_60 min.

ASR a míra habituace nebyla významně ovlivněna ani jedním z testovaných faktorů či jejich vzájemnou interakcí (ASR - intenzita pulzu: $F_{1, 140} = 0.458$, $p = 0.791$, léčba: $F_{3, 140} = 0.590$, $p = 0.801$, časový interval aplikace látky-test: $F_{1, 140} = 0.604$, $p = 0.309$, jejich interakce: $F_{3, 140} = 0.561$, $p = 0.482$; míra habituace - intenzita pulzu: $F_{1, 140} = 0.399$, $p = 0.846$, léčba: $F_{3, 140} = 0.689$, $p = 0.756$, časový interval aplikace látky-test: $F_{1, 140} = 0.784$, $p = 0.471$, jejich interakce: $F_{3, 140} = 0.499$, $p = 0.854$).

Prokázán byl vliv intenzity prepulzu ($F_{1, 140} = 85.981$, $p < 0.001$), zatímco léčba ($F_{3, 140} = 0.330$, $p = 0.804$) a časový interval aplikace látky-test ($F_{1, 140} = 0.703$, $p = 0.403$) neměli na PPI ASR podstatný vliv. Vzájemná interakce mezi faktory léčba a intenzita pulzu byla významná ($F_{3, 72} = 2.406$, $p < 0.01$) - data pro jednotlivé intenzity proto byla analyzována separátně.

Efekt léčby nebyl ani v jenom případě významný (83 dB: $F_{3, 70} = 0.180$, $p = 0.910$; 91 dB: $F_{3, 70} = 0.605$, $p = 0.614$), stejně jako časový rozestup aplikace-test (83 dB: $F_{1, 70} = 0.314$, $p = 0.577$; 91 dB: $F_{1, 70} = 0.441$, $p = 0.509$) či jejich interakce (83 dB: $F_{3, 70} = 3.469$, $p = 0.078$; 91 dB: $F_{3, 70} = 0.943$, $p = 0.425$), Graf 5.



Graf 5: Porovnání procent PPI ASR pro jednotlivé intenzity prepulzů (83 a 91 dB) a léčbu - nafyron 5, 10, 20 mg/kg a kontrola. Two-way ANOVA s Tuckey post hoc analýzou. Zobrazeny jsou průměry a SEM.

5.4. Měření tělesné teploty

Porovnání klidových hodnot

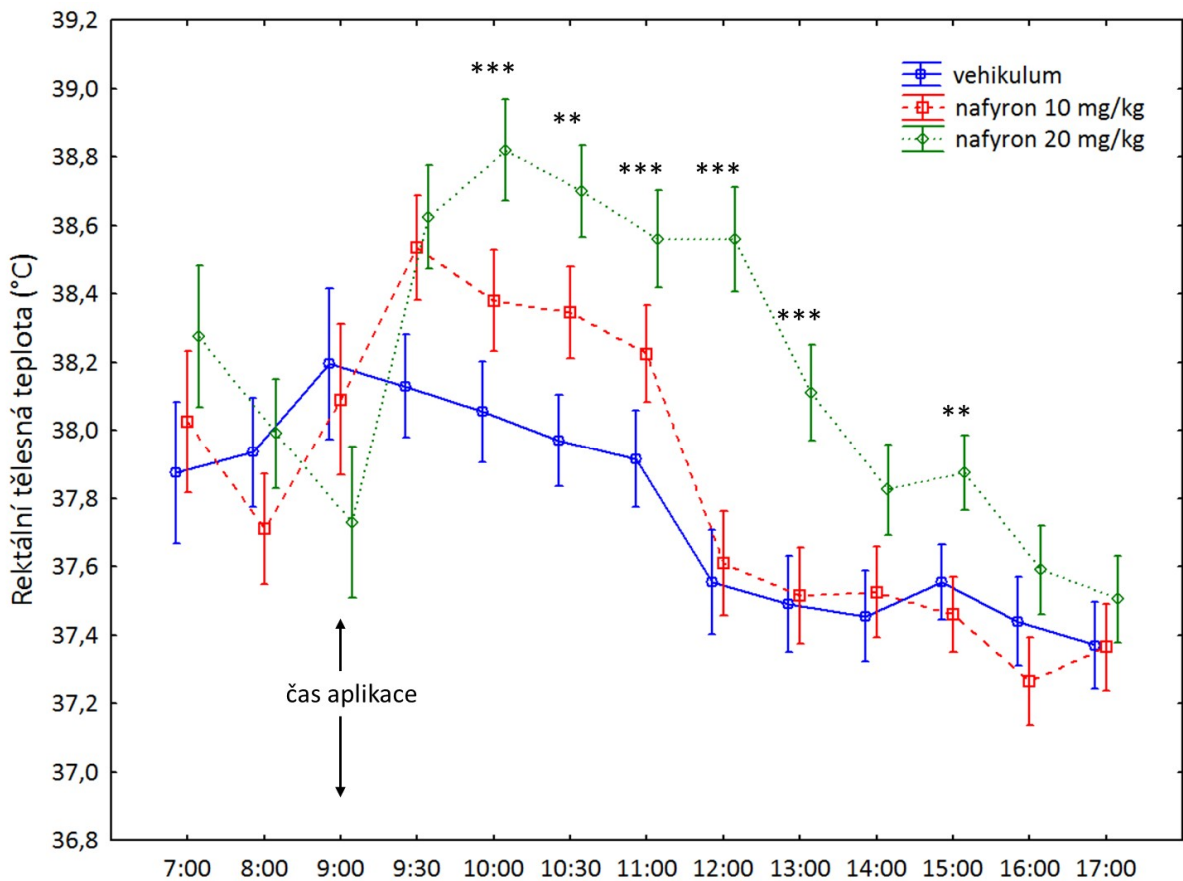
Během dvou hodin před aplikací látky byla provedena tři měření tělesné teploty (v 7:00, 8:00 a 9:00) s cílem získat kontrolní klidovou hodnotu (baseline) pro každou z pokusných skupin. Tyto hodnoty se mezi skupinami, kterým byly následně podány různé látky, nelišily ($F_{1, 54} = 0.199$, $p = 0.820$), vliv neměl ani počet zvířat sdílících společný box ($F_{1, 54} = 0.001$, $p = 0.990$).

