

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Kateřina Syrová

**Akutní účinky nové psychoaktivní látky ze skupiny derivátů
fenyletylaminu – animální studie**

**Acute effects of new psychoactive substance from the group of
phenethylamine derivatives – an animal study**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Klára Šíchová, PhD.

Praha 2019

Prohlášení

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

V Praze 11. 8. 2019

Podpis:

Kateřina Syrová

Poděkování

Velmi ráda bych zde poděkovala své školitelce Mgr. Kláře Šíchové, Ph.D. za všechen její čas, ochotu, spoustu cenných rad zvláště se statistikou, ale hlavně za nekončící přívál pozitivní energie. S díky nesmím zapomenout také na Mgr. Hynka Dandu za ohromnou pomoc při vyhodnocování dat až po odpovídání na nekonečné přívály dotazů, Ing. Evu Lhotkovou za neocenitelnou pomoc při experimentech, Mgr. et Mgr. Kristýnu Štefkovou, Ph.D. za rady se statistikou a Mgr. Čestmíra Vejmolu za rady při psaní teoretické části. Velké poděkování patří také vedoucímu naší skupiny MUDr. Tomášovi Páleníčkovi za všechny faktické poznámky, cenné připomínky a vstřícnost. V neposlední řadě chci moc poděkovat své rodině, přítelovi a kamarádům za podporu, motivaci a trpělivost během studia.

Tato diplomová práce vznikla během projektu „Udržitelnost pro Národní ústav duševního zdraví“, registrační číslo LO1611, financovaného z Evropského fondu pro regionální rozvoj, a také díky grantu VG20122015075.

Abstrakt

Syntetické N-metoxy-benzylové („NBOMe“) deriváty fenyletylaminů byly vyvinuty jako vysoce potentní agonisté pro výzkum 5-hydroxytryptaminových receptorů, posledních pár let však začaly být dostupné na černém trhu. Jsou vyhledávány rekreačními uživateli jako „legální LSD“, v horších případech bývá záměna nevědomá a tyto látky se stávají příčinou vážné intoxikace se znaky serotoninové toxicity. Je o nich zatím jen velmi málo dostupných dat, avšak nízká cena, snadná dostupnost přes internet a legální status z těchto látek činí zajímavý cíl rekreačních uživatelů a velkou výzvu pro vědce i zákonodárce. Do této skupiny patří také látka 2CBFly-NBOMe. Zatím se sice nevyskytly informace o jejím rekreačním užívání, to je však nejspíše pouze otázkou času. Cílem této studie je určit akutní účinky 2CBFly-NBOMe na potkanech kmene Wistar. Aktivní látka výrazně snižovala lokomoční aktivitu zvířat a působila vyšší anxieta, narušila také senzomotorické zpracování informací a snižovala tělesnou teplotu zvířat. Farmakokinetický profil se podařilo naměřit pouze v krevním séru, nejvyšší koncentrace 2CBFly-NBOMe byly detekovány 30 – 60 minut po aplikaci halucinogenu. Tato práce přináší první informace o působení 2CBFly-NBOMe na behaviorální a fyziologické parametry v animálním modelu.

Klíčová slova

2CBFly-NBOMe, derivát fenyletylaminu, animální model, Wistar, test otevřeného pole, prepulzní inhibice akustické úlekové reakce, test vyvýšeného křížového bludiště

Abstract

Synthetic N-methoxybenzyl („NBOMe“) phenylethylamine derivatives were developed as highly potent agonists for the research of 5-hydroxytryptamine receptors, however they have become available on the black market in the past few years. They are sought by recreational users as “legal LSD”, in worse cases the replacement is unsuspected and these substances are a cause of serious intoxication with signs of serotonin toxicity. At this moment, there is very little data available, but their low price, easy access via the internet and legal status make these substances an interesting target for recreational users and a big challenge for scientists and for the lawmakers. 2CBFly-NBOMe belongs to this group. There is no information about its recreational use for now, but that is probably only a matter of time. The aim of this study is to determine acute effects of 2CBFly-NBOMe in Wistar rats. Active substance significantly reduced locomotor activity of the animals and caused higher anxiety, it also disrupted sensorimotor gating and lowered body temperature of animals. Pharmacokinetic profile was measured only in the blood serum, the highest concentrations of 2CBFly-NBOMe were detected 30-60 minutes after the administration of hallucinogen. This paper provides first information on the effect of 2CBFly-NBOMe on behavioral and physiological parameters in an animal model.

Key words

2CBFly-NBOMe, phenethylamine derivative, animal model, Wistar, open field test, prepulse inhibition of acoustic startle response, elevated plus maze test

Obsah

Seznam zkratk	8
1. Úvod	9
2. Literární přehled.....	10
2.1 Serotonergní psychedelika	10
2.1.1 LSD.....	12
2.2 2C látky.....	13
2.2.1 Charakteristika	13
2.2.2 2C-B	14
2.2.3 2C-B-Fly	15
2.3 NBOMe substance.....	17
2.3.1 Charakteristika	17
2.3.2 Farmakokinetika a farmakodynamika.....	17
2.3.3 Formy aplikace a účinky	18
2.3.4 Rizika spojená s užíváním NBOMe	19
2.3.5 Případové studie – extrémní intoxikace.....	20
2.4 2CBFly-NBOMe.....	21
2.5 Animální modely	23
2.5.1 Test otevřeného pole	23
2.5.2 Prepulzní inhibice akustické úlekové reakce.....	25
2.5.3 Test vyvýšeného křížového bludiště	26
3. Cíle práce.....	28
4. Materiál a metody.....	30
4.1 Experimentální zvířata.....	30
4.2 Substance a dávky	30
4.3 Farmakokinetická analýza	31
4.4 Měření tělesné teploty.....	32
4.5 Behaviorální experimenty	33
4.5.1 Test otevřeného pole	34
4.5.2 Prepulzní inhibice akustické úlekové reakce.....	35
4.5.3 Test vyvýšeného křížového bludiště	36
4.6 Statistická analýza	38
5. Výsledky.....	39

5.1 Farmakokinetická analýza	39
5.2 Vliv 2CBFly-NBOMe na tělesnou teplotu	39
5.3 Vliv 2CBFly-NBOMe na lokomoční aktivitu	41
5.3.1 Celková lokomoční aktivita	41
5.3.2. Lokomoční aktivita v pětiminutových intervalech	41
5.3.3 Vliv 2CBFly-NBOMe na prostorovou distribuci zvířat.....	43
5.4 Vliv 2CBFly-NBOMe na prepulzní inhibici akustické úlekové reakce	47
6. Diskuze	49
7. Závěr	53
8. Literatura.....	54

Seznam zkratek

2C-B	2-(4-bromo-2,5-dimetoxyfenyl)etanamin
25B-NBOMe	2-(4-bromo-2,5-dimetoxyphenyl)-N-[(2-metoxyfenyl) metyl]etanamin
25C-NBOMe	2-(4-Chloro-2,5-dimetoxyphenyl)-N-[(2-metoxyfenyl)metyl]etanamin
25I-NBOMe	2-(4-Iodo-2,5-dimetoxyphenyl)-N-[(2-metoxyfenyl)metyl]etanamin
2C-B-Fly	2-(4-bromo-2,3,6,7-tetrahydrofuro[2,3-f][1]benzofuran-8-yl)etanamin
2CBFly-NBOMe	N-(2-metoxy-benzyl)-1-(8-bromo-2,3,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-b:4,5-b']difuran-4-yl)-2-aminoetan
5-HT	5-hydroxytryptamin (serotonin)
ANOVA	Analýza rozptylu, analysis of variance
ASR	akustická úleková reakce, acoustic startle reaction
EPM	vyvýšené křížové bludiště, elevated plus maze
EtOH	ethanol
GABA	kyselina γ -aminomáselná
HCOOH	kyselina mravenčí
LC/HRMS	Kapalinová chromatografie s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií, liquid chromatography/high resolution mass spektrometry
LSD	dietylamid kyseliny lysergové
MDAI	5,6-metylendioxy-2-aminoindan
MDMA	3,4-metylendioxy-N-metylamfetamin (extáze)
MRM	monitorování vícenásobných reakcí, multiple reaction monitoring
NBOMe	N-2-metoxy-benzyl
NPS	nové psychoaktivní substance
OFT	test otevřeného pole, open field test
PPI	prepulzní inhibice, prepulse inhibition
SEM	střední chyba průměru

1. Úvod

Halucinogeny jsou velmi rozmanitou skupinou psychoaktivních látek působících na fungování nervové soustavy a chování organismu. Zahrnují přírodní i uměle syntetizované látky, jejich molekulární mechanismus působení výrazně ovlivňuje spektrum účinků – nicméně hlavním efektem jsou vizuální a jiné halucinace (auditorní, taktilní), mohou indukovat změny vnímání, vědomí (tzv. altered states of consciousness – změněné stavy vědomí), myšlení (nový, nekonformní a kreativní úhel pohledu) a silné zvraty nálad. Také značně moduluje fyziologii organismu na úrovni termoregulace, parametrů kardiiovaskulárního systému atd.

Nové psychoaktivní substance (NPS) jsou fenoménem posledních let. Jedná se o látky syntetizované modifikací molekulární struktury již známých a nelegálních drog při zachování stejného nebo podobného účinku. Konzumace NPS se za posledních deset let stala vážným problémem mnoha evropských zemí.

N-metoxy-benzylové („NBOMe“) deriváty fenyletylaminů jsou skupinou spadajícími právě do NPS. Počty jimi vážně intoxikovaných lidí neustále rostou, přesto se o NBOMe substancích ví jen velmi málo.

V první části práce popisují klasická (serotonergní) psychedelika a mechanismus jejich působení, dále se věnují charakteristice vybraných zástupců syntetických derivátů fenetylaminu se zvláštním důrazem na NBOMe substance.

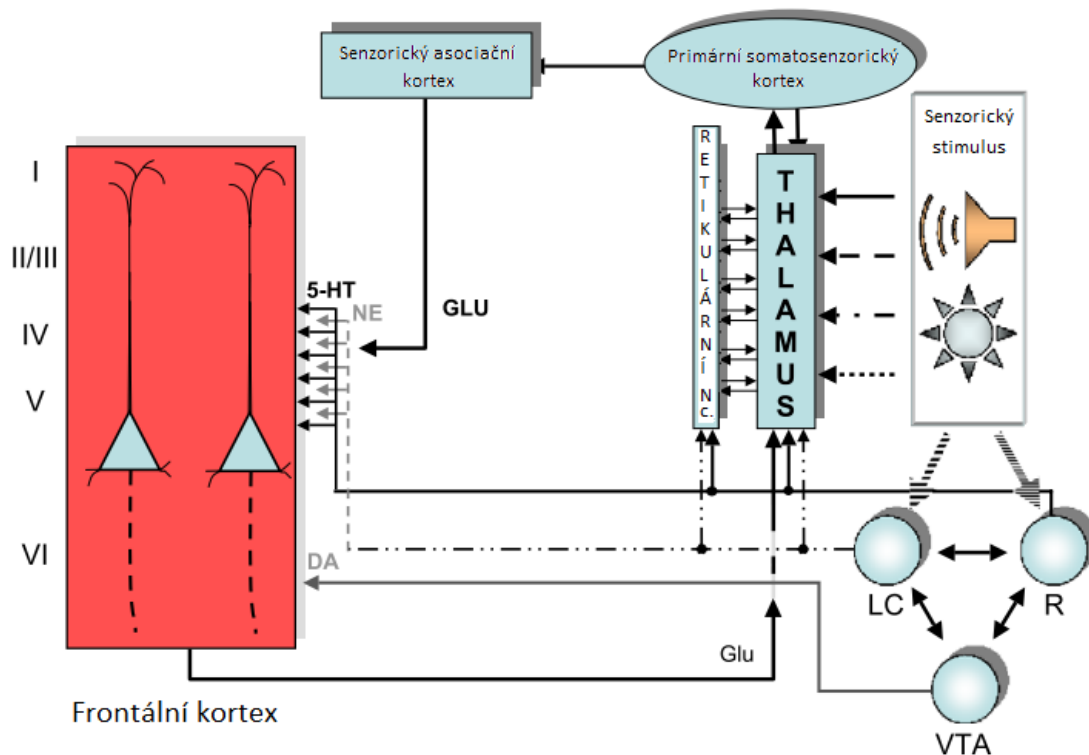
V experimentální části zhodnotím akutní účinky 2CBFly-NBOMe na behaviorální a fyziologické parametry potkanů kmene Wistar. Behaviorální odpovědi budou zhodnoceny v testu otevřeného pole, testu vyvýšeného křížového bludiště a v testu prepulzní inhibice akustické úlekové reakce, účinky na termoregulaci budou posouzeny sledováním změn tělesné teploty.

2. Literární přehled

2.1 Serotonergní psychedelika

Serotonergní („klasická“) psychedelika jsou strukturně velmi podobné serotoninu. Agonistickým působením primárně na 5-HT_{2A} receptorech ovlivňují hladiny serotoninu v mozku (Heal et al., 1985). Těla serotonergních neuronů jsou uložena v rafeálních jádrech mozkového kmene, serotonergní dráhy z nich projikují do ostatních částí mozku. Rafeální jádra mají samy vysokou koncentraci presynaptických 5-HT_{1A} receptorů, které fungují jako inhibiční autoreceptory modulující výlev neurotransmiteru z rafeálních jader (Siegel et al., 2006). Další klíčovou strukturou pro působení psychedelik je pátá vrstva neokortexu s velkými pyramidálními neurony, kde se nalézá nejvyšší koncentrace 5HT_{2A} receptorů v mozku. Třetím důležitým místem je thalamus a jeho retikulární jádra, projikující do thalamu inhibiční GABAergní synapse. Po aplikaci psychedelik následně dochází k jejich interakci s těmito třemi strukturami:

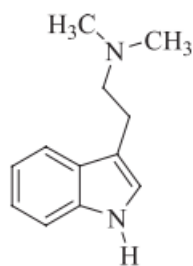
1. V rafeálních jádrech se molekuly halucinogenů vážou na presynaptické 5-HT_{1A} receptory, což spouští inhibiční kaskádu přes G_{ai} proteiny, což vede k hyperpolarizaci buněk rafeálních jader, tedy ke sníženému výlevu serotoninu. Halucinogeny se mohou vázat také na 5-HT_{2A} receptory GABAergních neuronů, které také inhibují aktivitu buněk rafeálních jader (Liu et al., 2000).
2. V páté vrstvě neokortexu psychedelika po aktivaci 5-HT_{2A} receptorů stimulují výlev glutamátu z pyramidových buněk, což vede ke zvýšené excitabilitě kortexu.
3. Činnost thalamu psychedelika modulují přes GABAergní signalizaci jeho retikulárních jader. Inhibuje se tím sensorimotorické zpracování informací („thalamický filtr“) – selekce důležitých signálů ze sensorických vstupů od nepotřebného šumu, který by thalamus za normálních okolností před jejich vstupem do kortexu vyfiltroval. Proto nastává zahlcení kortexu nepřehledným množstvím informací (Nichols, 2004).



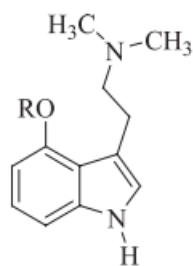
Obr. 1: Zjednodušené schéma možné signalizace v mozku po administraci halucinogenů. Mezi ovlivněné oblasti patří hlavně 5. vstva prefrontálního kortexu, rafeální jádra a thalamus. Signalizace se účastní také LC vysílající noradrenergní projekce do thalamu a kůry, a VTA s dopaminergní signalizací do kortexu. 5-HT = serotonin, DA = dopamin, GLU = glutamát, LC = locus coeruleus, NE = noradrenalin, R = rafeální jádra, VTA = ventrální tegmentální oblast. Upraveno podle Nichols 2004.

V rámci behaviorálních experimentů se jako korelát halucinogenních účinků vyvolaných po aplikaci psychedelik u laboratorních myší bere tzv. head-twitch response. Tento druh stereotypního chování v podobě rychlého rotačního pohybu hlavou je zprostředkován aktivací 5-HT_{2A} receptorů. Nepsychedeličtí agonisté toto chování neindukují (Heal et al., 1985). Analogické chování u potkanů se nazývá wet dog shake a zahrnuje i pohyb krku a trupu zvířete (Bedard & Pycoc, 1977).

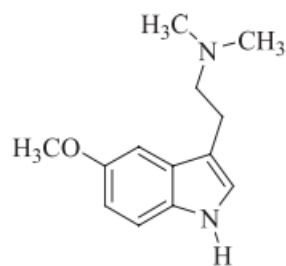
Serotonergní psychedelika se podle strukturální příbuznosti dělí na fenetylamin, ergolin a tryptamin. Mezi fenetylamin patří např. meskalin, svou molekulární strukturou jsou podobné spíše dopaminu. Do ergolin patří LSD a LSA. Tryptaminy jsou např. psilocybin, DMT a 5-MeO-DMT, strukturně jsou velmi podobné serotoninu.



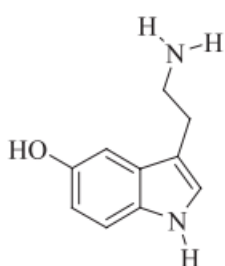
DMT



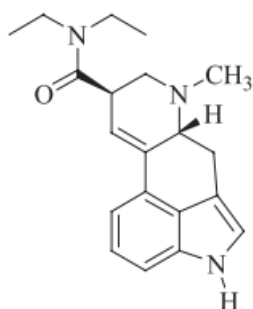
R = H; Psilocin
R = PO₃H; Psilocybin



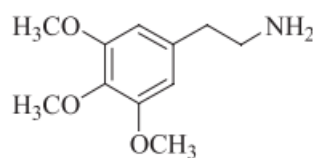
5-Methoxy-DMT



Serotonin



LSD



Meskalin

Obr. 2: Porovnání molekulární struktury serotoninu a vybraných serotonergních psychedelik. Upraveno podle Nichols 2004.