Vliv léčby, času od aplikace a počtu zvířat v boxu

Po aplikaci látky (v 9:00) až do konce měření (v 17:00) byla tělesná teplota všech sledovaných potkanů významně ovlivněná podanou látkou ($F_{2, 54} = 27.356$, $p < 0.001$) a časem uplynulým od jejího podání ($F_{10, 540} = 118.28$, $p < 0.001$), počet potkanů sdílících společný box neměl významný vliv ($F_{1, 54} = 0.045$, $p = 0.832$), interakce faktorů počet zvířat sdílících společný box x léčba byla na hranici významnosti ($F_{2, 54} = 3.117$, $p = 0.052$), interakce všech tří faktorů významná nebyla ($F_{10, 540} = 0.742$, $p = 0.685$).

Časový vývoj tělesných teplot

Vzhledem k tomu, že nebyla prokázána interakce mezi podanou látkou a počtem potkanů sdílících box, data jsou dále prezentována a analyzována společně. Podání nafyronu signifikantně zvýšilo teplotu u obou dávek drogy. Efekt byl výraznější po dávce 20 mg/kg než po 10 mg/kg. Po 10 mg/kg bylo zvýšení teploty pouze krátkodobé, trvalo pouze 2 hodiny, po vyšší dávce naopak přetrvávalo výrazně déle, celkem 6 hodin po aplikaci. Signifikantní rozdíly byly i mezi dávkami. Detailně viz Graf 6.



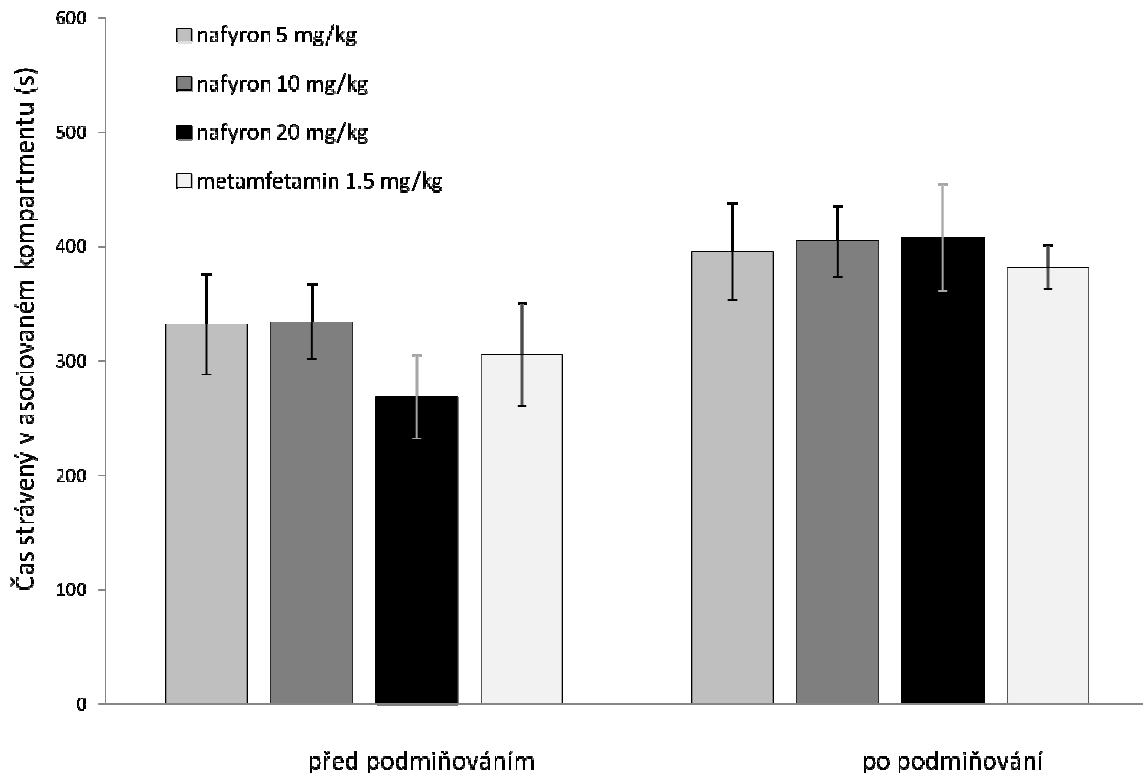
Graf 6: Vývoj rektální teploty potkanů, kterým byl v 9:00 aplikován nafyron v dávce 10 a 20 mg/kg či vehikulum. RM ANOVA s Tukey post hoc analýzou. Zobrazeny jsou průměry a 95 % konfidenční intervaly; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, zobrazeno pro nafyron 20 mg/kg vs. vehikulum.

5.5. Test podmíněné preference místa

Počáteční preference pro jednotlivé komory (baseline - asociované/neasociované s drogou a neutrální) se u pokusných skupin významně nelišila (interakce faktorů druh podané látky x komora - $F_{6,49} = 0.741$, $p = 0.619$).

V testu provedeném po skončení podmiňovací fáze již byla patrná významná preference pro asociovanou komoru ($F_{2,69} = 42,015$, $p < 0.001$), výrazně méně času zvířata trávila v neasociovaném kompartmentu ($p < 0.001$) a nejméně v neutrální zóně ($p < 0.001$) - tato závislost byla přítomná u všech pokusných skupin (interakce faktorů druh podané látky x komora $F_{6,69} = 0.473$, $p = 0.826$).

Porovnáním baselinových hodnot a hodnot po skončení podmiňování, byl zjištěn významný nárůst celkového času stráveného v asociovaných kompartmentech ($F_{3,46} = 9.948$, $p = 0.003$), nicméně léčba neměla podstatný vliv ($F_{3,46} = 0.290$, $p = 0.832$), vzájemná interakce obou faktorů však nebyla významná ($F_{3,46} = 0.442$, $p = 0.724$). I přesto, že nebyla významná interakce, je patrný velmi silný trend k nárůstu času stráveného v asociovaném kompartmentu po skončení podmiňovací fáze, a to u všech pokusných skupin - Graf 7.



Graf 7: Porovnání času stráveného v asociovaném kompartmentu pro jednotlivé skupiny (nafyron 5, 10, 20 mg/kg a metamfetamin 1.5 mg/kg) - hodnoty pro test před a po podmiňovací fázi. Two-way ANOVA s Tukey post hoc analýzou. Zobrazeny jsou průměry a SEM.

6. Diskuze

V předložené práci jsme zkoumali účinky nafyronu na chování potkanů kmene Wistar. Nafyron byl s výjimkou měření teploty (zde byly použity pouze 2 koncentrace) a farmakokinetické analýzy (zde byla použita pouze koncentrace 10 mg/kg) aplikován zvířatům ve 3 různých koncentracích (5, 10 a 20 mg/kg) tak, aby co nejlépe simuloval dávky přijímané lidskými uživateli.

Naměřená koncentrace nafyronu v mozkové tkáni značně převyšující koncentraci v séru je v souladu se zjištěním, že lipofilita pyrrolidinových derivátů katinonu (Gibbons and Zloh, 2010), tedy i nafyronu (Meltzer et al., 2006) je až 1000krát vyšší než u ostatních látek spadajících mezi katinony, například u mefedronu (Coppola a Mondola 2012). Lipofilita tak značně zvyšuje propustnost látky hematoencefalickou bariérou. Získaná farmakokinetická data, především koncentraci látky v mozkové tkáni, jsme následně využili pro naplánování časové prodlevy mezi aplikací látky a začátkem některých našich behaviorálních experimentů (test otevřeného pole a test prepulzní inhibice akustické úlekové reakce) a také pro naplánování doby, po kterou byla zvířata ponechána v kompartmentech ve fázi podmiňování v CPP testu.

Nafyron v dávce 10 a 20 mg/kg signifikantně zvyšuje lokomoční aktivitu oproti kontrolní skupině jak u zvířat, která byla sledována 15 minut po podání drogy, tak u zvířat pozorovaných po 60 minutách. Výsledek pro skupinu, které byl aplikován nafyron v dávce 5 mg/kg leží v obou případech na hranici průkaznosti ($p = 0.069$ pro 15 minut a $p = 0.067$ pro 60 minut). K podobným výsledkům došli ve své studii Gatch et al., 2013. kteří použili Swiss-Webster myši. Nafyron v dávce 10 a 30 mg/kg taktéž signifikantně zvýšil lokomoci, u dávky 3 mg/kg se souvislost prokázat nepodařilo. Dávka 100 mg/kg vyvolala nejdříve útlum aktivity, po 80 minutách od podání však došlo k jejímu nárůstu, který trval po dobu téměř 8 hodin. Naše výsledky jsou taktéž kompatibilní se zjištěními učiněnými v pracích zabývajících se lokomoční aktivitou po podání jiných katinonů, například mefedronu (Shortall et al., 2013). Hyperlokomoční účinky nafyronu jsou ovlivněny jeho farmakologickým profilem. DAT/SERT ratio pro nafyron nabývá hodnoty 2, což je výrazně vyšší hodnota než ta, která byla stanovena pro MDMA 0.08, ale naopak nižší než ta která byla stanovena pro amfetamin či metamfetamin (obě > 10). Látkami s nejpodobnějšími hodnotami jsou některé další katinony, butylon 2,1, mefedron 1,4, metylon 3,3. Z ostatních látek je v tomto ohledu

nafyronu nejbližší kokain s hodnotou 3,1 (Simmler et al., 2013b), který má však přibližně poloviční afinitu oproti nafyronu. Nafyron je velice podobný kokainu a metylonu (ale například také MDPV) i v další své charakteristice, chová se jako velice potentní inhibitor jak DAT, tak SERT transportérů, avšak na rozdíl od mefedronu či butylonu již nezpůsobuje signifikantní výlev ani DA, ani 5-HT těmito kanály.

Míra anxiety, vyjádřená celkovým časem zvířete stráveným v centrální části aparatury, byla signifikantně ovlivněna pouze u zvířat, kterým byla aplikována dávka 20 mg/kg. Kromě snížení míry anxiety je tento parametr patrně také ovlivněn také stereotypním chováním, které bylo pozorováno u některých ze zvířat právě po aplikaci dávky 20 mg/kg (viz obrázek 5).

Teplota zvířat byla signifikantně ovlivněna jak podanou látkou, tak dobou, která uběhla od aplikace. Nepodařilo se prokázat spojitost mezi tělesnou teplotou a počtem zvířat umístěných v kleci. Teplota byla po podání nafyronu v dávce 20 mg/kg významně zvýšena oproti baselinové hodnotě již půl hodiny po aplikaci a zvýšení přetrvávalo ještě 4 hodiny po podání drogy. Po poloviční dávce se teplota zvýšila také již půl hodiny po aplikaci, avšak efekt přetrval pouze 2 hodiny. Počet potkanů v jednom boxu neměl na tělesnou teplotu vliv.

Do analýzy PPI ASR nebyla zahrnuta 2 non-respondentní zvířata s průměrnou velikostí ASR menší než 10 mikroV (obě ze skupiny (v) NAFYRON 5 mg/kg, 60 min). Žádná z dávek nafyronu dle našich výsledků signifikantně nenarušovala prepulzní inhibici akustické úlekové reakce (senzorimotorické zpracování) a to ani v jednom z časových odstupů od podání látky, avšak byl prokázán očekávaný nárůst PPI s rostoucí amplitudou pre-pulzu, který je v souladu s dalšími studii (Jones et al., 2011). Potvrdit účinek katinonů na sensorimotorické zpracování se nepodařilo ani ve studii Shortall et al., 2013, kde byl v testu PPI použit kaninon v dávce 1 a 4 mg/kg a mefedron v dávkách 1, 4 a 10 mg/kg. Po opakované administraci katinonu však patrně k narušení PPI dochází (Banjaw et al., 2005). Stejně tak je narušení sensorimotorického zpracování je však pozorováno u psychedelik, kde je mechanismem tohoto účinku je nejspíše agonismus na 5-HT_{2A} receptorech (Nichols, 2004; Páleníček et al., 2011). Chronické či subchronické podání nafyronu před testováním PPI ASR by mohlo být jedním z předmětů, nejen našeho, dalšího bádání.