2.1.1.1 LSD

Diethylamid kyseliny lysergové (LSD), strukturním vzorcem (6aR,9R)-N,N-diethyl-7-methyl-4,6,6a,7,8,9-hexahydroindolo-[4,3-fg]-chinolin-9-karboxamid, slangově Lucy nebo acid, se řadí do skupiny ergolinových derivátů. Parentální sloučenina kyselina lysergová se běžně vyskytuje v přírodě (v houbě *Claviceps purpurea*). LSD bylo prvně syntetizováno ve Švýcarsku Albertem Hofmannem v roce 1938. Řada animálních a humánních studií naznačuje jeho potenciál v léčbě resistantní deprese, úzkostných poruch a závislosti na alkoholu a nikotinu (Bender et al., 1962; Nichols, 2004). Od šedesátých let do současnosti se hojně používá k rekreačním účelům (zvláště na taneční scéně), jelikož je jednou z velmi potentních halucinogenních látek (Marek & Aghajanian, 1996).

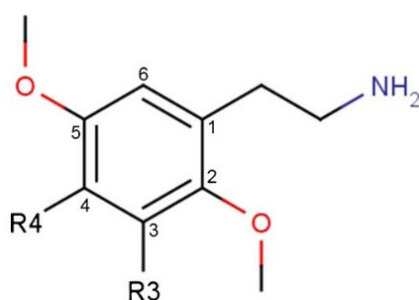
LSD se primárně váže na 5-HT receptory. V rekreačních dávkách aktivuje hlavně 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} a 5-HT_{2C} podtyp, ke kterým má značnou selektivitu (Titeler, Lyon, & Glennon, 1988). Byla prokázána interakce LSD také s dopaminovými a noradrenergními receptory (Andén et al., 1968).

Jelikož je LSD velmi potentním halucinogenem, efektivní dávky pro rekreační užití činí dle reportů uživatelů již kolem 15-25 µg pro prahový efekt. Běžná dávka se udává mezi 75-150 µg (EMCDDA, 2018). První účinky LSD se začínají projevovat kolem 30 – 40 minut po aplikaci a mohou trvat 8 – 12 hodin. Aplikuje se sublinguálně přes aplikační papírek („blotter“), orálně, méně ve formě tablet nebo želatiny (Carhart-Harris et al., 2016; Dolder et al., 2015).

2.2 2C látky

2.2.1 Charakteristika

Substance „2C“ tvoří významnou skupinu syntetických derivátů fenetylaminu. Jejich název odkazuje na jejich molekulární strukturu – dva atomy uhlíku spojující benzenový kruh a aminoskupinu. Obsahují metoxy funkční skupinu na pozici 2 a 5 benzenového jádra. Viz Obr. 3. Většinu těchto látek poprvé syntetizoval a popsal Alexander Shulgin, známý americký vědec a popularizátor psychedelik (Shulgin & Carter, 1975). V současné době je to velmi vyhledávaná skupina NPS.

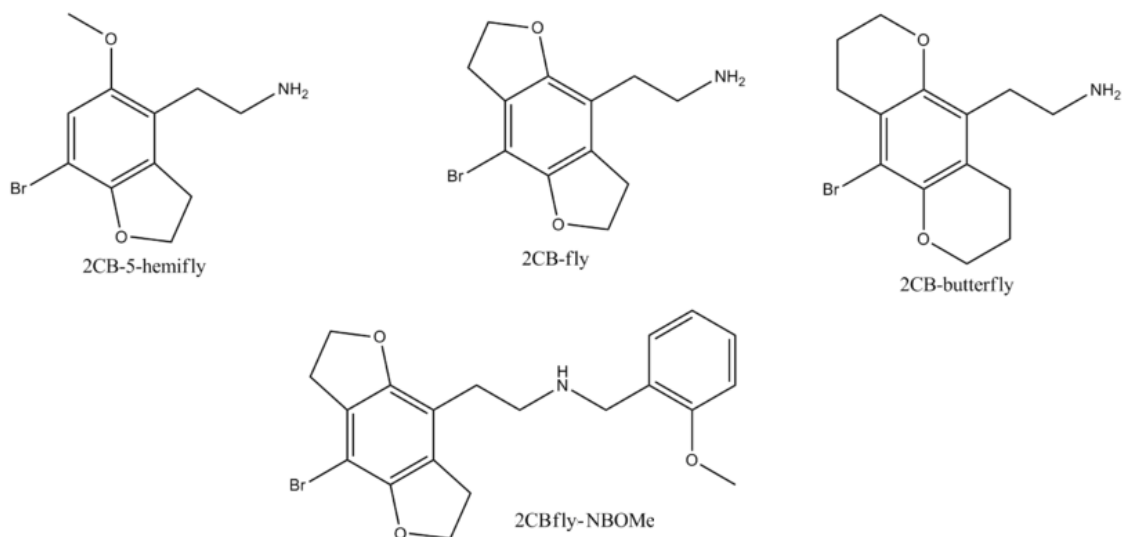


Obr. 3: Obecná molekulární struktura 2C látek. Převzato z Dean et al., 2013.

Molekuly se strukturou obsahující dihydrofuranový kruh se nazývají „fly“. Když jsou furanové kruhy nenasatované, molekula nese název „hemifly“. Když se v molekule

namísto furanu vyskytuje větší dipyran, molekula se nazývá „butterfly“, viz Obr. 4. 2C psychedelika molekulárně působí jako potentní agonisté 5-HT_{2A} receptorů. K 5-HT_{2C} receptorům se nechovají selektivně. Podobně jako MDMA působí také inhibičně na monoaminové transportéry (serotoninový, noradrenalinový a dopaminový) (Shulgin & Carter, 1975).

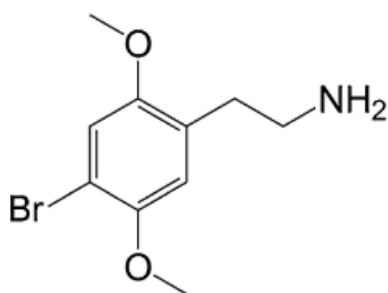
Řadí se mezi ně například 2-(4-brom-2,5-dimetoxy-fenyl)etan-1-amin (2C-B), 2-(4-chloro-2,5-dimetoxyfenyl)etan-1-amin (2C-C), 2-(4-etyl-2,5-dimetoxyfenyl)-etanamin (2C-E), 2-(4-iodo-2,5-dimetoxyfenyl)etan-1-amin (2C-I), 2-[2,5-dimetoxy-4-(metylsulfanyl)fenyl]etan-1-amin (2C-T), 2-[4-(etylsulfanyl)-2,5-dimethoxyfenyl]etan-1-amin (2C-T-2) a 2-[2,5-dimetoxy-4-(propylsulfanyl)fenyl]etan-1-amin (2C-T-7).



Obr. 4: Molekulární struktura vybraných halucinogenů ze skupiny 2C. Upraveno podle en.wikipedia.org

2.2.2 2C-B

Halucinogen 2C-B (2-(4-Bromo-2,5-dimethoxyfenyl)ethanamin), slangově také Nexus, Venus nebo Bromo, byl prvně syntetizován A. Shulginem v roce 1974 (Shulgin & Carter, 1975). Na krátkou dobu našel své využití dokonce v psychiatrii, ale vzhledem k zákazu užívání psychoaktivních látek v 70. letech se od těchto léčebných metod brzy upustilo. Nyní je jednou z nejrozšířenějších NPS na černém trhu v Evropě (King, 2014).



Obr. 5: Molekulární struktura 2C-B. Převzato od Papoutsis & Nikolau, 2015.

2C-B funguje jako inhibitor serotoninových transportérů, částečně také noradrenalinových a dopaminových (González et al., 2015). Zvyšuje hladiny dopaminu v nucleus accumbens a snižuje hladiny jeho derivátu kyseliny 3,4-hydroxyfenyloctové, což naznačuje inhibici působení monoaminoxidázy (Páleníček et al., 2013). Také působí jako částečný agonista 5-HT_{2A} a 5-HT_{2C} receptorů (Rickli et al., 2015). Zajímavý poznatek přinesly studie na oocytech žab *Xenopus laevis*, kde 2C-B fungovalo jako slabě afinní agonista, resp. jako antagonist 5-HT_{2A} receptorů (Acuna-Castillo et al., 2002, Villalobos et al., 2004). Pro molekulární strukturu 2C-B viz Obr. 5.

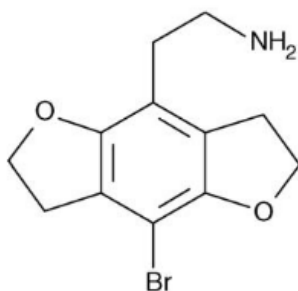
Dle reportů uživatelů je běžná dávka 2C-B kolem 20 mg při perorálním užití (Caudevilla-Galligo et al., 2012). V nižších dávkách (pod 10 mg) vyvolává pocity euforie a stimulaci, ve vyšších dávkách (10-20 mg) má halucinogenní a entaktogenní účinky podobné MDMA. V extrémní dávce (nad 30 mg) se chová jako velmi silný halucinogen, může vyvolat tachykardii, hypertenzi a hypertermii (Huang & Bai, 2011). 2C-B se užívá hlavně perorálně, málokdy nazálně – šňupání 2C-B je údajně velmi bolestivé. Účinky trvají kolem 6-8 hodin.

Studie zkoumající akutní účinky této látky zjistila rozdílné působení 2C-B podle pohlaví – sníženou únavu a účinky podobné amfetaminu u mužů a spíše entaktogenní účinky u žen (González et al., 2015).

2.2.3 2C-B-Fly

2C-B-Fly (2-(4-bromo-2,3,6,7-tetrahydrofuro[2,3-f][1]benzofuran-8-yl)ethanamin) je dihydrodifuranový analog molekuly 2C-B, viz Obr. 6. Prvně byl syntetizován v roce 1996

a vyskytuje se na černém trhu jako rekreační droga, přesto bylo provedeno mizivé množství odborných studií popisujících farmakologické působení tohoto halucinogenu.



Obr.6: Molekulární struktura 2C-B-Fly, převzato z Westphal et al., 2008.

2C-B-Fly působí jako potentní částečný agonista 5-HT_{2A} receptorů, se silnou afinitou se váže i na další serotoninové receptory, mj. na 5-HT_{1A}, 5-HT_{2B} a 5-HT_{2C} (González et al., 2015). Monoaminové transportéry blokuje jen ve velmi silných dávkách. Chová se jako halucinogen s entaktogenními účinky podobnými MDMA (Rickli et al., 2015).

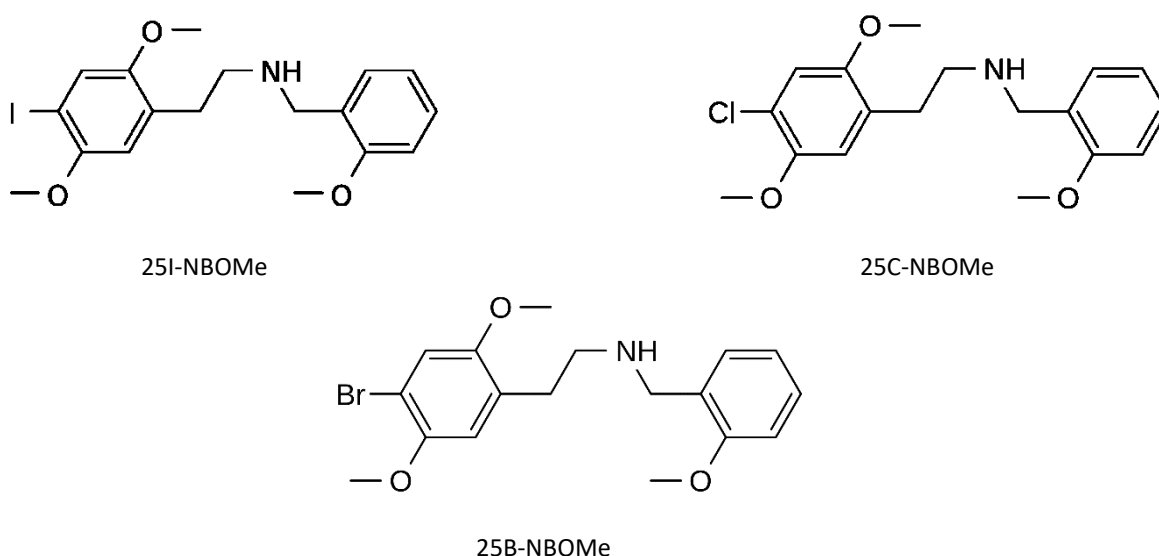
Užívá se v miligramových dávkách, A. Shulgin popisuje jako vhodnou dávku při perorálním užití 10 mg. Internetová fóra udávají dávku 10-18 mg orálně pro střední sílu účinků, nad 25 mg se už projevuje velmi silně. Nástup účinků bývá kolem 30-90 min, doba trvání je kolem 6-8 hodin. Působí jako halucinogen, v nižších dávkách má entaktogenní účinky. Podobá se 2C-B, meskalinu či MDA. Vznikají pocity euforie, empatie, jasnějších barev, vizuálních halucinací, mydriáza, snížená chuť k jídlu, pocení, stimulační efekt, zmatenost a neklid. Toxicita 2C-B-Fly není známá, byla zaznamenána dvě úmrtí v roce 2009 v Dánsku a USA, ale nakonec šlo o záměnu s příbuznou a mnohem silnější látkou Bromo-DragonFLY, která se na rozdíl od 2C-B-Fly dávkuje v řádech mikrogramů (erowid.org).

2.3 NBOMe substance

2.3.1 Charakteristika

Za nejnovější skupinu NPS s rychle rostoucí popularitou jsou považovány N-2-methoxybenzylové (tzv. „NBOMe“) deriváty fenyletylaminu z rodiny 2C halucinogenů. Původně byly vyvinuty pro efektivnější výzkum 5-HT_{2A} receptorů, kolem roku 2010 se však objevují v prodeji na internetu jako „research chemicals“, odkud se dostávají na drogovou scénu (Elz et al., 2002, Zuba & Seku, 2012). Poměrně snadná syntéza, dostupnost přes internet a stále legální status ve většině zemí vede k rychlému šíření těchto látek.

Nejčastěji se vyskytujícími zástupci této skupiny jsou 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyfenyl) metyl]etanamin (25B-NBOMe), 2-(4-Chloro-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyfenyl)metyl]etanamin (25C-NBOMe) a 2-(4-Iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyfenyl)metyl]etanamin (25I-NBOMe), pro jejich molekulární strukturu viz Obr. 7.



Obr. 7: Strukturní vzorce 25I-NBOMe, 25C-NBOMe a 25B-NBOMe, upraveno podle Halberstadt 2017.

2.3.2 Farmakokinetika a farmakodynamika

Objev NBOMe substancí se pojí s pokusy o modulaci molekuly 5-HT_{2A} antagonisty ketanserinu. Jeho deriváty v experimentu překvapivě působily na stejný receptor jako slabí parciální agonisté, což postupně vedlo k dalším úpravám na principu vztahu

struktura-aktivita a ke vzniku až 250x silnějších parciálních agonistů. Tento postup úprav k vyšší potenci molekul přidáním konkrétních chemických skupin (N-2-methoxybenzylové, N-2-hydroxy-benzylové) aplikovaný u řady dalších látek nakonec vedl ke vzniku NBOMe (Elz et al., 2002). Tyto látky obsahují N-2-methoxybenzylovou skupinu, která dramaticky zvyšuje jejich afinitu k 5-HT_{2A}R. Jejich velmi silný parciální agonismus byl potvrzen v *in vitro* esejích, kdy k vazbě na receptory stačily subnanomolární koncentrace (Elz et al., 2002, Ettrup et al., 2010), 25C-NBOMe bylo v *in vitro* vazebné studii označeno dokonce jako „superpotentní“ látka (Braden et al., 2006). Na druhou stranu zvýšená afinita nevedla ke stejně výraznému navýšení potence aktivace receptoru *in vitro*. Přesto oproti serotoninu vykazují až 1350x vyšší potenci (Heim, 2003). K receptoru jsou také vysoce selektivní. Prokázala se také významná interakce s α -adrenergními, dopaminovými a histaminovými receptory, interakce s monoaminovými transportéry se zdá být jen malá (Rickli et al., 2015). V *in vitro* vazebných studiích a *in vivo* zobrazovacích studiích často nesou označení Cimbi-x podle Centra pro integrované molekulární zobrazování mozku v Dánsku (Ettrup et al., 2010, Ettrup et al., 2011).

NBOMe jsou nejspíše masivně metabolizovány, z 25I-NBOMe bylo detekováno 37 vzniklých metabolitů ve fázi I a 31 metabolitů ve fázi II biotransformace (Caspar et al., 2015). V případové studii vážné intoxikace mladé dívky látkou 25I-NBOMe byla provedena detekce látky v moči. Tři hodiny po aplikaci byla zaznamenána 80x vyšší koncentrace demetylovaného metabolitu oproti parentální látce, další demetylovaný produkt byl přítomen v koncentraci podobné 25I-NBOMe (Stellpflug et al., 2013).

Zatím postrádáme standardizovaný postup detekce těchto látek a jejich metabolitů v organismu. Je pravděpodobné, že po jejich zavedení bude případů spojených s těmito látkami detekováno mnohem více.

2.3.3 Formy aplikace a účinky

NBOMe látky se na černém trhu vyskytují ve formě papírků napuštěných roztokem aktivní látky (slangově „blotter“ nebo „trip“), prášku nebo roztoku. Nástup a trvání jejich účinku se liší podle cesty vstupu do organismu, nejčastější je sublinguální aplikace, kdy pro nástup účinku stačí nepatrné, výrazně submiligramové koncentrace, práh nástupu

účinků je udáván kolem 100-250 µg (Suzuki et al., 2014). Dále je častá nazální aplikace s rychlým a intenzivním nástupem účinků (Bersani et al., 2014). Mohou se požit také bukálně, orálně, intramuskulárně, intravenózně nebo rektálně. Zajímavé je, že při perorálním podání mají NBOMe velmi nízkou biodostupnost vlivem efektu prvního průchodu a vysoké jaterní clearance (Leth-Petersen et al., 2018). Účinky podle typu administrace a velikosti dávky trvají kolem 3-13 hodin, někdy však mohou setrvávat i několik dní.

Mezi vyhledávané účinky patří podobně jako u psilocybinu nebo LSD pocity euforie, silné halucinace (vizuální, auditorní a jiné), mystické zážitky, zvýšená empatie (Suzuki et al., 2014). Vykazují ale také stimulační účinky (Tang et al., 2014). Reporty rekreačních uživatelů připodobňují účinky NBOMe k účinkům LSD a MDMA.

2.3.4 Rizika spojená s užíváním NBOMe

Jeden z faktorů nebezpečnosti NBOMe (a mnoha jiných NPS) je to, že se často vydávají za jinou, „klasickou“ – tedy nelegální drogu. V internetových obchodech bývají běžně prodávány jako „falešné“ nebo „legální LSD“. Problém této záměny je v diametrálně odlišné toxicitě, LSD je v organismu dobře snášené, naopak NBOMe substance za pár let existence zapříčinily už řadu fatálních intoxikací (Passie et al., 2008, Andreasen et al., 2015; Kanju et al., 2015; Poklis et al., 2014; Walterscheid et al., 2014).

Jeden vzorek může obsahovat vedle hlavní látky hned několik dalších NBOMe, ačkoliv spíše v minimálním množství jako nečistoty vzniklé během procesu ilegální výroby. Takto mohou být neúmyslně požitý různé kombinace drog (Poklis et al., 2015).

Existují významné fluktuace v naměřených koncentracích na aplikačních papírcích, patrně z nedokonalého procesu výroby v nelegálních laboratořích. Reálné koncentrace aktivních látek jsou pak i 3x vyšší než udávané (Coelho Neto, 2015, Poklis et al., 2015).

Předávkování NBOMe se projevuje úzkostí, zmatkem, dezorientací, panikou, agresí, šokem, mohou se projevit bizarní projevy chování, ztráty vědomí i pokusy o sebevraždu (Suzuki et al., 2014). Objevují se fyziologické symptomy odpovídající serotoninovému a sympatomimetickému syndromu: hypertenze, tachykardie, mydriáza

zornic, hypertermie, metabolická acidóza, rhabdomyolýza, selhání jater a diseminovaná intravaskulární koagulace (Andreasen et al., 2015, Kanju et al., 2015). Pro snížení akutní sympatomimetické toxicity se lékařsky podávají benzodiazepiny, při akutní serotoninové toxicitě se aplikuje roztok rokuronia (Stellpflug et al., 2013, Humston et al., 2017).

2.3.5 Případové studie – extrémní intoxikace

První zaznamenaný případ smrti v souvislosti s NBOMe z Austrálie popisuje kombinovanou toxicitu tří látek z této skupiny: 25I-NBOMe, 25H-NBOMe a 25C-NBOMe. Mladá žena (23 let) požila bílý prášek v domněnání, že se jedná o LSD. Začala projevovat známky agitace, mluvila nesrozumitelně, poté křičela, chovala se agresivně, záchvatově, následně zvracela a zkolabovala. Toxikologický rozbor potvrdil největší koncentraci 25I-NBOMe, zbylé dvě látky se našly v mizivém množství. V těle se navíc našly i zbytky dalších drog, THC, methylamfetaminu a prometazinu (Kueppers & Cooke, 2015).

25I-NBOMe

S látkou 25I-NBOMe se zatím pojí nejvíce případů vážných a smrtelných intoxikací zapříčiněných NBOMe substancemi. Důvodem je zřejmě největší poptávka po této konkrétní látce (Lawn et al., 2014). K tomu se často nechtěně zaměňuje za LSD. Negativní příznaky zahrnují tachykardii, hypertenzi, úzkosti, zmatek, paranoidní chování, vyskytují se i pokusy o sebevraždu ve snaze ukončit velmi nepříjemnou zkušenost (Suzuki et al., 2014). Může nastat akutní multiorgánové selhání. Jeden případ zaznamenává vypadnutí jedince z balkonu při intoxikaci (Poklis et al., 2014).

25B-NBOMe

První případ úmrtí na tuto látku byl zaznamenán v Japonsku. Příznaky intoxikace 25B-NBOMe mohou zahrnovat nejprve potíže s artikulací, následně křik, začíná se projevovat agresivní chování, křeče, tachykardie, tachypnoe, hypertermie vyžadující aktivní chlazení hlavy, hypertenze, mydriáza a pomalá reakce očí na světlo, následně se může rozvinout naopak hypotenze, rhabdomyolýza, acidóza a multiorgánové selhání.

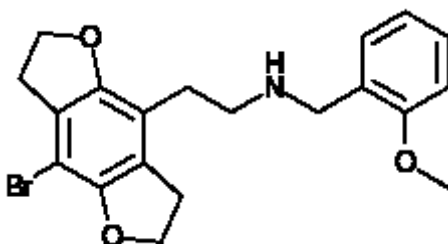
Autopsie může odhalit svalové, subkutánní, subdurální nebo subarachnoidální krvácení (Poklis et al., 2013, Yoshida et al., 2015). Průběh intoxikace může zahrnovat také bledost, cyanózu a arytmie, vedoucí až k ventrikulárním fibrilacím a následně srdeční zástavě (Al-Imam, 2018).

25C-NBOMe

Případ smrtelné intoxikace mladého muže v Dánsku, který ale halucinogen zkombinoval s THC a s vysokou dávkou amfetaminu, vedl k příznakům serotoninového syndromu. 25C-NBOMe užili dva lidé, u jednoho proběhla intoxikace bez negativních následků, druhý zemřel 12 hodin po požití halucinogenu. Nastala hypertermie, naměřená teplota tělesného jádra byla 40°C, nastalo difuzní krvácení ze sliznic, respirační a metabolická acidóza, rhabdomyolýza, vysoká hladina kyseliny mléčné, anurie a hyperkalémie. Vzniklo orgánové přeplnění, slizniční krvácení a krvácení ze všech dutin, nastalo multiorgánové selhání. V organismu bylo detekováno 25C-NBOMe a jeho metabolity (Andreasen et al., 2015).

2.4 2CBFly-NBOMe

Substance 2CBFly-NBOMe, jinak nazývaná NBOMe-2C-B-Fly, systematickým názvem *N*-(2-methoxy-benzyl)-1-(8-bromo-2,3,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-b:4,5-b']difuran-4-yl)-2-aminoethan, patří do skupiny syntetických, *N*-benzylových derivátů fenetylaminu. Název této látky je částečně odvozen od vzhledu její molekuly – dva furanové kruhy a benzenové jádro, ke kterému jsou připojeny, tvoří dohromady strukturu připomínající mušku s křídélky, viz Obr. 8..



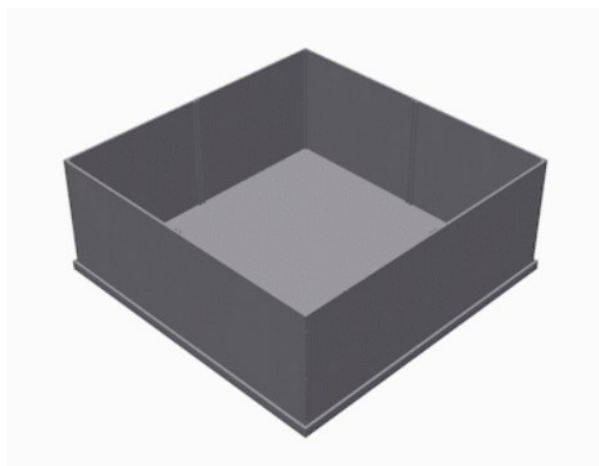
Obr. 8: Strukturní vzorec 2CBFly-NBOMe, převzato z en.wikipedia.org

2CBFly-NBOMe původně vzniklo pod názvem Cimbi-31 za účelem zkoumání molekulárních mechanismů působení 5-HT_{2A} receptoru. Srovnávací *in vitro* vazebná studie devíti Cimbi fenetylaminů naměřila u Cimbi-31 jednu ze dvou nejvyšších afinit k receptoru, pozitronová emisní tomografie v *in vivo* studii na prasatech odhalila významnou distribuci této látky v kortexu po intravenózní aplikaci radioznačeného ligandu (Ettrup et al., 2011). Doposud ale bylo provedeno jen mizivé množství studií a neexistuje žádný experiment, který by mapoval její účinky na fyziologické procesy živého organismu. Proto, jelikož je spíše otázkou času, než se tato potentní látka vyskytne na černém trhu a bude využívána rekreačně, jsme se rozhodli určit farmakokinetický profil 2CBFly-NBOMe a také vyhodnotit jeho akutní účinky na chování a termoregulaci laboratorních zvířat.

2.5 Animální modely

2.5.1 Test otevřeného pole

Test otevřeného pole (Open field test, OFT) je základním behaviorálním experimentem pro měření exploračního chování a celkové aktivity zvířat. Nejčastěji se provádí na laboratorních potkanech nebo myších, mohou ho podstoupit chovná zvířata, existuje také lidská varianta OFT (Fraser, 1974; Kilgour, 1975; de Passillé et al., 1995; Walz et al., 2016). Aréna je nejčastěji čtvercového tvaru, používá se také obdélníkový nebo kruhový tvar. Okraje jsou ohraničeny stěnami k zamezení úniku zvířete. Plocha OFT musí být výrazně větší než plocha běžné ubikace zvířete (Hall, 1934). Viz. Obr. 9.



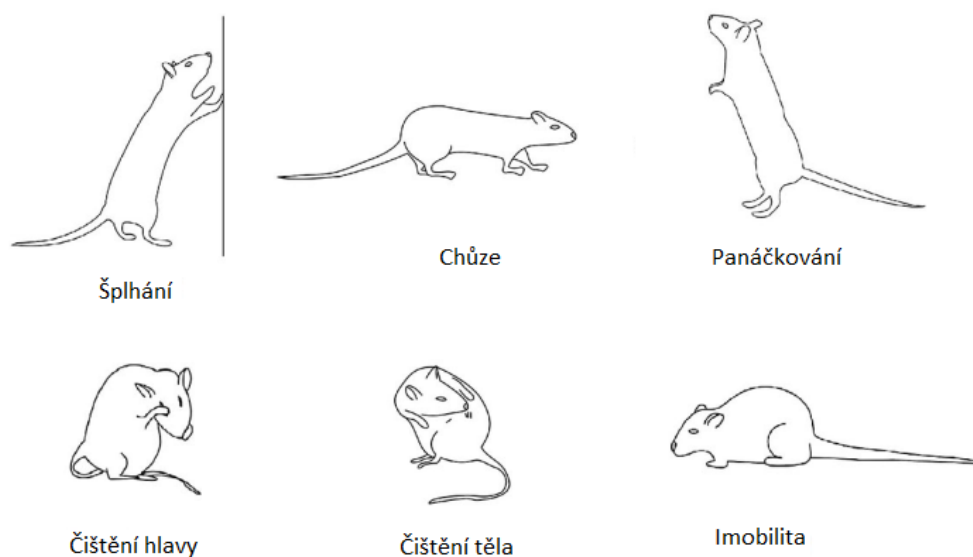
Obr. 9: Standardní aréna pro test otevřeného pole. Převzato z noldus.com

Základním výstupem je míra lokomoce testovaných subjektů. Bývá nejvíce ovlivněna vůlí explarovat nové prostředí, což je přirozené chování spojené s hledáním potravy. Další naměřenou proměnnou může být celkový čas aktivity zvířete, horizontální a vertikální distribuce lokomoce. Vůle zvířat explarovat arénu je v konfliktu s dalším (pro hlodavce charakteristickým) chováním – tigmotaxí, tj. výraznou preferencí pohybu v okrajových zónách arény (blízko stěn). Souvisí s přirozeným strachem z nekrytého, jasně osvětleného prostoru. Míra tigmotaxe se běžně užívá jako korelát anxiety u zvířat, dalším parametrem vyšší anxiety může být zvýšená defekace zvířat (Hall, 1934; Valle, 1970).

Za přirozených podmínek zvíře začne postupem času prozkoumávat i centrální zóny arény, začne jevit známky habituace na prostředí arény (čistění srsti na konkrétním místě). Je možné pozorovat také snižující se míru lokomoce zvířat v průběhu testu (Eilam & Golani, 1989). Pro názorné schéma nejdůležitějších hodnocených prvků chování zvířat v testu - viz Obr. 10.

OFT slouží nejčastěji ke zmapování účinků podaných látek. Po podání psychedelik se objevují změny lokomoce oproti kontrolním zvířatům – typicky se u nich projevuje bifázický efekt na základě podané koncentrace nebo časového odstupu experimentu od aplikace (Yamamoto & Ueki, 1975; Páleníček et al., 2008; Páleníček et al., 2013).

OFT je pro vyšší reliabilitu výsledků vhodné provést v kombinaci s minimálně jedním dalším testem anxiety (např. test vyvýšeného křížového bludiště) z důvodu potenciálních rozdílů v baseline anxiety vlivem rozdílů v handlingu a emočnímu statusu zvířat (Schmitt, 1998; Ramos, 2008).



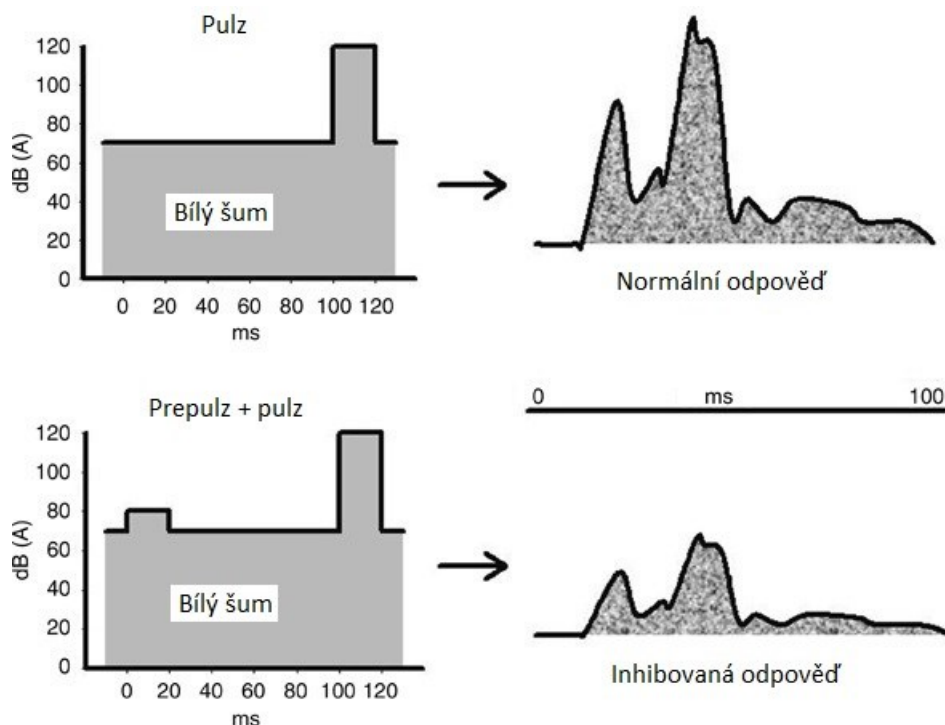
Obr. 10: Typické prvky chování potkanů. Upraveno podle Casarrubea et al., 2015

V mechanismu bifázického účinku psychedelik na lokomoci zvířat hraje důležitou roli dopaminergní systém. Aktivace serotoninového systému má své přímé účinky na organismus, nepřímo ale psychedelika mohou přes aktivaci 5-HT_{2A} a 5-HT_{2C} receptorů modulovat právě výlev dopaminu (Páleníček et al., 2013; Vollenweider et al., 1998).

Zvýšené koncentrace tohoto neurotransmiteru jsou spojeny se stimulačními účinky drog (Bankson & Cunningham, 2001; Halberstadt et al., 2008). Navýšení jeho hladin může být natolik výrazné, že vyvolá opožděnou stimulaci – prodleva aktivace dopaminergních neuronů je patrně provázaná s farmakokinetickým profilem psychoaktivní látky, především rychlostí její dostupnosti do mozkové tkáně.

2.5.2 Prepulzní inhibice akustické úlekové reakce

Prepulzní inhibice (prepulse inhibition, PPI) akustické úlekové reakce (acoustic startle response, ASR) je paradigma používané pro měření narušení senzomotorického zpracování informací testovaného subjektu (Geyer et al., 1993). Pokusným subjektům se pouští výrazné zvukové pulzy, a to samostatně nebo velmi rychle po krátkém zvukovém prepulzu. Délka a intenzita prepulzů je různá, intenzita je ale vždy jen nepatrně větší oproti intenzitě kontinuálního šumu. Následná ASR na hlavní pulz po expozici prepulzu je u zdravých subjektů snižena. Viz. Obr. 11.



Obr. 11: Schéma prepulzní inhibice akustické úlekové reakce u zdravého jedince. Převzato a upraveno z Encyclopedia of psychopharmacology.