Test podmíněné preference místa je běžně používán pro odhad adiktivního potenciálu drog. Podstatou testu je klasické pavlovovské podmiňování. V testu dochází k asociaci mezi prostředím a určitým požitekem. Pokud se zvíře začne zdržovat signifikantně

déle v kompartmentu, kde mu byla aplikována aktivní látka, můžeme mluvit o podmíněné preferenci místa (Tzschentke, 2007). Metoda se začala původně používat pro testování adiktivního potenciálu, ale její využití se postupně rozšířilo, dnes se používá i k testování dalších fenoménů souvisejících s mechanismem odměny. Podle některých studií (Shimosato and Ohkuma, 2000) může počet rozlišitelných podnětů v testovací aparatuře hrát roli při vzniku podmíněné preference místa, v naší studii jsme tedy zvolili jejich dostatečný počet – taktilní rozlišení podlahy, odlišné vzory hlavních komor aparatury a deformátory prostoru.

Podle našich informací nebyla doposud provedena žádná studie testující adiktivní potenciál nafyronu. Předložené studii se však jeho schopnost vyvolat podmíněnou preferenci místa prokázat nepodařilo. Ve výsledcích se však objevuje jednoznačný trend k prodloužení doby strávené v kompartmentu asociovaném s aplikací drogy. Nejsilnější je tento trend u dávky 20 mg/kg. Ve většině publikací uvedených níže jsou však katinony schopny alespoň v některé z dávek CPP vyvolat. MDPV, pyrrolidinový derivát katinonu, který má velice podobný farmakokinetický profil jako nafyron, vyvolává v dávkách 1, 1,8 a 3,2 mg/kg u potkanů kmene Sprague-Dawley podmíněnou preferenci místa, avšak pouze do té míry, že zvíře stráví v kompartmentu signifikantně více času oproti pretestu, nicméně zvíře stále tráví většinu času v původně preferovaném (zjištěno při pretestu) kompartmentu (King et al., 2015). Mefedron, látka taktéž spadající mezi syntetické katinony, avšak s odlišným farmakokinetickým profilem od nafyronu, v dávce 30 mg/kg u potkana kmene Sprague-Dawley také CPP vyvolává, avšak v dávkách 3 a 10 mg/kg se statisticky signifikantní výsledek prokázat nepodařilo (Lisek et al., 2012). 4-methylethkatinon (4-MEC) v dávkách 1 a 3 mg/kg CPP nevyvolává, v dávce 10 mg/kg již ano (Xu et al., 2016). Stejně tak některé další chemicky nepříbuzné látky zařazené mezi stimulanty jako například diethylpropion (DEP) u potkanů kmene Wistar v dávkách 2,5 a 5 mg/kg (Garcia-Mijares et al., 2009).

Podmíněná preference místa patrně nebyla prokázána díky malému vzorku jedinců v jednotlivých skupinách. Jasný trend vyplývající z výsledků je doprovázen velice širokým konfidenčním intervalem, který bývá typický pro menší počty testovaných zvířat ve skupině.

Nebezpečný pro uživatele drog může být především hypertermický účinek nafyronu. Po jeho požití je tedy záhodno svědomitě doplňovat tekutiny, nejlépe pak ty, obsahující minerální látky, které se z těla ztrácí při nadměrném pocení. Ačkoli se nám statisticky nepodařilo prokázat schopnost nafyronu vyvolávat závislost, pozorovali jsme silný trend k vytvoření CPP v závislosti na podané dávce. Výzkum tohoto fenoménu zůstává i nadále

v popředí našeho zájmu. Jelikož je tedy otázka adiktivního potenciálu nafyronu stále otevřená, uživatelé by v této otázce měli zůstat nanejvýš obezřetní. Nejrozumnější a nejbezpečnější variantou je neužívat žádné drogy, tedy ani ty běžně dostupné na taneční scéně.

Výsledky diplomové práce budou použity pro následné sepsání publikace. Ještě předtím však bude proveden další běh experimentu podmíněné preference místa pro rozšíření velikosti vzorku. Adiktivní potenciál nafyronu bude následně posuzován i v kombinaci s alkoholem, tedy jednou z drog, které jsou s ním užívány nejčastěji. Ve studii (Ciudad-Roberts et al., 2015), provedené na CD-1 myších, alkohol v dávce 0,75 g/kg, která sama o sobě nevyvolala CPP, zvýšil CPP vyvolanou podáním mefedronu v dávce 25 mg/kg o 70 %, předpokládáme tedy, že analogicky bude zvyšovat adiktivní potenciál i u nafyronu. Dále se také zaměříme na některé z dalších nových psychoaktivních substancí, a to jak ze skupiny katinonů, tak i z ostatních skupin.

7. Závěr

Všechny experimenty byly úspěšně realizovány. Přínosem této práce je komplexní zmapování akutních účinků nafyronu a částečné zhodnocení jeho adiktivního potenciálu. Potvrdili jsme, že látka snadno proniká hematoencefalickou bariérou. Dále jsme prokázali, že má vliv na tělesnou teplotu, na lokomoci a také míru anxiety. Prokázat se nám naopak nepodařila souvislost mezi jednorázovým podáním nafyronu a senzomotorickým zpracováním (měřeno pomocí testu PPI ASR). Pro úplné zhodnocení adiktivního potenciálu bude kvůli menšímu vzorku testovaných jedinců nutné provést další experimenty s totožným designem. Další výzkum v této oblasti by se měl zaměřit především na interakci nafyronu s dalšími látkami a také na zmapování účinků doposud neprobádaných nových psychoaktivních substancí.