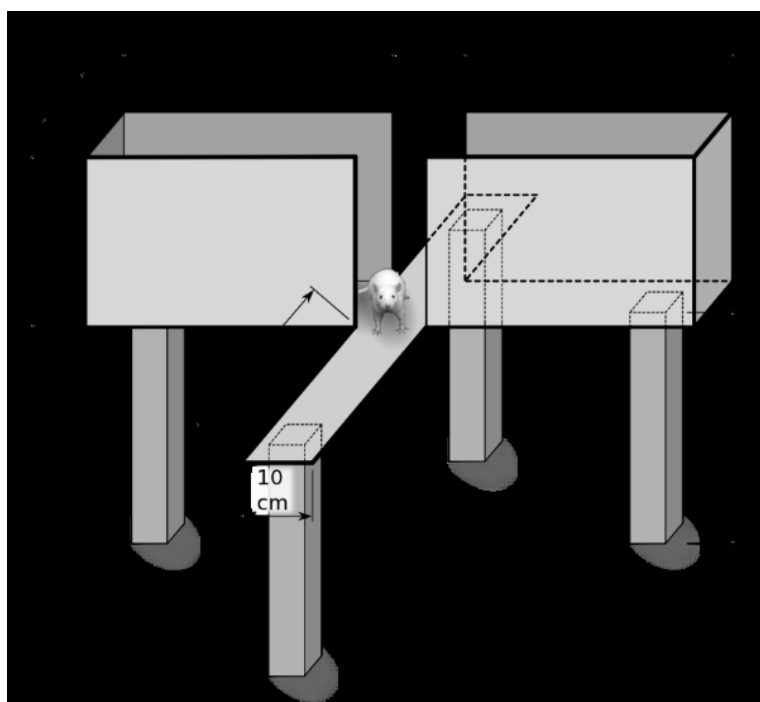
Mechanismus sensorimotorického zpracování informací však bývá narušen typicky při výskytu psychotického onemocnění, typicky schizofrenie (Braff & Mark, 1990). V animálních experimentech bývá po administraci psychedelik pozorováno významné narušení PPI ASR (Krebs-Thomson et al., 2006; Ouagazzal et al., 2000; Sipes & Geyer, 1997). Ve studiích účinků psychedelik na člověka se hodnota PPI ASR liší v závislosti na časových intervalech mezi pulzy a prepulzy (Vollenweider et al., 2007).

2.5.3 Test vyvýšeného křížového bludiště

Test vyvýšeného křížového bludiště (Elevated plus maze, EPM) byl vyvinut jako animální model anxiety (Handley & Mithani, 1984). Bludiště tvoří dvě otevřená, dvě uzavřená ramena (stejná ramena jsou naproti sobě) a malá centrální zóna, kam se zvíře na začátku experimentu vkládá (hlavou musí směřovat do otevřeného ramene), viz Obr. 12. Celá aparatura je ve výšce 50 cm nad podlahou. Analogicky k EPM se dá použít vyvýšené kruhové bludiště (Shepherd et al., 1994).

Princip EPM je v konfliktu apetence-averze (approach-avoidance) – strach ze světlého, vyvýšeného a otevřeného ramene a preference uzavřeného, málo osvětleného ramene (Handley & Mithani, 1984; Pellow et al., 1985). Hlavními výstupními parametry jsou celková lokomoce, počet vstupů do jednotlivých zón (ramena a centrální zóna) a čas v nich strávený. Mohou se sledovat i další prvky chování jako panáčkování, noření hlavy (head dips), protažení (stretch-attend) nebo míra defekace. Výrazně menší počet vstupů do uzavřených ramen, méně času stráveného v nich a vyšší míra defekace oproti kontrolní skupině zvířat jsou ukazateli vyšší anxiety.

Tento test se užívá hlavně k určení anxiolytického potenciálu farmak pro léčení úzkostných poruch, zjištění anxiolytického/anxiogenního profilu ostatních léků, drog a hormonů. Aplikace anxiolytik (např. benzodiazepiny) snižuje přirozenou averzi z otevřených ramen a zvířata poté více explorují v otevřených ramenech (Gentsch et al., 1987; Pellow et al., 1985). Psychedelika patrně působí spíše jako anxiogenní látky (Horsley et al., 2018; Cameron et al., 2018).



Obr. 12: Aparatura vyvýšeného křížového bludiště. Převzato z en.wikipedia.org

3. Cíle práce

Cílem této diplomové práce je zhodnotit akutní behaviorální a fyziologické účinky tří koncentrací nové syntetické drogy 2CBFLY-NBOMe.

Testované hypotézy:

H1_A: Akutní podání 2CBFLY-NBOMe ovlivní intenzitu lokomoční aktivity v OFT.

H1_B: Změna intenzity lokomoční aktivity bude rozdílná v závislosti na velikosti podané dávky.

H1_C: Změna intenzity lokomoční aktivity bude rozdílná v závislosti na časovém rozestupu mezi aplikací a měřením.

H2_A: Akutní podání 2CBFLY-NBOMe ovlivní prostorovou distribuci pohybu zvířete v OFT.

H2_B: Změna prostorové distribuce pohybu bude rozdílná v závislosti na velikosti podané dávky.

H2_C: Změna prostorové distribuce pohybu bude rozdílná v závislosti na časovém rozestupu mezi podáním látky a měřením.

H3_A: Akutní podání 2CBFLY-NBOMe ovlivní prostorovou distribuci pohybu zvířete v EPM.

H3_B: Změna prostorové distribuce pohybu bude rozdílná v závislosti na velikosti podané dávky.

H3_C: Změna prostorové distribuce pohybu bude rozdílná v závislosti na časovém rozestupu mezi podáním látky a měřením.

H4_A: Akutní podání 2CBFLY-NBOMe povede k narušení prepulzní inhibice akustické úlekové reakce.

H4_B: Míra narušení prepulzní inhibice úlekové reakce bude rozdílná v závislosti na velikosti podané látky.

H4_C: Míra narušení prepulzní inhibice úlekové reakce bude rozdílná v závislosti na časovém rozestupu mezi podáním látky a měřením.

H5_A: Akutní podání 2CBFLY-NBOMe způsobí změnu tělesné teploty.

H5_B: Změna tělesné teploty bude rozdílná v závislosti na velikosti podané látky.

H5_C: Změna tělesné teploty bude rozdílná v závislosti na prostředí, ve kterém budou změny sledovány (jeden vs. pět potkanů v boxu).

H5_D: Změna tělesné teploty bude rozdílná v závislosti na časovém rozestupu mezi podáním látky a měřením.

4. Materiál a metody

4.1 Experimentální zvířata

Všechny experimenty byly prováděny na potkaních samcích kmene Wistar (Velaz) o hmotnosti 250-300 g. Zvířata byla umístěna do ubikací po dvou, ve zvěřinci se stálými podmínkami (teplota $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, humidita 30-70 %, světelný režim 12:12h světlo:tma, světelná fáze 6-18h). Přístup k vodě a peletám měla zvířata po celou dobu *ad libitum*. Po přijetí byla zvířata týden uvykána na prostředí zvěřince a na experimentátory (každodenní handling a vážení). Každé zvíře bylo použito k experimentu pouze jednou z podstaty akutních behaviorálních experimentů, výjimkou byla kontrolní zvířata – v rámci pravidla 3R a ve snaze co nejvíce snížit počet použitých zvířat byla zvířata aplikovaná vehikulem v behaviorálních experimentech použita ke změření změn tělesné teploty. Všechny pokusy se řídily platnou legislativou ohledně ochrany zvířat.

4.2 Substance a dávky

Aktivní látka 2CBFly-NBOMe bylo zajištěna z firmy Alfarma, s.r.o. Před aplikací byla rozpuštěna v deionizované vodě, nejvyšší dávka 5 mg/kg musela být rozpuštěna pomocí ultrazvuku. Pro behaviorální experimenty byly zvířatům aplikovány tři koncentrace 2CBFly-NBOMe: 0.2, 1 a 5 mg/kg. Pro farmakokinetický test a měření tělesné teploty byla aplikována dávka 5 mg/kg. Kontrolním skupinám byla administrována deionizovaná voda. Veškeré aplikace byly podány injekčně subkutánně (s. c.) v celkovém objemu 2 ml/kg.

Dávky aktivní látky byly stanoveny s ohledem na:

- 1) detekci případného bifázického účinku 2CBFly-NBOMe
- 2) extrémní potenci NBOMe látek podle případových studií (Walterscheid et al., 2014)
- 3) dávky v behaviorální studii příbuzného 25I-NBOMe (Halberstadt, 2017)
- 4) výsledky *in vitro* vazebných studií, které prokázaly enormní afinitu a potenci 2CBFly-NBOMe a jiných NBOMe na 5-HT_{2A} receptorech (Ettrup et al., 2011; Rickli et al., 2015)
- 5) naše zkušenosti s příbuznými látkami testovanými na stejném kmene potkanů; jako nejnižší dávku jsme zvolili tu, která byla schopna vyvolat u těchto příbuzných látek

signifikantní behaviorální změny (LSD, Páleníček et al., 2010). Způsob podání látky s. c. byl zvolen proto, aby bylo možné získané výsledky porovnat s údaji o působení podobných psychoaktivních látek, které byly v naší laboratoři již testovány (2C-B, Páleníček et al., 2013; MDMA, Páleníček et al., 2011; LSD, Páleníček et al., 2010; meskalin, Páleníček et al., 2008).

4.3 Farmakokinetická analýza

Aktivní látka (5 mg/kg) byla s. c. aplikována 48 zvířatům (8 zvířat/skupina). Následné utrácení zvířat dekapitací proběhlo 30 min, 1, 2, 4, 8 a 24 hod po aplikaci a byly odebrány vzorky séra, mozku, plic, jater a ledvin. Séra a mozky byly uloženy v mrazáku při teplotě -20°C. Tkáně byly pro farmakokinetický rozbor expedovány do Laboratoře forenzní analýzy biologicky aktivních látek na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze, Technická 3, 166 28, Praha 6.

Postup při zpracování séra

200 µl séra bylo v mikrozkušnicích naředěno 200 µl 1% roztoku amoniaku a obsah byl homogenizován v Bullet Blender tkáňovém homogenizátoru (rychlost 2, doba 5 min). Pomocí automatického dávkovače bylo přidáno 400 µl ethyl-acetátu a obsah byl opět homogenizován (rychlost 3, doba 5 min); následně byl znovu přidán ethyl-acetát ve stejném množství a opět provedena homogenizace. Homogenizát byl poté odstředěn v centrifuze (10 min, 25°C, 12000 ot/min).

Do nových mikrozkušnic bylo odebráno 600 µl z horní vrstvy, bylo přidáno 50 µl 10% roztoku kyseliny mravenčí (HCOOH). Po protřepání byl roztok odpařen v CentriVap koncentrátoru. Odparek byl rozpuštěn ve 100 µl methanolu a třepán po dobu 10 minut. Před analýzou byl roztok naředěn deionizovanou vodou v poměru 1:1.

LC-MS analýza

K analýze vzorků bylo použito metody vysoce výkonné kapalně chromatografie (Ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC) v kapalinovém chromatografu Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies, USA) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólovým filtrem, Agilent 6460 Triple Quadrupole (Agilent Technologies, USA). Byla provedena ionizace Agilent Jet Stream elektrosprejem (Agilent Technologies, USA) v pozitivním módu. K separaci byla využita kolona Kinetex Biphenyl (100 × 2.1 mm, 2.6 μm) s předkolonou, vše termostatováno na 35°C. Byla použita gradientová eluce s mobilními fázemi A: 5 mM mravenčan amonný s přídatkem 0.01% HCOOH; B: methanol s přídatkem 0.01% HCOOH. Počáteční podmínky byly 10 % B, nárůst na 50 % B v 0.5 min a 100 % B ve 2 min, do 4 min byly podmínky konstantní a až v čase 4.5 min bylo složení mobilní fáze opět 10 % B; zbylé 2 min byly ponechány na 10 % B. Data byla sbírána v režimu monitorování vícenásobných reakcí (multiple reaction monitoring, MRM). Pro vyhodnocení byl zvolen jeden kvantifikační iont a tři konfirmační ionty. Vzorky byly kvantifikovány na základě matriční kalibrace provedené ve dvou opakováních, v duplikátu byly zpracovány i reálné vzorky.

4.4 Měření tělesné teploty

Tělesná teplota byla změřena rektálně digitálním teploměrem. Měření probíhalo v místnosti s kontrolovanou teplotou (22±2°C) a bylo provedeno vždy mezi 7:00 – 17:00. Při měření bylo každé zvíře vloženo do imobilizačního válce po dobu nezbytně dlouhou pro změření (přibližně 15 sekund), poté bylo opět vráceno zpět do ubikace. Zvířata byla během měření držena v boxech po jednom/pěti jedincích (viz Tab. 1) - cílem držení zvířat po pěti bylo alespoň částečně simulovat prostředí, ve kterém k užívání nových syntetických látek zpravidla dochází (uzavřené prostory tanečních klubů). Celkem bylo použito 40 zvířat rozdělených do čtyř skupin (10 zvířat/skupina) na základě druhu aplikované látky a počtu jedinců v boxu - viz Tab. 1. Aplikace látek byla provedena v 9:00, měření teplot probíhalo v 7:00, 8:00, 9:00, 9:30, 10:00, 10:30, 11:00, 12:00, 13:00, 14:00, 15:00, 16:00 a 17:00.

SKUPINA	LÁTKA	DÁVKA (mg/kg)	POČET POTKANŮ V BOXU
1	VEHIKULUM	-	1
2	2CBFly-NBOMe	5	1
3	VEHIKULUM	-	5
4	2CBFly-NBOMe	5	5

Tab. 1: Názorné schéma rozdělení zvířat do pokusných skupin podle druhu aplikované látky a celkového počtu potkanů v kleci; n = 10 zvířat/skupina.

4.5 Behaviorální experimenty

Behaviorální experimenty byly provedeny ve světelné fázi dne (zpravidla mezi 7:00 – 14:00) ve zvukově izolované místnosti s kontrolovanou teplotou ($22\pm 2^\circ\text{C}$). Zvířata byla rozdělena do experimentálních skupin na základě druhu aplikované látky a časového rozestupu mezi její aplikací a započítáním testu (OFT/PPI ASR) - viz Tab. 2. Dva různé časové rozestupy mezi aplikací látky a iniciací testu byly zvoleny s cílem zachytit případné opožděné účinky aktivní látky; délka těchto rozestupů byla stanovena na základě již známého farmakologického profilu příbuzného syntetického 2C-B (Rohanová et al., 2008). Před započítáním pokusů byla zvířata vždy přibližně hodinu uvykána na prostředí experimentální místnosti. Po celou dobu s nimi bylo zacházeno co nejšetrněji. Všechny používané aparatury byly mezi jednotlivými sezeními důkladně vymyty jarovou vodou a roztokem 30% ethanolu (EtOH) s cílem eliminovat případné pachové značky, jejichž přítomnost by mohla vést ke zkreslení výsledků.

SKUPINA	LÁTKA	DÁVKA (mg/kg)	ČASOVÝ ROZESTUP
1	VEHIKULUM	-	15 min
2	2CBFly-NBOMe	0.2	15 min
3	2CBFly-NBOMe	1	15 min
4	2CBFly-NBOMe	5	15 min
5	VEHIKULUM	-	60 min
6	2CBFly-NBOMe	0.2	60 min
7	2CBFly-NBOMe	1	60 min
8	2CBFly-NBOMe	5	60 min

Tab. 2: Názorné schéma rozdělení zvířat do pokusných skupin podle aplikované látky, dávky a časového rozestupu aplikace od začátku experimentu.

4.5.1 Test otevřeného pole

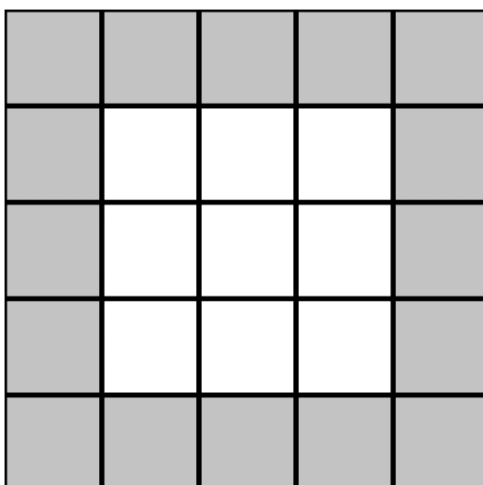
OFT byl proveden v rovnoměrně nasvícené aréně čtvercového tvaru (80 x 80 x 40 cm). Každé sezení bylo zahájeno šetrným umístěním zvířete do experimentální aparatury, kde mu byla umožněna volná explorace po dobu 30 minut.

Test absolvovalo celkem 80 potkanů (10 zvířat/skupina) rozdělených podle druhu aplikované látky, dávky a časového rozestupu mezi aplikací a testem – viz Tab. 2, Kap. 4.5 Behaviorální experimenty.

Každé zvíře bylo vloženo do středového čtverce OFT a ponechalo se 30 minut volně explarovat arénu. Jeho lokomoční aktivita byla automaticky registrována a následně zanalyzována pomocí programu EthoVision XT 14.0 (Noldus, Nizozemsko). Získány byly tyto parametry:

1. celková délka trajektorie pohybu
2. časový vývoj trajektorie v pětiminutových intervalech
3. prostorová distribuce trajektorie

Pro vyhodnocení prostorové distribuce trajektorie byla podstava pokusné arény virtuálně rozdělena na 25 čtvercových částí - 16 periferních a 9 centrálních (viz Obr. 13). Následně byla kvantifikována míra tigmataxe (pravděpodobnost výskytu zvířete v periferní zóně arény, $\frac{\sum f_{\text{periferní zóny}}}{\sum f_{\text{všechny zóny}}}$, f = celkový počet vstupů do každé zóny) a čas strávený v centrální části (suma časů strávených v centrálních čtvercích, $T_{\text{centr}} = \sum \text{čas}_{1-9}$).