8. Seznam použité literatury

- Abel, K., Waikar, M., Pedro, B., Hemsley, D., and Geyer, M. (1998). Repeated testing of prepulse inhibition and habituation of the startle reflex: a study in healthy human controls. *Journal of Psychopharmacology* 12, 330–337.
- van Amsterdam, J., Nutt, D., and van den Brink, W. (2013). Generic legislation of new psychoactive drugs. *Journal of Psychopharmacology* 27, 317–324.
- Arbo, M.D., Bastos, M.L., and Carmo, H.F. (2012). Piperazine compounds as drugs of abuse. *Drug and Alcohol Dependence* 122, 174–185.
- Archer, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behaviour* 21, 205–235.
- B Karch, S. (2015). Cathinone Neurotoxicity (“The “3Ms”). *Current neuropharmacology*, 13(1), 21-25.
- Bäckberg, M., Beck, O., Jönsson, K.-H., and Helander, A. (2015). Opioid intoxications involving butyrfentanyl, 4-fluorobutyrfentanyl, and fentanyl from the Swedish STRIDA project. *Clinical Toxicology* 53, 609–617.
- Banjaw, M.Y., Fendt, M., and Schmidt, W.J. (2005). Clozapine attenuates the locomotor sensitisation and the prepulse inhibition deficit induced by a repeated oral administration of *Catha edulis* extract and cathinone in rats. *Behavioural Brain Research* 160, 365–373.
- Blough, B.E., Landavazo, A., Decker, A.M., Partilla, J.S., Baumann, M.H., and Rothman, R.B. (2014). Interaction of psychoactive tryptamines with biogenic amine transporters and serotonin receptor subtypes. *Psychopharmacology* 231, 4135–4144.
- Bockaert, J., Dumuis, A., Bouhelal, R., Sebben, M., and Cory, R. (1987). Piperazine derivatives including the putative anxiolytic drugs, buspirone and ipsapirone, are agonists at 5-HT_{1A} receptors negatively coupled with adenylate cyclase in hippocampal neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 335.
- de Boer, D., Bosman, I.J., Hidvégi, E., Manzoni, C., Benkö, A.A., dos Reys, L.J.A., and Maes, R.A.. (2001). Piperazine-like compounds: a new group of designer drugs-of-abuse on the European market. *Forensic Science International* 121, 47–56.
- Boolell, M., Gepi-Attee, S., Gingell, J.C., and Allen, M.J. (1996). Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. *British Journal of Urology* 78, 257–261.
- Braff, D.L., Geyer, M.A., and Swerdlow, N.R. (2001). Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology* 156, 234–258.
- Brandt, S.D., Sumnall, H.R., Measham, F., and Cole, J. (2010a). Analyses of second-generation “legal highs” in the UK: Initial findings. *Drug Testing and Analysis* 2, 377–382.
- Brandt, S.D., Wootton, R.C.R., De Paoli, G., and Freeman, S. (2010b). The naphyrone story: The Alpha or Beta-naphthyl Isomer? *Drug Testing and Analysis* 2, 496–502.

Brandt, S.D., Freeman, S., Sumnall, H.R., Measham, F., and Cole, J. (2011). Analysis of NRG “legal highs” in the UK: identification and formation of novel cathinones. *Drug Testing and Analysis* 3, 569–575.

Brenneisen, R., Fisch, H., Koelbing, U., Geissshusler, S., and Kalix, P. (1990). Amphetamine-like effects in humans of the khat alkaloid cathinone. *British Journal of Clinical Pharmacology* 30, 825–828.

Bryner, J.K., Wang, U.K., Hui, J.W., Bedodo, M., MacDougall, C., and Anderson, I.B. (2006). Dextromethorphan Abuse in Adolescence: An Increasing Trend: 1999–2004. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 160, 1217.

Buchanan, J.F., and Brown, C.R. (1988). “Designer Drugs”: A Problem in Clinical Toxicology. *Medical Toxicology* 3, 1–17.

Burden, D.A., and Philips, S.R. (1980). Kinetic Measurements of the Turnover Rates of Phenylethylamine and Tryptamine In Vivo in the Rat Brain. *Journal of Neurochemistry* 34, 1725–1732.

Carhart-Harris, R.L., King, L.A., and Nutt, D.J. (2011). A web-based survey on mephedrone. *Drug and Alcohol Dependence* 118, 19–22.

Ciudad-Roberts, A., Camarasa, J., Ciudad, C.J., Pubill, D., and Escubedo, E. (2015). Alcohol enhances the psychostimulant and conditioning effects of mephedrone in adolescent mice; postulation of unique roles of D₃ receptors and BDNF in place preference acquisition: Enhancement of mephedrone’s effects by alcohol. *British Journal of Pharmacology* 172, 4970–4984.

Coppola, M., and Mondola, R. (2012). Synthetic cathinones: Chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as “bath salts” or “plant food.” *Toxicology Letters* 211, 144–149.

Corazza, O., Demetrovics, Z., van den Brink, W., and Schifano, F. (2013). “Legal highs” an inappropriate term for “Novel Psychoactive Drugs” in drug prevention and scientific debate. *International Journal of Drug Policy* 24, 82–83.

Cosbey, S., Kirk, S., McNaul, M., Peters, L., Prentice, B., Quinn, A., Elliott, S.P., Brandt, S.D., and Archer, R.P. (2014). Multiple Fatalities Involving a New Designer Drug: Para-Methyl-4-Methylaminorex. *Journal of Analytical Toxicology* 38, 383–384.

Cozzi, N.V., Sievert, M.K., Shulgin, A.T., Jacob, P., and Ruoho, A.E. (1999). Inhibition of plasma membrane monoamine transporters by β -ketoamphetamines. *European Journal of Pharmacology* 381, 63–69.

Crew (2011) Information sheet: Naphyrone.

Cunningham, C.L., Gremel, C.M., and Groblewski, P.A. (2006). Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nature Protocols* 1, 1662–1670.

Curran, H.V., and Monaghan, L. (2001). In and out of the K-hole: a comparison of the acute and residual effects of ketamine in frequent and infrequent ketamine users. *Addiction* 96, 749–760.

Degenhardt, L., Baxter, A.J., Lee, Y.Y., Hall, W., Sara, G.E., Johns, N., Flaxman, A., Whiteford, H.A., and Vos, T. (2014). The global epidemiology and burden of psychostimulant dependence: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Drug and Alcohol Dependence* 137, 36–47.