Obr. 13: Virtuální rozdělení arény na 25 stejných čtvercových ploch k vyhodnocení prostorové distribuce pohybu zvířat v OFT. Šedé čtverce značí okrajové zóny (16), bílé čtverce centrální zóny (9) arény.

4.5.2 Prepulzní inhibice akustické úlekové reakce

Experiment PPI ASR byl proveden v komorách SR-LAB (San Diego Instruments, USA). Zvukotěsná, uvnitř rovnoměrně nasvícená komora obsahuje válec z průhledného plexiskla (vnitřní $\varnothing = 8.7$ cm) s piezoelektrickým akcelerometrem. Vysokofrekvenční reproduktor, tvořící akustické stimuly, je umístěný 24 cm nad válcem. Piezoelektrický akcelerometr s dynamickým kalibračním systémem pro stejnou citlivost komor zaznamenává hodnoty úlekových reakcí zvířat.

Celkem bylo otestováno 80 potkanů, kteří byli rozděleni do skupin (10 zvířat/skupina) na základě druhu aplikované látky a časového rozestupu mezi její aplikací a započítáním testu (viz Tab. 2, Kap. 4.5 Behaviorální experimenty).

Testovaná zvířata byla dva dny před testem po dobu pěti min habituována na prostředí aparatury, kde byla vystavena bílému šumu (75 dB) a celkem šesti samostatným pulzům o velikosti 125 dB a délce trvání 40 ms. V den experimentu byla potkanům aplikována příslušná látka, a to 15 nebo 60 minut před testem. Každé zvíře podstoupilo 72

sekvencí testu, mezi nimiž byl interval 15-30 s. Po pětiminutové aklimatizaci na kontinuální bílý šum následovalo šest samostatných pulzů (125 dB, 40 ms). Poté v pseudorandomizovaném pořadí následovalo 60 sekvencí různého typu:

1. samostatný úlekový pulz (125 dB, 40 ms)
2. prepulz (83 dB, 20 ms)
3. prepulz (83 dB, 20 ms), 30 ms interval mezi, úlekový pulz (125 dB, 40 ms)
4. prepulz (83 dB, 20 ms), 60 ms interval, úlekový pulz (125 dB, 40 ms)
5. prepulz (83 dB, 20 ms), 120 ms interval, úlekový pulz (125 dB, 40 ms)
6. prepulz (91 dB, 20 ms)
7. prepulz (91 dB, 20 ms), 30 ms interval, úlekový pulz (125 dB, 40 ms)
8. prepulz (91 dB, 20 ms), 60 ms interval, úlekový pulz (125 dB, 40 ms)
9. prepulz (91 dB, 20 ms), 120 ms interval, úlekový pulz (125 dB, 40 ms)
10. žádný podnět, bílý šum (75 dB, 60 ms)

Sada sekvencí byla zakončena šesti úlekovými pulzy (125 dB, 40 ms).

Naměřená data byla digitalizována pro statistickou analýzu. Byla vypočítána míra habituace (procentuální pokles motorické reakce mezi prvními a posledními šesti úlekovými pulzy), velikost ASR (průměrná hodnota motorické reakce na sekvence jen s úlekovými pulzy) a PPI dle vzorce: $\% \text{ PPI} = 100 - [(\text{průměrná motorická reakce na prepulz} + \text{úlekový pulz}) / (\text{průměrná motorická reakce na úlekový pulz}) * 100]$. Nonrespondentní zvířata, jejichž průměrná hodnota motorické reakce v průběhu iniciální sekvence šesti úlekových pulzů nepřesáhla 10 mikroV, nebyla zahrnuta do následné analýzy PPI.

4.5.3 Test vyvýšeného křížového bludiště

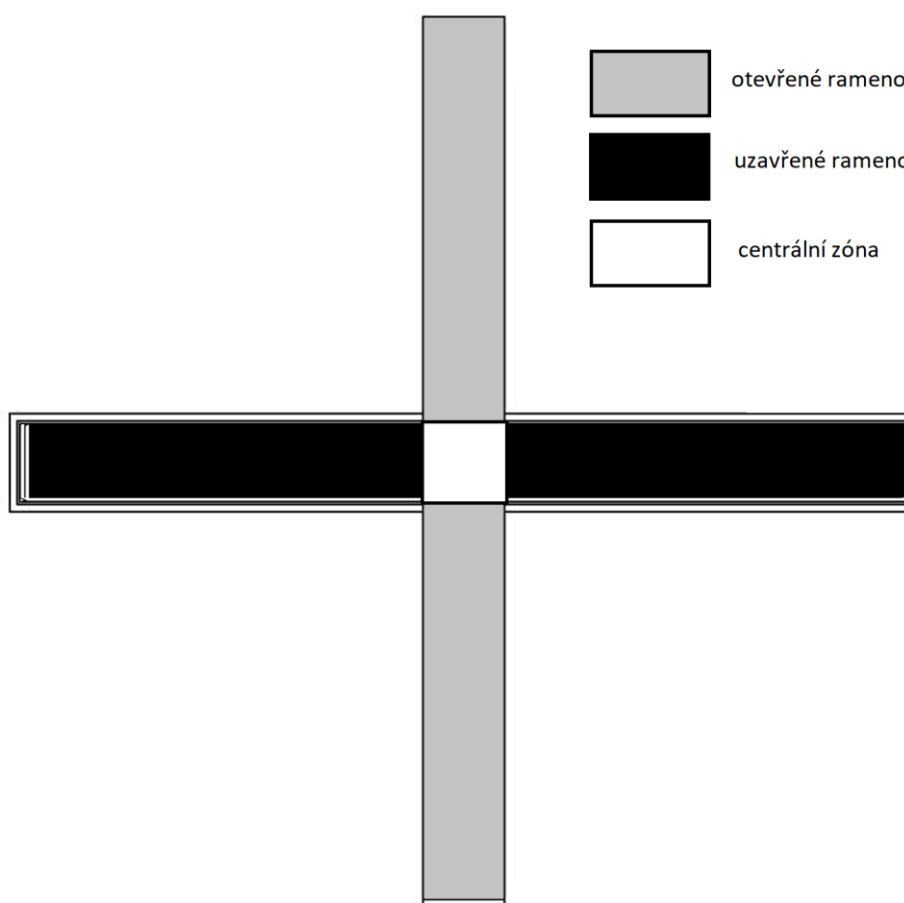
EPM test byl proveden v rovnoměrně nasvícené aparatuře z černého plastu (výška EPM = 50 cm, centrální část 10x10 cm, šířka ramen = 10 cm, délka ramen = 50 cm, výška uzavřených ramen = 40 cm).

Bylo otestováno 80 potkanů, kteří byli opět rozděleni do skupin na základě druhu aplikované látky a časového rozestupu mezi aplikací a započítáním testu (viz Tab. 2, Kap. 4.5 Behaviorální experimenty).

Každé zvíře bylo umístěno do centrální části arény tak, aby hlavou směřovalo vždy do otevřeného ramene. Poté mu byla po dobu pěti minut umožněna volná explorace v bludišti.

Data byla zaznamenána programem EthoVision XT 14.0 (Noldus, Nizozemsko) a zpracována v programech EthoVision XT 14.0 a Observer XT 12.5 (Noldus, Nizozemsko). Sledována byla míra lokomoce na základě délky celkové trajektorie zvířat a prostorová distribuce pohybu v jednotlivých zónách EPM (otevřená a uzavřená ramena, centrální oblast), viz Obr. 14.

Dvě zvířata, která během testu z aparatury seskočila, nebyla do výsledné analýzy zahrnuta (ze skupin: 1 mg/kg, časový rozestup 15 min a 5 mg/kg, časový rozestup 60 min).



Obr. 14: Schéma rozdělení arény EPM na tři zóny: dvě otevřená ramena (šedou barvou), dvě uzavřená ramena (černou) a centrální zónu (bílou). Pohled shora. Upraveno podle mazeengineers.com

4.6 Statistická analýza

Dvoufaktorová analýza rozptylu (Two-Way ANOVA) byla použita k vyhodnocení změn v celkové lokomoční aktivitě, prostorové distribuci pohybu v OFT a EPM a v míře habituace, ASR a PPI ASR. Do analýzy byly použity jako vstupní faktory léčba (vehikulum/2CBFly-NBOMe ve třech různých dávkách) a časový rozestup mezi aplikací a měřením (15/60 min). V případě významného rozdílu mezi jednotlivými skupinami potkanů v ASR byla tato proměnná použita jako kovariáta v následné analýze hodnot PPI provedené dvoufaktorovou analýzou kovariance (Two-Way ANCOVA).

Změny lokomoce v průběhu testu byly ohodnoceny pomocí třífaktorové analýzy variance pro opakovaná měření (Three-way repeated Measures ANOVA) s nezávislými meziskupinovými proměnnými: léčba (vehikulum/2CBFly-NBOMe ve třech různých dávkách) a časový rozestup mezi aplikací a měřením (15/60 min); 5-min intervaly do analýzy vstupovaly jako opakovaná proměnná.

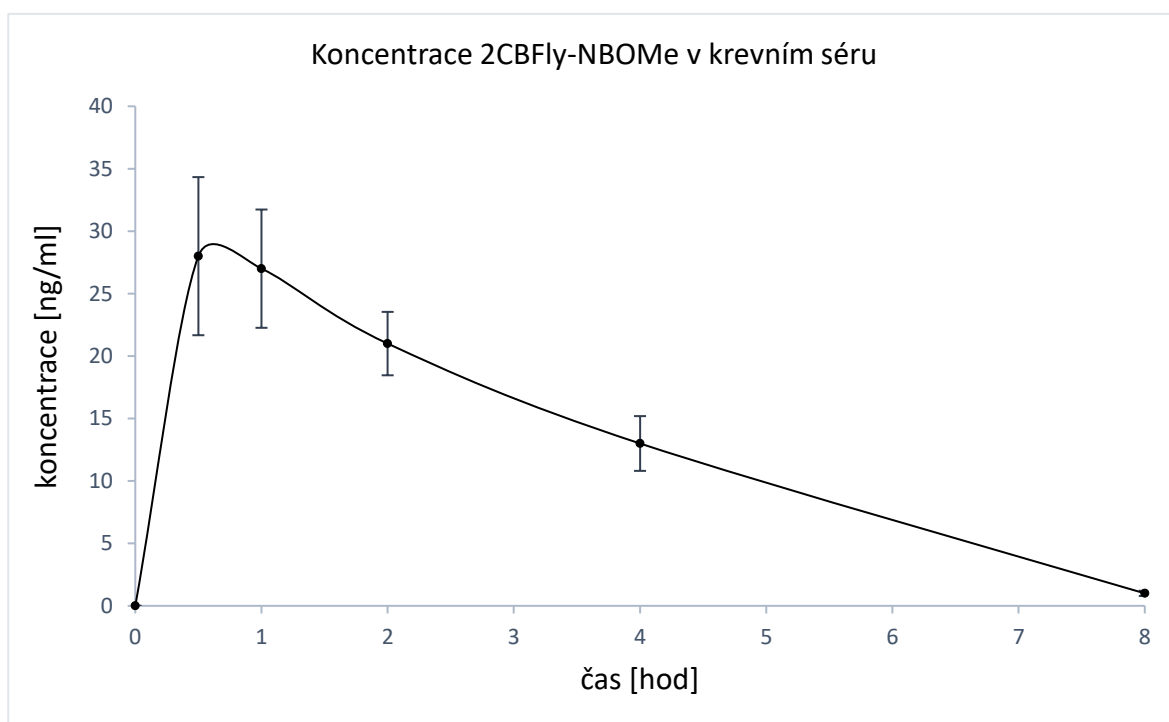
Třífaktorová analýza variance pro opakovaná měření byla použita rovněž pro ohodnocení změn tělesné teploty s nezávislými meziskupinovými proměnnými: léčba (vehikulum/2CBFly-NBOMe ve třech různých dávkách) a počet zvířat ve sdíleném boxu (jeden/pět potkanů) a časem měření jako opakovanou proměnnou. Takto byly porovnány i baselinové hodnoty sledovaných zvířat (naměřené před aplikací látky - tj. v 7:00, 8:00 a 9:00).

Jako signifikantní byly brány rozdíly nad 5 % hladiny významnosti ($\alpha < 0.05$). Následná post hoc porovnání byla provedena Tukey testem. Data byla vyhodnocena v programu STATISTICA 9.1 (StatSoft).

5. Výsledky

5.1 Farmakokinetická analýza

Výsledek farmakokinetické analýzy zvířat ($n = 8$) je znázorněn v Grafu 1. Nejvyšší průměrná koncentrace aktivní látky v séru ($28 - 27$ ng/ml) byla pozorována během 30 – 60 minut od aplikace, 8 hodin po aplikaci byla přítomnost drogy v séru již jen těsně nad detekčním limitem. Koncentrace 2CBFly-NBOMe v mozku, plicích, játrech ani ledvinách se zkvantifikovat nepodařilo.

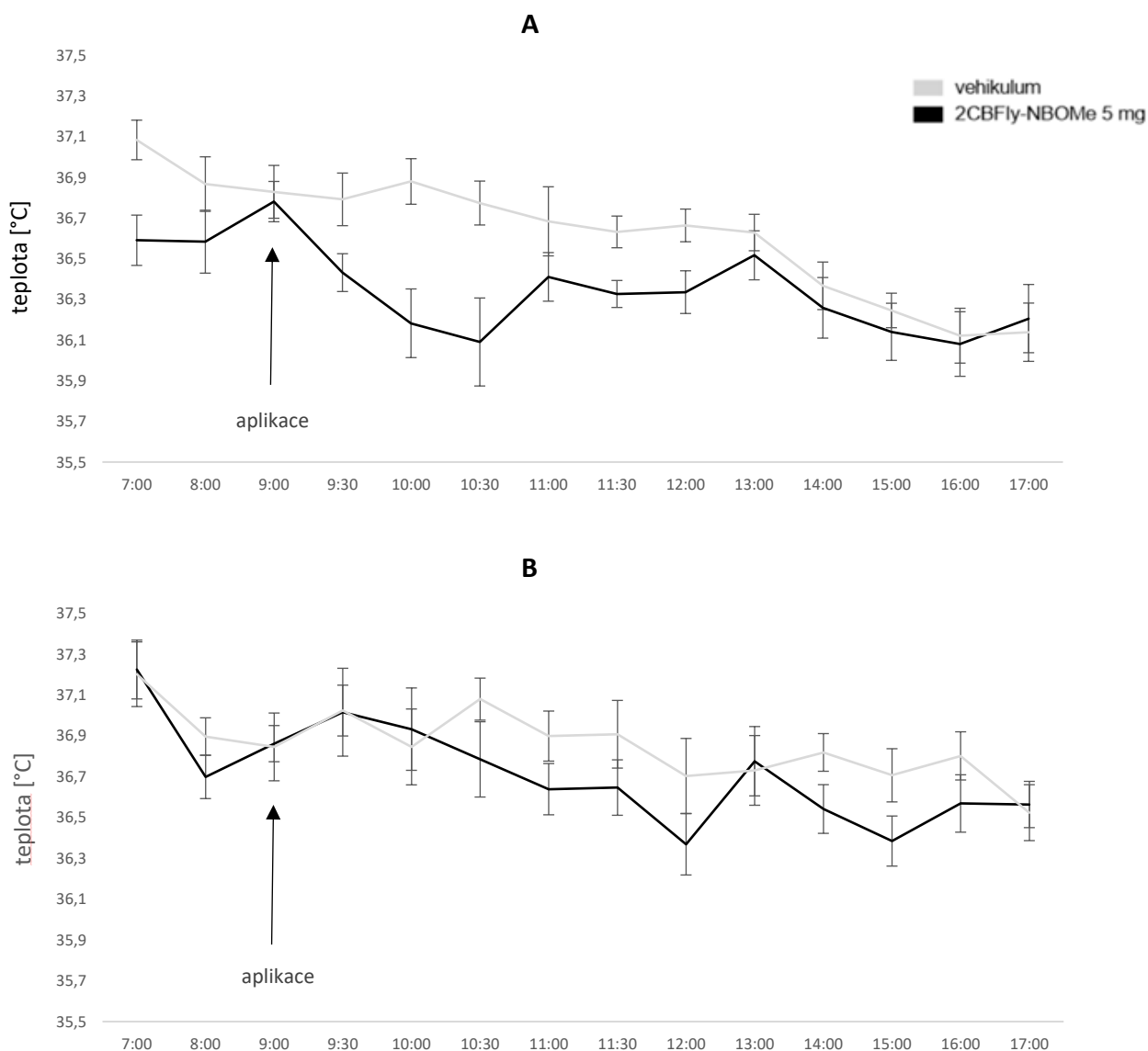


Graf 1: Časový průběh koncentrace 2CBFly-NBOMe v krevním séru zvířat ($n = 8$) po s. c. podání 5 mg/kg. Vyneseny jsou průměry, chybové úsečky zobrazují ± 1 SEM.