- Derungs, A., Schietzel, S., Meyer, M.R., Maurer, H.H., Krahenbuhl, S., and Liechti, M.E. (2011). Sympathomimetic toxicity in a case of analytically confirmed recreational use of naphyrone (naphthylpyrovalerone). *Clinical Toxicology* 49, 691–693.
- Dickson, A.J., Vorce, S.P., Levine, B., and Past, M.R. (2010). Multiple-Drug Toxicity Caused by the Coadministration of 4-Methylmethcathinone (Mephedrone) and Heroin. *Journal of Analytical Toxicology* 34, 162–168.
- Dissanayake, D.W.N., Mason, R., and Marsden, C.A. (2013). Sensory gating, Cannabinoids and Schizophrenia. *Neuropharmacology* 67, 66–77.
- Eilam, D., and Golani, I. (1989). Home base behavior of rats (*Rattus norvegicus*) exploring a novel environment. *Behavioural Brain Research* 34, 199–211.
- Elliott, S., and Evans, J. (2014). A 3-year review of new psychoactive substances in casework. *Forensic Science International* 243, 55–60.
- ElSohly, M.A., Gul, W., Wanas, A.S., and Radwan, M.M. (2014). Synthetic cannabinoids: Analysis and metabolites. *Life Sciences* 97, 78–90.
- EMCDDA, E. (2010). Europol-EMCDDA Joint Report on a New Psychoactive Substance: 4-Methylmethcathinone (Mephedrone). *EMCDDA, Europol*.
- EMCDDA (2014), European Drug Report 2014: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg
- EMCDDA (2015), European Drug Report 2015: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg
- EMCDDA (2016), European Drug Report 2016: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg
- Frison, G., Zamengo, L., Zancanaro, F., Tisato, F., and Traldi, P. (2016). Characterization of the designer drug deschloroketamine (2-methylamino-2-phenylcyclohexanone) by gas chromatography/mass spectrometry, liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry, multistage mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance: Characterization of the designer drug deschloroketamine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 30, 151–160.
- Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussosoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Fur, G., and Casellas, P. (1995). Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations. *European Journal of Biochemistry* 232, 54–61.
- Garcia-Mijares, M., Bernardes, A.M.T., and Silva, M.T.A. (2009). Diethylpropion produces psychostimulant and reward effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 91, 621–628.
- Gatch, M.B., Taylor, C.M., and Forster, M.J. (2013). Locomotor stimulant and discriminative stimulus effects of “bath salt” cathinones: *Behavioural Pharmacology* 24, 437–447.
- Geyer, M.A., Krebs-Thomson, K., Braff, D.L., and Swerdlow, N.R. (2001). Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology* 156, 117–154.

- Gibbons, S., and Zloh, M. (2010). An analysis of the “legal high” mephedrone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20, 4135–4139.
- Giroud, C., Augsburger, M., Rivier, L., Mangin, P., Sadeghipour, F., Varesio, E., Veuthey, J.L., and Kamalaprifa, P. (1998). 2C-B: A New Psychoactive Phenylethylamine Recently Discovered in Ecstasy Tablets Sold on the Swiss Black Market. *Journal of Analytical Toxicology* 22, 345–354.
- Hall, C.S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology* 18, 385–403.
- Hirota, K., and Lambert, D.G. (1996). Ketamine: its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. *Br J Anaesth* 77, 441–444.
- Hyman, S.E., Malenka, R.C., and Nestler, E.J. (2006). NEURAL MECHANISMS OF ADDICTION: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annual Review of Neuroscience* 29, 565–598.
- Johansen, S.S., Carsten Hansen, A., Muller, I.B., Lundemose, J.B., and Franzmann, M.-B. (2003). Three Fatal Cases of PMA and PMMA Poisoning in Denmark. *Journal of Analytical Toxicology* 27, 253–256.
- Johnson, L.A., Johnson, R.L., and Portier, R.-B. (2013). Current “Legal Highs.” *The Journal of Emergency Medicine* 44, 1108–1115.
- Jones, C.A., Brown, A.M., Auer, D.P., and Fone, K.C.F. (2011). The mGluR2/3 agonist LY379268 reverses post-weaning social isolation-induced recognition memory deficits in the rat. *Psychopharmacology* 214, 269–283.
- Karinen, R., Tuv, S.S., Rogde, S., Peres, M.D., Johansen, U., Frost, J., Vindenes, V., and Øiestad, Å.M.L. (2014). Lethal poisonings with AH-7921 in combination with other substances. *Forensic Science International* 244, e21–e24.
- Katz, D.P., Bhattacharya, D., Bhattacharya, S., Deruiter, J., Clark, C.R., Suppiramaniam, V., and Dhanasekaran, M. (2014). Synthetic cathinones: “A khat and mouse game.” *Toxicology Letters* 229, 349–356.
- Kelly, J.P. (2011). Cathinone derivatives: A review of their chemistry, pharmacology and toxicology. *Drug Testing and Analysis* 3, 439–453.
- King, L.A., and Kicman, A.T. (2011). A brief history of “new psychoactive substances.” *Drug Testing and Analysis* 3, 401–403.
- King, H.E., Wetzell, B., Rice, K.C., and Riley, A.L. (2015). An assessment of MDPV-induced place preference in adult Sprague-Dawley rats. *Drug and Alcohol Dependence* 146, 116–119.
- Koller, V.J., Auwärter, V., Grummt, T., Moosmann, B., Mišić, M., and Knasmüller, S. (2014). Investigation of the in vitro toxicological properties of the synthetic cannabimimetic drug CP-47,497-C8. *Toxicology and Applied Pharmacology* 277, 164–171.
- Krebs, T.S., and Johansen, P.-Ø. (2013). Psychedelics and Mental Health: A Population Study. *PLoS ONE* 8, e63972.
- Krikorian, A.D. (1984). Kat and its use: An historical perspective. *Journal of Ethnopharmacology* 12, 115–178.