5.2 Vliv 2CBFly-NBOMe na tělesnou teplotu

Baselinové hodnoty tělesné teploty jednotlivých skupin potkanů se významně nelišily, signifikantní byl pouze jejich rozdílný časový vývoj u zvířat držných jednotlivě a po pěti jedincích (interakce čas x počet potkanů v boxu [$F(2, 72) = 3,88, p = 0,025$], viz Graf 2). Po aplikaci látek byl zjištěn významný vliv léčby [$F(1, 36) = 6,373, p = 0,016$], projevující se celkovým snížením tělesné teploty u potkanů intoxikovaných aktivní látkou

(průměrně o 0.2°C nižší oproti teplotě kontrolních zvířat). Dále byl zjištěn výrazný vliv počtu potkanů v boxu [F (1, 36) = 15,395, p < 0.001], teplota potkanů držných po jednom byla celkově nižší, než tomu bylo v případě jedinců sdílejících klec po pěti (průměry: 36,4°C vs. 36,7°C). Významná byla také interakce čas x počet potkanů v boxu [F (11, 396) = 1,913, p = 0,036]. Vzhledem k významnému vlivu počtu zvířat v kleci na hodnoty teplot i na jejich časový vývoj (interakce čas x počet potkanů v boxu) byla následná post hoc porovnání provedena pro jednotlivá prostředí zvlášť. Nejvýznamnější snížení teploty vyvolané aktivní látkou bylo zjištěno u jednotlivě držných zvířat v prvních 90 minutách po aplikaci (10:00 - p = 0.020, 10:30 - p = 0.030; viz Graf 2). U potkanů držných po pěti byl pozorován pouze obdobný, o půl hodiny opožděný, nesignifikantní trend. Viz Graf 2.

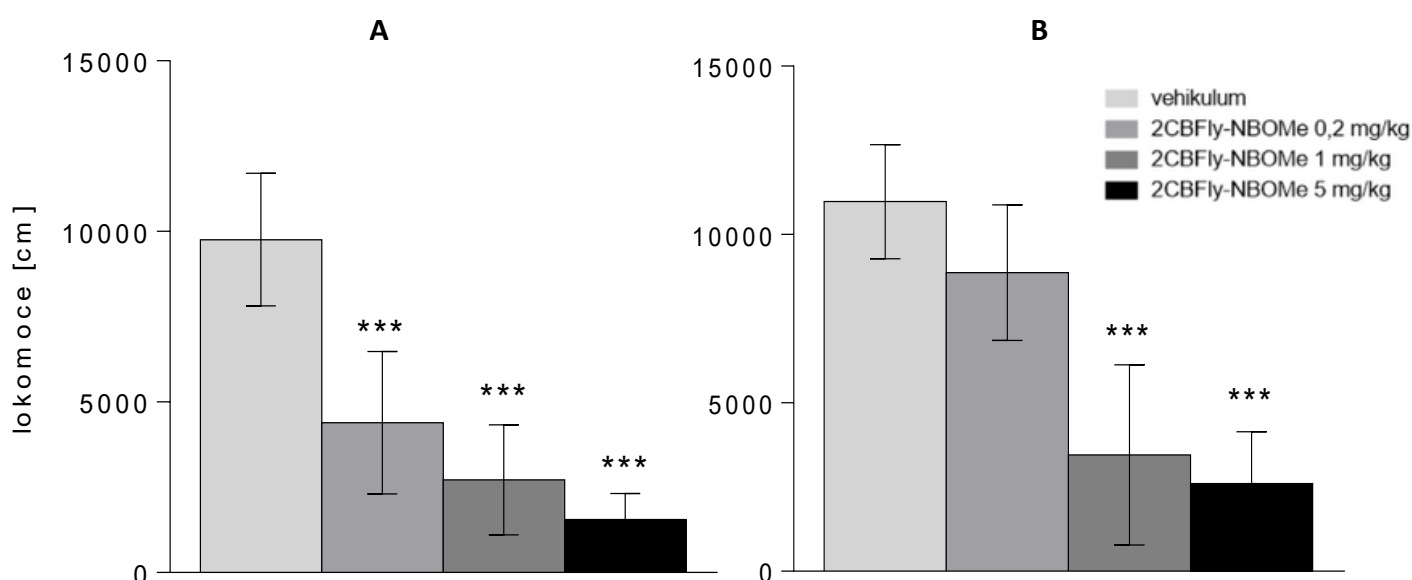


Graf 2: Porovnání průměrných rektálních teplot zvířat držných (A) po jednom; (B) po pěti v boxu. V 9:00 proběhla aplikace. Chybové úsečky zobrazují ± 1 SEM.

5.3 Vliv 2CBFly-NBOMe na lokomoční aktivitu

5.3.1 Celková lokomoční aktivita

Celková délka trajektorie pohybu byla v OFT významně ovlivněna léčbou [F (3,72) = 64.911, $p < 0.001$] a časovým rozestupem mezi aplikací a měřením [F (1,72) = 13.416, $p < 0.001$]. Signifikantní byla rovněž interakce léčba \times časový rozestup [F (3,72) = 4.545, $p = 0.006$] - následné post hoc testy byly proto provedeny pro jednotlivé časové rozestupy zvlášť. V porovnání s kontrolou vykazovaly skupiny 2CBFly-NBOMe 1 a 5 mg/kg významně nižší lokomoční aktivitu, a to v obou časových rozestupech ($p < 0.001$), zatímco u nejnižší dávky (0.2 mg/kg) byl tento efekt významný pouze u zvířat testovaných 15 minut po aplikaci ($p < 0.001$), viz Graf 3.

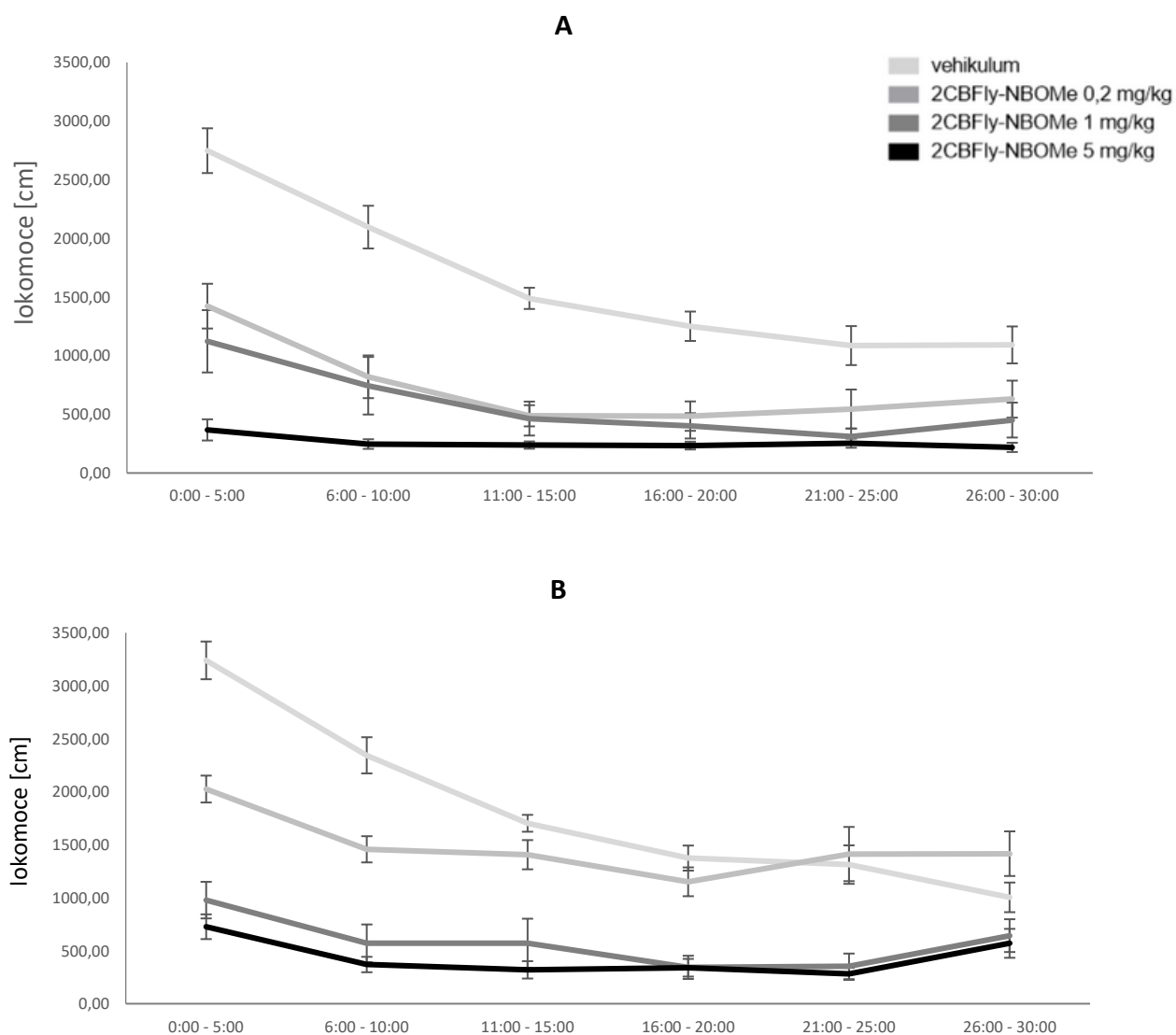


Graf 3: Porovnání délek trajektorií pohybu jednotlivých skupin zvířat testovaných (A) 15 min a (B) 60 min od aplikace látky. Zobrazeny jsou průměry, chybové úsečky znázorňují ± 1 SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5.3.2. Lokomoční aktivita v pětiminutových intervalech

Délka trajektorie pohybu v průběhu experimentu (v pětiminutových intervalech) se mezi jednotlivými skupinami potkanů významně lišila [F (5,360) = 86.715, $p < 0.001$]. Vzhledem k významné interakci léčba \times časový blok (F (15, 360) = 16,005, $p < 0.001$), výsledkům předchozí analýzy celkové lokomoční aktivity a zjištěné interakci léčba \times

časový rozestup testu od aplikace [F (3,72) = 4.545, p < 0.01] byla následná post hoc porovnání provedena separátně pro jednotlivé časové rozestupy aplikace-test a pro pětiminutové intervaly. U zvířat, která byla do testu umístěná 15 minut po aplikaci, byl patrný významný hypolokomoční efekt aktivní látky, a to prvních 15 min u dávky 0.2 mg/kg (p < 0.001), 20 min u dávky 1 mg/kg (p < 0.05 – 0.001) a po celou dobu trvání testu u nejvyšší koncentrace 5 mg/kg (p < 0.05 – 0.001). Obdobný efekt byl pozorován i u zvířat testovaných 60 minut od aplikace (snížená lokomoční aktivita), nejnižší dávka 0.2 mg/kg měla signifikantní efekt prvních 10 min (p < 0.05 – 0.001), po téměř celou dobu experimentu mimo posledních pěti minut byl pozorován signifikantní efekt u skupin 1 mg/kg (p < 0.01 – 0.001) a 5 mg/kg (p < 0.001 – 0.001). Viz Graf 4.



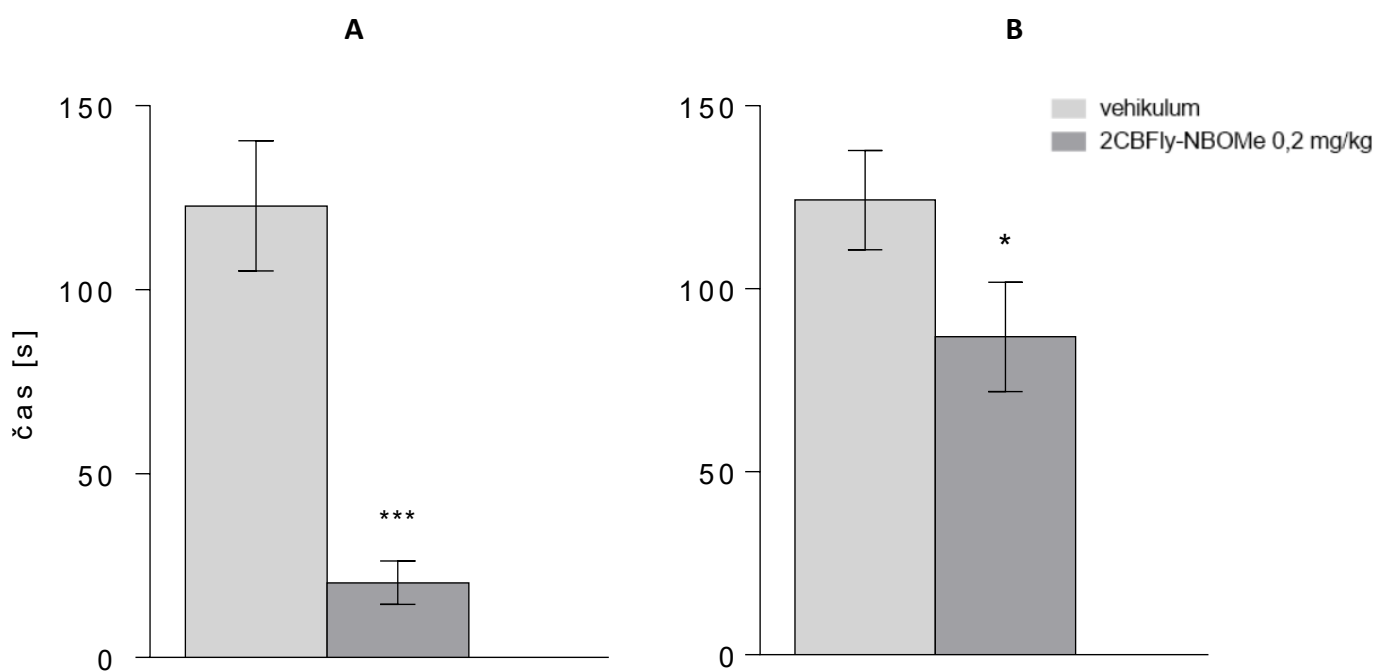
Graf 4: Porovnání průměrných délek trajektorií jednotlivých skupin zvířat rozdělených do pětiminutových intervalů, čas experimentu (A) 15 min a (B) 60 min od doby aplikace. Chybové úsečky znázorňují ±1 SEM.

5.3.3 Vliv 2CBFly-NBOMe na prostorovou distribuci zvířat

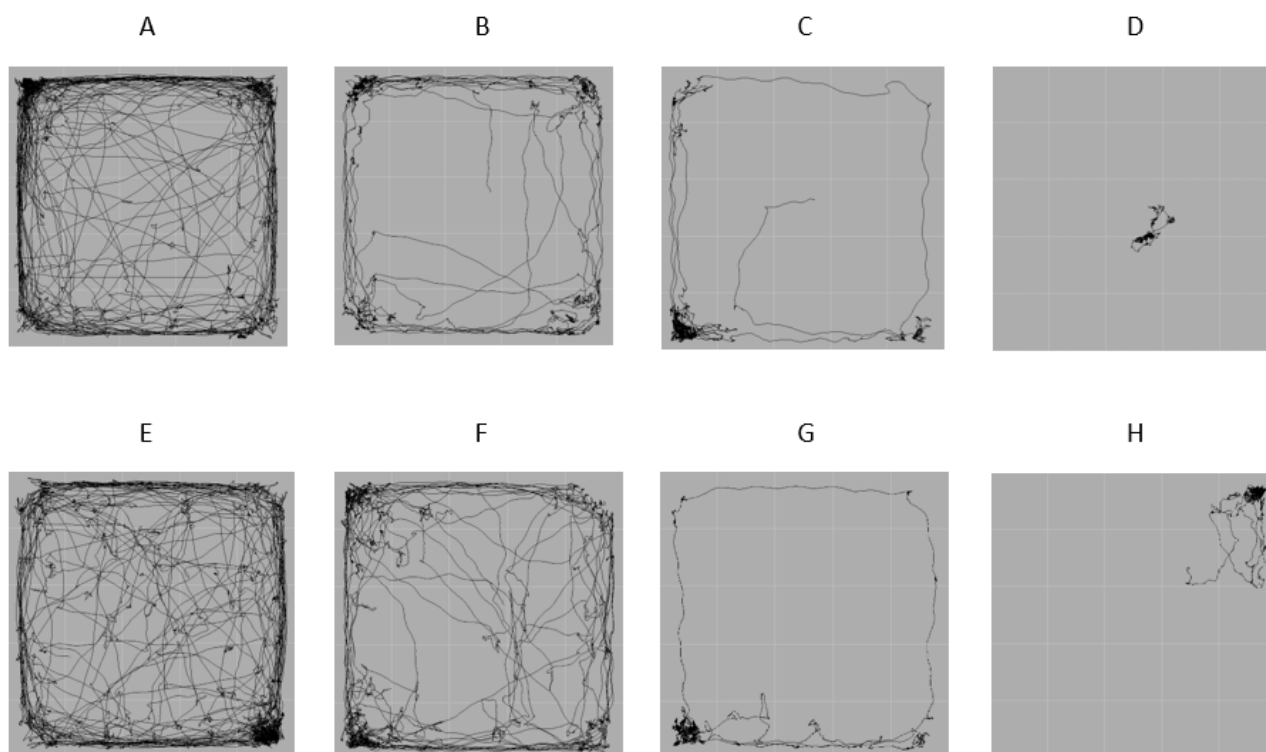
Prostorová distribuce v OFT

Střední a nejvyšší dávka aktivní látky (1 a 5 mg/kg) vedla k výraznému až úplnému útlumu lokomoční aktivity zvířat, převážná většina těchto zvířat tak nenavštívila obě vytyčené zóny arény (centrální část a periferii – viz Obr. 15, Vizualizace trajektorií v OFT). Z tohoto důvodu nebylo možné zmíněné skupiny zahrnout do následných analýz, které tak byly provedeny pouze pro nejnižší dávku 0.2 mg/kg.

Čas strávený v centrální části aparatury byl významně ovlivněn léčbou [$F(1, 36) = 27,939$, $p < 0.001$] a časovým rozestupem aplikace-test [$F(1, 36) = 17,550$, $p < 0.001$; průměr skupin: 15 min - 53 s, 60 min - 98 s), jejich vzájemná interakce nebyla významná. Zvířata intoxikovaná aktivní látkou trávila v centrální části výrazně méně času, než tomu bylo u kontrolních jedinců (Graf 5). I přes nesignifikantní interakci faktorů je Graf 5 proveden pro lepší ilustrativnost a srovnatelnost s dalšími výsledky zvláště pro jednotlivé časové rozestupy.

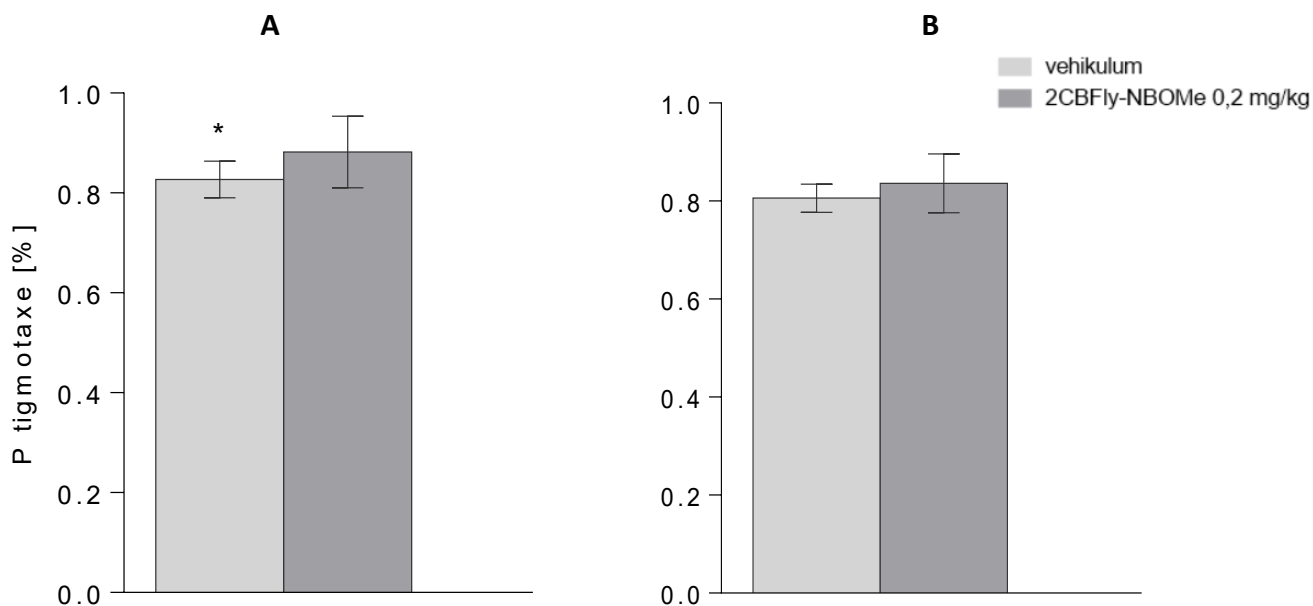


Graf 5: Porovnání času stráveného kontrolní skupinou zvířat a skupinou 2CBFly-NBOMe 0.2 mg/kg v centrální části aparatury (A) 15 min a (B) 60 min od doby aplikace. Vyneseny jsou průměry, chybové úsečky znázorňují ± 1 SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Obr. 15: Vizualizace trajektorií v OFT. Charakteristické vzorce trajektorií zvířat v OFT v závislosti na podanou látku, její koncentraci a časový rozestup: vehikulum (A) onset 15 min, (E) 60 min, 2CBFLy-NBOMe: 0.2 mg/kg (B) 15 min, (F) 60 min, 1 mg/kg (C) 15 min, (G) 60 min, 5 mg/kg (D) 15 min, (H) 60 min.

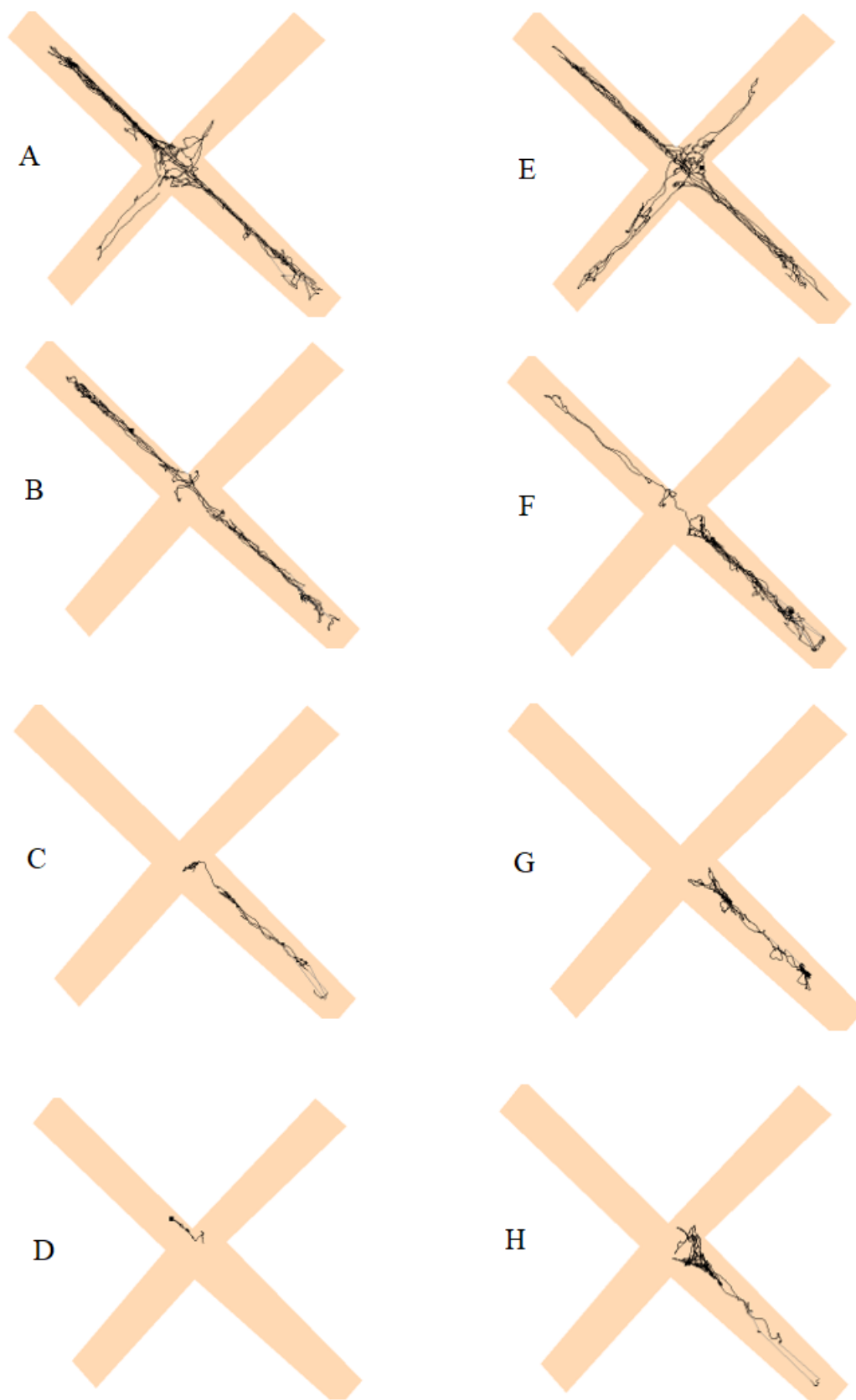
Míra tigmataxe byla významně ovlivněna léčbou [$F(1, 36) = 6,835, p = 0,014$], vliv časového rozestupu aplikace-test byl pouze na hranici průkaznosti [$F(1, 36) = 3,800, p = 0,059$], jejich vzájemná interakce byla nevýznamná. Míra tigmataxe zvířat intoxikovaných aktivní látkou převyšovala hodnoty kontrolní skupiny (Graf 6). I přes nesignifikantní interakci faktorů je Graf 6 proveden pro lepší ilustrativnost a porovnatelnost s dalšími výsledky zvláště pro jednotlivé časové rozestupy.



Graf 6: Porovnání pravděpodobnosti výskytu kontrolní skupiny zvířat a skupiny 2CBFly-NBOMe 0,2 mg/kg v periferní části aparatury v časech (A) 15 min a (B) 60 min od aplikace. Vyneseny jsou průměry, chybové úsečky znázorňují ± 1 SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

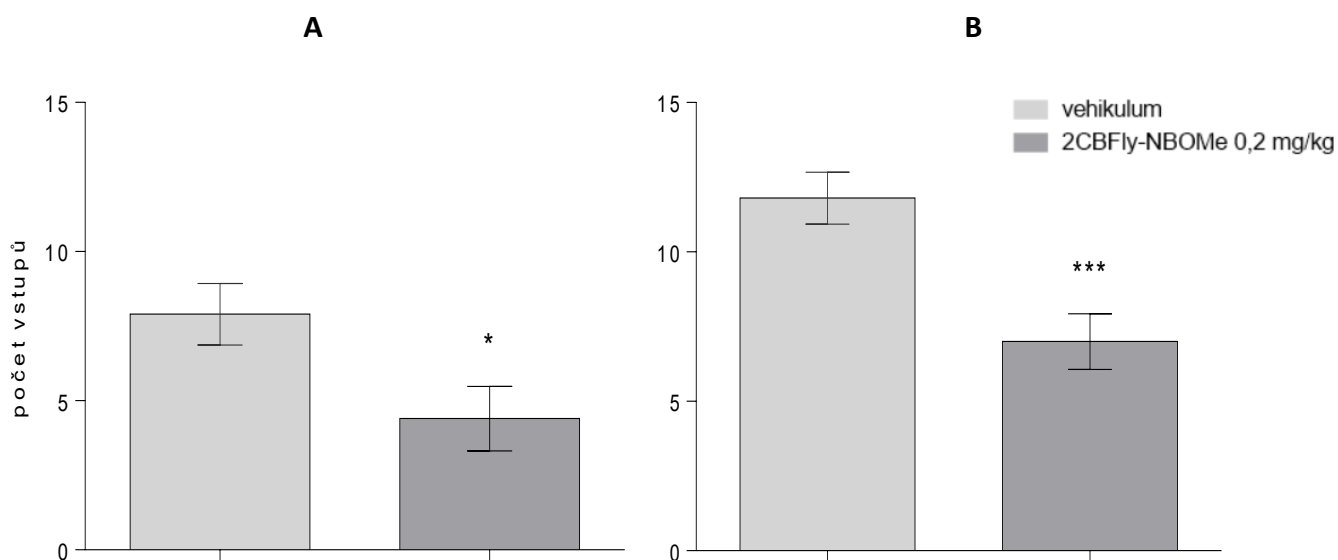
Prostorová distribuce v EPM

Podobně jako v OFT i v EPM vedla střední a nejvyšší dávka aktivní látky (1 a 5 mg/kg) k výraznému útlumu lokomoční aktivity zvířat (průměry skupin pro oba časové rozestupy aplikace-test: kontroly = 1537 cm; 2CBFly-NBOMe 0,2 mg/kg = 872 cm; 2CBFly-NBOMe 1 mg/kg = 427 cm; 2CBFly-NBOMe 5 mg/kg = 272 cm). Převážná většina potkanů z těchto dvou skupin nenavštívila všechny vytyčené zóny arény (otevřená a uzavřená ramena – viz Obr. 16, Vizualizace trajektorií v EPM). Z tohoto důvodu nebylo možné zmíněné skupiny zahrnout do následných analýz, ty tak byly provedeny pouze pro nejnižší dávku 0,2 mg/kg.



Obr. 16: Vizualizace trajektorií v EPM. Charakteristické vzorce trajektorií zvířat v EPM v závislosti na podané látce, její koncentraci a časový rozestup; vehikulum (A) onset 15 min, (E) 60 min, 2CBFLy-NBOMe: 0.2 mg/kg (B) 15 min, (F) 60 min, 1 mg/kg (C) 15 min, (G) 60 min, 5 mg/kg (D) 15 min, (H) 60 min.

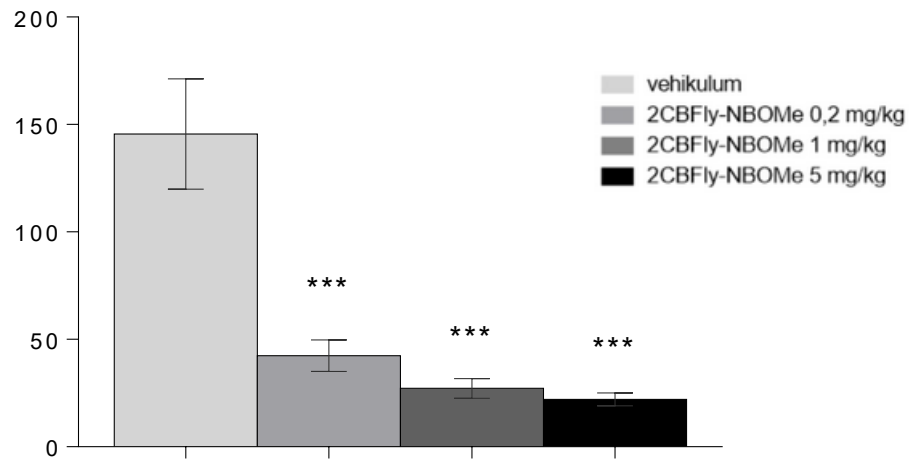
Počet vstupů do otevřených ramen byl významně ovlivněn léčbou [$F(1, 36) = 17,977, p < 0.001$] a časovým rozestupem aplikace-test [$F(1, 36) = 11,025, p = 0.002$], jejich vzájemná interakce nebyla významná. Počet vstupů na otevřené rameno byl u potkanů intoxikovaných aktivní látkou významně vyšší, než tomu bylo u kontrolní skupiny, délka časového rozestupu aplikace-test byla u obou sledovaných skupin přímo úměrná počtu vstupů do otevřených ramen. I přes nesignifikantní interakci faktorů je graf proveden pro lepší ilustrativnost a srovnatelnost s dalšími výsledky zvláště pro jednotlivé časové rozestupy. Viz Graf 7.



Graf 7: Porovnání počtu vstupů do otevřených ramen aparatury pro jednotlivé skupiny zvířat v časech (A) 15 min a (B) 60 min od aplikace. Zobrazeny jsou průměry, chybové úsečky znázorňují ± 1 SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5.4 Vliv 2CBFly-NBOMe na prepulzní inhibici akustické úlekové reakce

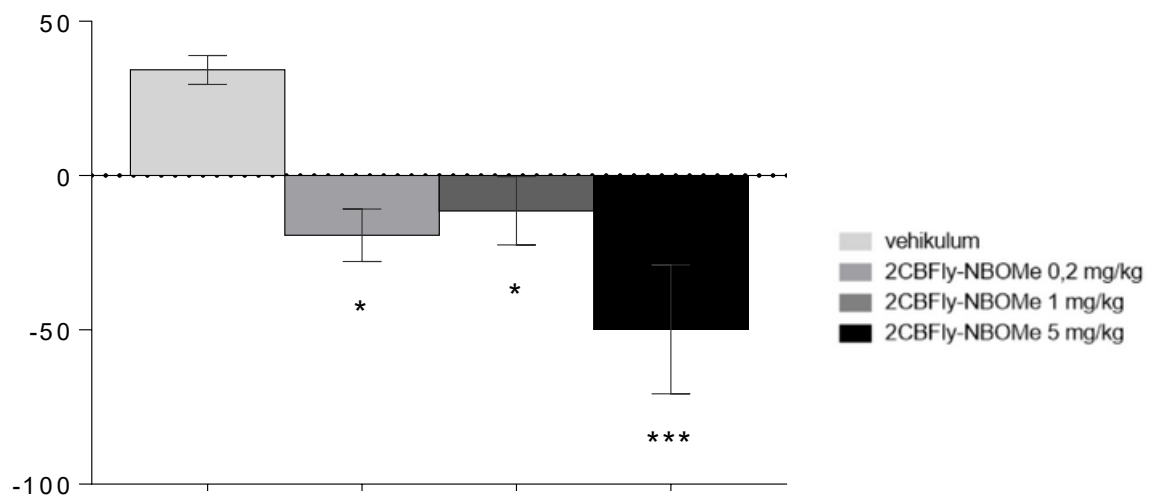
Velikost habituace nebyla ovlivněna ani jedním z testovaných faktorů či jejich interakcí. Velikost ASR byla významně ovlivněna léčbou [$F(3,72) = 23.355, p < 0.001$], efekt časové rozestupu aplikace-test a jeho interakce s léčbou významný nebyl. Ve srovnání s kontrolní skupinou vykazovala zvířata administrovaná aktivní látkou významné snížení úlekové reakce, a to v případě všech použitých dávek ($p < 0.001$) - Graf 8.



Graf 8: Porovnání hodnot ASR jednotlivých skupin zvířat pro oba časové rozestupy aplikace-test, zobrazeny jsou průměry. Chybové úsečky znázorňují ± 1 SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Nonrespondentní zvířata, jejichž průměrná hodnota motorické reakce v průběhu iniciální sekvence šesti úlekových pulzů nepřesáhla 10 mikroV, nemohla být zahrnuta do analýzy PPI. Takto bylo vyřazeno jedno zvíře ze skupiny 2CBFly-NBOMe 5 mg/kg.

Procento PPI bylo významně ovlivněno léčbou [$F(3, 72) = 9,193$, $p < 0.001$], efekt časového rozestupu a jeho interakce s léčbou nebyl významný. V porovnání s kontrolní skupinou, došlo u zvířat intoxikovaných aktivní látkou k výraznému narušení PPI, a to v případech všech použitých dávek ($p = 0.020 - p < 0.001$) - Graf 9.