- Kronstrand, R., Roman, M., Dahlgren, M., Thelander, G., Wikstrom, M., and Druid, H. (2013). A Cluster of Deaths Involving 5-(2-Aminopropyl)Indole (5-IT). *Journal of Analytical Toxicology* *37*, 542–546.
- Kronstrand, R., Thelander, G., Lindstedt, D., Roman, M., and Kugelberg, F.C. (2014). Fatal Intoxications Associated with the Designer Opioid AH-7921. *Journal of Analytical Toxicology* *38*, 599–604.
- Lin, D.-L., Liu, H.-C., and Yin, H.-L. (2007). Recent Paramethoxymethamphetamine (PMMA) Deaths in Taiwan. *Journal of Analytical Toxicology* *31*, 109–113.
- Lisek, R., Xu, W., Yuvashva, E., Chiu, Y.-T., Reitz, A.B., Liu-Chen, L.-Y., and Rawls, S.M. (2012). Mephedrone (“bath salt”) elicits conditioned place preference and dopamine-sensitive motor activation. *Drug and Alcohol Dependence* *126*, 257–262.
- Loi, B., Corkery, J.M., Claridge, H., Goodair, C., Chiappini, S., Gimeno Clemente, C., and Schifano, F. (2015). Deaths of individuals aged 16-24 years in the UK after using mephedrone: MEPHEDRONE DEATHS IN 16-24-YEAR-OLDS IN THE UK. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* *30*, 225–232.
- Measham, F., Moore, K., and Newcombe, R. (2010). Tweaking, bombing, dabbing and stockpiling: the emergence of mephedrone and the perversity of prohibition. *Drugs and Alcohol Today* *10*, 14–21.
- Meltzer, P.C., Butler, D., Deschamps, J.R., and Madras, B.K. (2006). 1-(4-Methylphenyl)-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one (Pyrovalerone) analogues: a promising class of monoamine uptake inhibitors. *J Med Chem* *49*, 1420–1432.
- Mravčík, V., Chomynová, P., Grohmannová, K., Nečas, V., Grolmusová, L., Kiššová, L., Nechanská, B., Sopko, B., Fidesová, H., Vopravil, J., Jurystová, L. (2014). Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2013 [Annual Report on Drug Situation 2013 – Czech Republic] Mravčík, V. (Ed.). Praha: Úřad vlády České republiky.
- Mravčík, V., Chomynová, P., Grohmannová, K., Janíková, B., Grolmusová, L., Tion Leštinová, Z., Rous, Z., Kiššová, L., Nechanská, B., Sopko, B., Vlach, T., Fidesová, H., Jurystová, L., Vopravil, J., Malinová, H. (2015). Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2014 [Annual Report on Drug Situation 2014 – Czech Republic] Mravčík, V. (Ed.). Praha: Úřad vlády České republiky.
- Murphy, C.M., Dulaney, A.R., Beuhler, M.C., and Kacinko, S. (2013). “Bath Salts” and “Plant Food” Products: the Experience of One Regional US Poison Center. *Journal of Medical Toxicology* *9*, 42–48.
- Nichols, D.E. (2004). Hallucinogens. *Pharmacology & Therapeutics* *101*, 131–181.
- Nicholson, P.J., Quinn, M.J., and Dodd, J.D. (2010). Headshop heartache: acute mephedrone “meow” myocarditis. *Heart* *96*, 2051–2052.
- Osorio-Olivares, M., Rezende, M.C., Sepúlveda-Boza, S., Cassels, B.K., and Fierro, A. (2004). MAO inhibition by arylisopropylamines: the effect of oxygen substituents at the β -position. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* *12*, 4055–4066.
- Páleníček, T., Bubeníková, V., Votava, M., & Horáček, J. (2005). Účinky MDMA, LSD a psilocinu na lokomoci potkana (The effects of MDMA, LSD and Psilocin on locomotion of the rat). *Adiktologie*, *5*, 120-130.

Páleníček, T., Kuchař, M. (2011). Je možná detekce a identifikace nových syntetických drog (NSD) pomocí orientačních testů? *Adiktologie*, (11)4, 208-214.

Páleníček T, Fujáková M, Tylš F, Kubešová A, Brunovský M, Horáček J. Srovnání vlivu halucinogenů psilocinu a mezkalinu na kvantitativní EEG a sensorimotorické zpracování informací - animální model psychózy. *Psychiatrie* 2011;(suppl. 2):44-48.

Pearce, J.M., and Hall, G. (1980). A model for Pavlovian learning: Variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli. *Psychological Review* 87, 532–552.

Pearson, J.M., Hargraves, T.L., Hair, L.S., Massucci, C.J., Clinton Frazee, C., Garg, U., and Pietak, B.R. (2012). Three Fatal Intoxications Due to Methylone. *Journal of Analytical Toxicology* 36, 444–451.

Perry, W., Minassian, A., Feifel, D., and Braff, D.L. (2001). Sensorimotor gating deficits in bipolar disorder patients with acute psychotic mania. *Biological Psychiatry* 50, 418–424.

Prosser, J.M., and Nelson, L.S. (2012). The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones. *Journal of Medical Toxicology* 8, 33–42.

Refstad, S. (2003). Paramethoxyamphetamine (PMA) poisoning; a “party drug” with lethal effects. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 47, 1298–1299.

Rigdon, G.C., and Viik, K. (1991). Prepulse inhibition as a screening test for potential antipsychotics. *Drug Development Research* 23, 91–99.

Rose, S.R., Poklis, J.L., and Poklis, A. (2013). A case of 25I-NBOMe (25-I) intoxication: a new potent 5-HT_{2A} agonist designer drug. *Clinical Toxicology* 51, 174–177.

Ross, E.A., Watson, M., and Goldberger, B. (2011). “Bath Salts” Intoxication. *New England Journal of Medicine* 365, 967–968.

Roth, B.L., Gibbons, S., Arunotayanun, W., Huang, X.-P., Setola, V., Treble, R., and Iversen, L. (2013). The Ketamine Analogue Methoxetamine and 3- and 4-Methoxy Analogues of Phencyclidine Are High Affinity and Selective Ligands for the Glutamate NMDA Receptor. *PLoS ONE* 8, e59334.

Saavedra, J.M. (1974). ENZYMATIC ISOTOPIC ASSAY FOR AND PRESENCE OF α -PHENYLETHYLAMINE IN BRAIN. *Journal of Neurochemistry* 22, 211–216.

Schifano, F. (2005). Ecstasy (MDMA, MDA, MDEA, MBDB) consumption, seizures, related offences, prices, dosage levels and deaths in the UK (1994-2003). *Journal of Psychopharmacology* 20, 456–463.

Schifano, F., Albanese, A., Fergus, S., Stair, J. L., Deluca, P., Corazza, O., and Torrens, M. (2011). Mephedrone (4-methylmethcathinone; ‘meow meow’): chemical, pharmacological and clinical issues. *Psychopharmacology*, 214(3), 593-602.

Schifano, F., Orsolini, L., Duccio Papanti, G., and Corkery, J.M. (2015). Novel psychoactive substances of interest for psychiatry. *World Psychiatry* 14, 15–26.

Shimosato, K., and Ohkuma, S. (2000). Simultaneous Monitoring of Conditioned Place Preference and Locomotor Sensitization Following Repeated Administration of Cocaine and Methamphetamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 66, 285–292.

- Shortall, S.E., Macerola, A.E., Swaby, R.T.R., Jayson, R., Korsah, C., Pillidge, K.E., Wigmore, P.M., Ebling, F.J.P., Richard Green, A., Fone, K.C.F., et al. (2013). Behavioural and neurochemical comparison of chronic intermittent cathinone, mephedrone and MDMA administration to the rat. *European Neuropsychopharmacology* 23, 1085–1095.
- Simmler, L., Buser, T., Donzelli, M., Schramm, Y., Dieu, L.-H., Huwyler, J., Chaboz, S., Hoener, M., and Liechti, M. (2013). Pharmacological characterization of designer cathinones *in vitro*: Pharmacology of cathinones. *British Journal of Pharmacology* 168, 458–470.
- Spiller, H.A., Ryan, M.L., Weston, R.G., and Jansen, J. (2011). Clinical experience with and analytical confirmation of “bath salts” and “legal highs” (synthetic cathinones) in the United States. *Clinical Toxicology* 49, 499–505.
- Stanford, S.C. (2007). The Open Field Test: reinventing the wheel. *Journal of Psychopharmacology* 21, 134–135.
- Sykutera, M., Cychowska, M., and Bloch-Boguslawska, E. (2015). A Fatal Case of Pentedrone and - Pyrrolidinovalerophenone Poisoning. *Journal of Analytical Toxicology* 39, 324–329.
- Terrett, N.K., Bell, A.S., Brown, D., and Ellis, P. (1996). Sildenafil (VIAGRAM), a potent and selective inhibitor of type 5 cGMP phosphodiesterase with utility for the treatment of male erectile dysfunction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6, 1819–1824.
- Tortella, F.C., Pellicano, M., and Bowery, N.G. (1989). Dextromethorphan and neuromodulation: old drug coughs up new activities. *Trends in Pharmacological Sciences* 10, 501–507.
- Tzschentke, T.M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction Biology* 12, 227–462.
- UNODC (2013) The challenge of new psychoactive substances, UNODC, Vienna.
- Valente, M.J., Guedes de Pinho, P., de Lourdes Bastos, M., Carvalho, F., and Carvalho, M. (2014). Khat and synthetic cathinones: a review. *Archives of Toxicology* 88, 15–45.
- Van Sickle, M.D. (2005). Identification and Functional Characterization of Brainstem Cannabinoid CB2 Receptors. *Science* 310, 329–332.
- Vardakou, I., Pistos, C., Dona, A., Spiliopoulou, C., and Athanaselis, S. (2012). Naphyrone: a “legal high” not legal any more. *Drug and Chemical Toxicology* 35, 467–471.
- Vetulani, J. (2001). Drug addiction. Part II. Neurobiology of addiction. *Polish Journal of Pharmacology*, 53(4), 303-318.
- Volkow, N., and Li, T.-K. (2005). The neuroscience of addiction. *Nature Neuroscience* 8, 1429–1430.
- Volkow, N.D., Wang, G.-J., Fowler, J.S., Tomasi, D., and Telang, F. (2011). Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 15037–15042.
- Vorce, S.P., Knittel, J.L., Holler, J.M., Magluilo, J., Levine, B., Berran, P., and Bosy, T.Z. (2014). A Fatality Involving AH-7921. *Journal of Analytical Toxicology* 38, 226–230.
- Walsh, R.N., and Cummins, R.A. (1976). The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin* 83, 482–504.

- Westphal, F., Junge, T., Girreser, U., Greibl, W., and Doering, C. (2012). Mass, NMR and IR spectroscopic characterization of pentedrone and pentylone and identification of their isocathinone by-products. *Forensic Science International* 217, 157–167.
- Wikstrom, M., Thelander, G., Nystrom, I., and Kronstrand, R. (2010). Two Fatal Intoxications with the New Designer Drug Methedrone (4-Methoxymethcathinone). *Journal of Analytical Toxicology* 34, 594–598.
- Wikstrom, M., Thelander, G., Dahlgren, M., and Kronstrand, R. (2013). An Accidental Fatal Intoxication with Methoxetamine. *Journal of Analytical Toxicology* 37, 43–46.
- Winstock, A., Mitcheson, L., Ramsey, J., Davies, S., Puchnarewicz, M., and Marsden, J. (2011a). Mephedrone: use, subjective effects and health risks: Mephedrone and health risks. *Addiction* 106, 1991–1996.
- Winstock, A.R., Mitcheson, L.R., Deluca, P., Davey, Z., Corazza, O., and Schifano, F. (2011b). Mephedrone, new kid for the chop?: Mephedrone and legal highs. *Addiction* 106, 154–161.
- Wise, R.A. (2009). Roles for nigrostriatal—not just mesocorticolimbic—dopamine in reward and addiction. *Trends in Neurosciences* 32, 517–524.
- Wohlfarth, A., Scheidweiler, K.B., Pang, S., Zhu, M., Castaneto, M., Kronstrand, R., and Huestis, M.A. (2016). Metabolic characterization of AH-7921, a synthetic opioid designer drug: *in vitro* metabolic stability assessment and metabolite identification, evaluation of *in silico* prediction, and *in vivo* confirmation: Metabolite profiling of AH-7921. *Drug Testing and Analysis* 8, 779–791.
- Wood, D.M., and Dargan, P.I. (2012). Novel Psychoactive Substances: How to Understand the Acute Toxicity Associated With the Use of These Substances. *Therapeutic Drug Monitoring* 34, 363–367.
- Wood, D.M., Davies, S., Greene, S.L., Button, J., Holt, D.W., Ramsey, J., and Dargan, P.I. (2010). Case series of individuals with analytically confirmed acute mephedrone toxicity. *Clinical Toxicology* 48, 924–927.
- Xu, P., Qiu, Y., Zhang, Y., Bai, Y., Xu, P., Liu, Y., Kim, J.H., and Shen, H. (2016). The Effects of 4-Methylethcathinone on Conditioned Place Preference, Locomotor Sensitization, and Anxiety-Like Behavior: A Comparison with Methamphetamine. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 19, pyv120.
- Zaitso, K., Katagi, M., Tsuchihashi, H., and Ishii, A. (2014). Recently abused synthetic cathinones, α -pyrrolidinophenone derivatives: a review of their pharmacology, acute toxicity, and metabolism. *Forensic Toxicology* 32, 1–8.
- Zawilska, J.B., and Wojcieszak, J. (2013). Designer cathinones—An emerging class of novel recreational drugs. *Forensic Science International* 231, 42–53.
- Ziporyn, T. (1986). A growing industry and menace: makeshift laboratory's designer drugs. *JAMA* 256, 3061–3063.