Graf 9: Porovnání hodnot PPI ASR jednotlivých skupin zvířat pro oba časové rozestupy aplikace, zobrazeny jsou průměry. Chybové úsečky znázorňují ± 1 SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

6. Diskuze

Výsledky této práce shrnují farmakokinetický profil, vliv na termoregulaci a akutní behaviorální účinky psychoaktivní látky 2CBFly-NBOMe ze skupiny 2C syntetických derivátů fenetylaminu, testované na samcích potkanů kmene Wistar. 2CBFly-NBOMe velmi rychle pronikalo do krevního séra, kde jeho koncentrace dosáhla nejvyšší hodnoty 30 minut po aplikaci, v nižších koncentracích zde byla látka detekovatelná až osm hodin po aplikaci. Tělesná teplota byla v důsledku působení aktivní látky snížena, a to nejvýrazněji 90 minut po její aplikaci (intoxikovaná skupina měla v průměru o 0,5 - 1°C nižší tělesnou teplotu v porovnání s kontrolami). Dále byly demonstrovány výrazné behaviorální účinky testované látky, projevující se zřetelným snížením (v případě nejvyšší dávky 5 mg/kg až úplným utlumením) lokomoční aktivity zvířat a přítomností anxiety podobného chování v testech otevřeného pole a vyvýšeného křížového bludiště. Výrazné bylo také narušení prepulzní inhibice akustické úlekové reakce u všech skupin aplikovaných 2CBFly-NBOMe.

Přítomnost 2CBFly-NBOMe v krevním séru ještě osm hodin po aplikaci je zajímavým zjištěním dokládajícím velmi pomalou rychlost jeho odbourávání z organismu. Tato skutečnost může být dále demonstrována i porovnáním s farmakokinetickým profilem blízké příbuzné látky, 2C-B, jehož přítomnost v krevním séru je téměř nedetekovatelná již po dvou hodinách, a to i případě koncentrace desetkrát vyšší, než tomu bylo v této studii (50 mg/kg, Rohanová et al., 2008). Dlouhotrvající přítomnost 2CBFly-NBOMe v séru, společně s rychlostí jeho pronikání (pík koncentrace 30 minut po aplikaci), koresponduje s daty objevujícími se v lidské studii (Lawn et al., 2014).

Přestože jsme předpokládali vysokou penetraci 2CBFly-NBOMe do mozku, analýza vzorků mozkové tkáně ani ostatních (plic, jater a ledvin) se standardními metodami zatím nezdařila. Důvodem mohou být nízké výtěžky nebo matriční efekt tkání u LC-MS analýzy s elektrosprejovou ionizací. Nestandardizované postupy detekce v organismu jsou značným problémem u potentních NBOMe substancí. Jejich signál ve tkáních bývá těžko detekovatelný a velmi slabý vzhledem k jejich schopnosti vyvolat silné účinky v submiligramových koncentracích (Kyriakou et al., 2015). Úspěšné provedení zmíněné

analýzy bude předmětem dalších studií 2CBFly-NBOMe, stejně jako zhodnocení účinků jeho případných aktivních metabolitů. Jejich přítomnost a pravděpodobné spolupodílení se na fyziologickém působení lze předpokládat na základě výsledků případové studie intoxikace mladé dívky blízkou příbuznou superpotentní látkou 25I-NBOMe (Stellpflug et al., 2013). Ve vzorku moči odebraném tři hodiny po užití drogy, zde byla zjištěna přítomnost nezměněné formy drogy a v 80x větší koncentraci také jejího demetylovaného metabolitu ve formě glukuronidového konjugátu.

Psychedelika a další agonisté 5-HT_{2A} receptorů působí zvýšení tělesné teploty, což v případě některých psychedelik ze skupiny NPS může vést až k vážné hypertermii – jednomu z příznaků serotoninového syndromu (Gudelsky et al., 1986; Matuszewich & Yamamoto, 2003; Menon & Dandiya, 1969; Murakami & Sakata, 1980). Podle dostupných informací z případových studií extrémních intoxikací působí látky ze skupiny NBOMe většinou hypertermicky, v extrémních případech musí dokonce docházet k aktivnímu chlazení pacienta, zejména pak hlavy (Andreasen et al., 2015).

Při našich experimentech jsme zvýšení tělesné teploty nezaznamenali u žádné z pozorovaných skupin. Naopak teplota těchto zvířat byla v porovnání s kontrolní skupinou výrazně nižší. Nejvíce se tento trend projevil u skupiny držené během měření v boxech samostatně, a to zejména v prvních 90 minutách po aplikaci látky. Jako jedno z možných vysvětlení se nabízí působení 2CBFly-NBOMe jako agonisty 5-HT_{1A} receptorů, u kterých je pozorován hypotermický efekt (Cryan et al., 1999; Gudelsky et al., 1986). Ten způsobuje například 7-(dipropylamino)-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-1-ol (8-OHDPAT) – jeden z nejdříve objevených agonistů 5-HT_{1A} receptorů (Wozniak et al., 1988). Další látky, které jsou agonisty 5-HT_{1A} receptorů, flesinoxan (agonista), ipsapiron (selektivní parciální agonista), eltoprazin (neselektivní parciální agonista) také indukují hypotermii. Rozvoj hypotermie je naopak blokován aplikací antagonisty 5-HT_{1A} receptorů WAY 100635 (nižší dávky v testu blokovaly účinky parciálních agonistů, vyšší dávky všechny agonisty), což dokazuje, že hypotermie způsobená těmito látkami je opravdu zprostředkována působením na 5-HT_{1A} receptory (Cryan et al., 1999). Hypotermický efekt primárně cestou aktivace 5-HT_{1A} receptorů má také yohimbin (Papeschi et al., 1971).

U skupin umístěných v boxech po pěti nebylo tak výrazné snížení teploty pozorováno - to podporuje původní myšlenku, že v prostředí, ve kterém je větší množství

jedinců na menším prostoru, může docházet ke zvýšení tělesné teploty a v případě rozvinutí hypertermie patrně i k její potenciaci.

U psychedelik (např. LSD, 2C-B, meskalin) je velmi často pozorováno bifázické ovlivnění lokomoční aktivity zvířat (Bourn et al., 1978; Ouagazzal et al., 2000; Páleníček et al., 2010, 2013). Bifázický účinek byl zjištěn i u 2CBFly-NBOMe blízce příbuzného 25I-NBOMe, kdy aplikace dávky 0.1 mg/kg indukovala po 60 minutách signifikantní zvýšení lokomoce, naopak dávka 3 mg/kg vedla k výraznému snížení lokomoce u C57BL/6J myši (Halberstadt, 2017). Tento výsledek je v částečné shodě s našimi daty, kdy nejvyšší a střední dávka 2CBFly-NBOMe (1 a 5 mg/kg) vedla po 60 minutách také k výraznému snížení lokomoce. Podobně tomu bylo i v případě nejnižší dávky (0.2 mg/kg) u zvířat testovaných 15 minut po její aplikaci, nicméně u skupiny testované po 60 minutách od aplikace bylo toto snížení významné pouze v prvních 15 minutách testu, poté zde byl přítomný spíše trend k jejímu zvyšování. Zodpovězení otázky, zda se jednalo o počátek opožděné hyperlokomoce naznačující bifázický účinek 2CBFly-NBOMe bude předmětem dalších studií, v nichž budou použity nižší dávky aktivní látky a zvířata budou sledována po delší dobu.

Podání látek spadajících do skupiny psychedelik vede u pokusných zvířat velmi často k rozvoji anxiety podobného chování, a to jak v případě akutních (LSD, Páleníček et al., 2010), tak chronických pozorování (psilocin, Horsley et al., 2018). Obdobná zjištění dokládá i naše studie, kde byl zjištěn výrazný rozvoj anxiety podobného chování (vyjádřený zvýšenou mírou tigmataxe a snížením času stráveného v centru v OFT a menším množstvím vstupů na otevřená ramena EPM), a to zejména u zvířat, kterým byla aktivní látka (v dávce 0.2 mg/kg) aplikována 15 minut před započítáním testu.

Analýzu anxiety podobného chování nebylo možné provést pro dávky 1 a 5 mg/kg 2CBFly-NBOMe, jelikož převážná většina jedinců zůstávala po vložení do aparatury v bezprostředním okolí tohoto místa, kde setrvala po celý zbytek experimentu. Naměřené parametry tudíž nebylo možné vnímat jako ukazatel anxiety podobného chování. Toto zjištění dokládá skutečně velmi vysokou potenci testované látky, převyšující teoretický předpoklad. Opět se zde nabízí prostor pro budoucí studie, v nichž budou použity výrazně nižší (submiligramové) dávky aktivní látky, jelikož na základě stávajících výsledků není

možné zcela vyloučit bifázický efekt sledované látky, který byl pozorován například u příbuzného DOI (Onaivi et al., 1995).

2CBFly-NBOMe ve všech dávkách signifikantně snižovalo reakci zvířat na úlekové stimuly a narušovalo prepulzní inhibici akustické úlekové reakce, prokazatelně tedy narušuje sensorimotorické zpracování informace. Tento výsledek byl očekávaný, jelikož mechanismus narušení prepulzní inhibice cestou aktivace 5-HT_{2A} receptorů je dobře znám - infuze DOI do ventrálního pallida narušuje prepulzní inhibici zvířat, současná aplikace antagonisty 5-HT_{2A} receptoru MDL 100,907 tento účinek zvrátí (Sipes & Geyer, 1997). Význam mohou při tomto procesu mít také 5-HT_{1A} a 5-HT_{2C} receptory, WAY-100635 (antagonista 5-HT_{1A} receptorů) a SER-082 (antagonista 5-HT_{2C} receptorů) byly samostatně schopny narušit disrupci prepulzní inhibice indukované halucinogenem 5-MeO-DMT (Krebs-Thomson et al., 2006).

S použitím stávajících dávek a časových rozestupů však opět nelze zcela vyloučit bifázické ovlivnění parametrů PPI ASR, který byl u halucinogenů opakovaně pozorován (Davis & Walters, 1977; Páleníček et al., 2013). Je možné, že hladiny 2CBFly-NBOMe v mozku kulminují později, než je tomu v krevním séru, což by mohlo případně vést k přítomnosti opožděného behaviorálního účinku. V blízké době je v plánu rozšíření výsledků OFT a PPI o data z dalších skupin, zvířata budou tentokrát aplikována nižšími dávkami 2CBFly-NBOMe v řádech jednotek – desítek µg/kg). Časový rozestup bude případně upraven na základě výsledků farmakokinetické analýzy mozku, variantou je aplikace nejnižší již použitou dávkou (0.2 mg/kg) a výraznější časový odstup (4 – 6 hodin) pro zachycení případné zpožděné hyperlokomoce v OFT. V testu PPI ASR zvolíme stejný postup a budeme usilovat o naměření vyšší ASR u zvířat pod vlivem aktivní látky. Data budou po doplnění následně využita k sepsání impaktované publikace.

7. Závěr

Tato práce jako první *in vivo* studie popisuje akutní účinky 2CBFly-NBOMe, vysoce selektivního parciálního agonisty 5-HT_{2A} receptorů, na fyziologické a behaviorální parametry potkaních samců kmene Wistar. Látka velmi silně inhibovala pohyb a působila výrazné snížení tělesné teploty u zvířat držených v domovské kleci samostatně, naopak u zvířat držených v klecích po pěti nenastaly žádné výrazné změny. 2CBFly-NBOMe projevilo anxiogenní profil a schopnost silně narušit senzomotorické zpracování informace. Aktivní látka v krevním séru kulminovala prvních 30 – 60 minut, její přítomnost byla detekovaná ještě osm hodin po aplikaci. V plánu je rozšířit výsledky pro případné zmapování bifázického efektu 2CBFly-NBOMe. Vzhledem k nebezpečnosti a rozšířenosti substancí ze skupiny NBOMe a NPS obecně by se měl výzkum zaměřit především na standardizaci postupů pro rychlou a spolehlivou detekci těchto látek v organismu, také je do budoucna vhodné důkladně zmapovat jejich akutní i chronické působení.

8. Literatura

- Acuna-Castillo, C., Villalobos, C., Moya, P. R., Sáez, P., Acun, C., & Huidobro-toro, J. P. (2002). Differences in potency and efficacy of a series of phenylisopropylamine/phenylethylamine pairs at 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *British Journal of Pharmacology*, 510–519.
- Al-Imam, A. (2018). 25b-NBOMe : A Case Report of Sudden Death and Insightful View of Google Trends Data. *Psychiatry Behav. Sci.*, 12(1), 1–5. <https://doi.org/10.5812/ijpbs.9870>.Case
- Andén, N., Corrodi, H., Fuxe, K., & Hokfelt, T. (1968). Evidence for a central 5-hydroxytryptamine receptor stimulation by lysergic acid diethylamide. *British Journal of Pharmacology*, 1–7.
- Andreasen, M. F., Telving, R., Rosendal, I., Eg, M. B., Hasselstrøm, J. B., & Andersen, L. V. (2015). A fatal poisoning involving 25C-NBOMe. *Forensic Science International*, 251, e1–e8. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.03.012>
- Bankson, M. G., & Cunningham, K. A. (2001). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) as a Unique Model of Serotonin Receptor Function and Serotonin- Dopamine Interactions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297(3), 846–852.
- Bedard, P., & Pycock, C. (1977). 'Wet-dog' shake behaviour in the rat: A possible quantitative model of central 5-hydroxytryptamine activity. *Neuropharmacology*. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(77\)90117-4](https://doi.org/10.1016/0028-3908(77)90117-4)
- Bender, L., Goldschmidt, L., Sankar, D. V. S., & Freedman, A. M. (1962). Treatment of Autistic Schizophrenic Children with LSD-25 and UML-491. In *Recent Advances in Biological Psychiatry* (pp. 170–179). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8306-2_17
- Bersani, F. S., Corazza, O., Albano, G., Valeriani, G., Santacroce, R., Bolzan Mariotti Posocco, F., ... Schifano, F. (2014). 25C-NBOMe: Preliminary data on pharmacology, psychoactive effects, and toxicity of a new potent and dangerous hallucinogenic drug. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/734749>
- Bourn, W., Keller, W., & Bonfiglio, J. (1978). Psychoactivity of normacromerine in animals. *Life Sciences*, 23, 1175–1184.
- Braden, M. R., Parrish, J. C., Naylor, J. C., & Nichols, D. E. (2006). Molecular Interaction of Serotonin 5-HT_{2A} Receptor Residues Phe339 and Phe340 with superpotent N-benzyl Phenethylamine Agonists. *Molecular Pharmacology*, 70(6), 1956–1964. <https://doi.org/10.1124/mol.106.028720>.delics
- Braff, D. L., & Mark, A. (1990). Sensorimotor gating and schizophrenia. *Archives of*

General Psychiatry, (Fig 1).

- Cameron, L. P., Benson, C. J., Dunlap, L. E., & Olson, D. E. (2018). Effects of N,N-dimethyltryptamine (DMT) on rat behaviors relevant to anxiety and depression. *ACS Chemical Neuroscience*. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00134>
- Carhart-Harris, R. L., Kaelen, M., Bolstridge, M., Williams, T. M., Williams, L. T., Underwood, R., ... Nutt, D. J. (2016). The paradoxical psychological effects of lysergic acid diethylamide (LSD). *Psychological Medicine*, *46*(7), 1379–1390. <https://doi.org/10.1017/S0033291715002901>
- Caspar, A. T., Helfer, A. G., Michely, J. A., Auwärter, V., Brandt, S. D., Meyer, M. R., & Maurer, H. H. (2015). Studies on the metabolism and toxicological detection of the new psychoactive designer drug 2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl]ethanamine (25I-NBOMe) in human and rat urine using GC-MS, LC-MS, and LC-HR-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*, 6697–6719. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8828-6>
- Caudevilla-Galligo, F., Riba, J., Ventura, M., Gonzalez, D., Farré, M., Barbanoj, M. J., & Bouso, J. C. (2012). 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B): presence in the recreational drug market in Spain, pattern of use and subjective effects. *Journal of Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1177/02698811111431752>
- Coelho Neto, J. (2015). Rapid detection of NBOME's and other NPS on blotter papers by direct ATR-FTIR spectrometry. *Forensic Science International*. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.04.025>
- Cryan, J. F., Kelliher, P., Kelly, J. P., & Leonard, B. E. (1999). Comparative effects of serotonergic agonists with varying efficacy at the 5-HT_{1A} receptor on core body temperature: modification by the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100635. *Journal of Psychopharmacology*, *13*(3), 278–283.
- Davis, M., & Walters, J. (1977). Psilocybin: Biphasic Dose-Response Effects on the Acoustic Startle Reflex in the Rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *6*, 427–431.
- de Passillé, A. M., Rushen, J., Martin, F. F., Marie, A., Passill, D., Rushen, J., & Martin, F. F. (1995). Interpreting the behaviour of calves in an open-field test: a factor analysis. *Applied Animal Behaviour Science*, *1591*(95), 201–213. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(95\)00622-Y](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)00622-Y)
- Dolder, P. C., Liechti, M. E., & Rentsch, K. M. (2015). Development and validation of a rapid turboflow LC-MS/MS method for the quantification of LSD and 2-oxo-3-hydroxy LSD in serum and urine samples of emergency toxicological cases. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *407*(6), 1577–1584. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8388-1>
- Eilam, D., & Golani, I. (1989). Home base behavior of rats (*Rattus norvegicus*) exploring a novel environment. *Behavioural Brain Research*, *34*(3), 199–211.

[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(89\)80102-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(89)80102-0)

- Elz, S., Kläss, T., Heim, R., Warnke, U., & Pertz, H. (2002). Development of highly potent partial agonists of 5-HT_{2A}-receptor mediated functions. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 365(4), 29. <https://doi.org/10.1007/s00210-002-0604-4>
- Ettrup, A., Palner, M., Gillings, N., Santini, M. A., Hansen, M., Kornum, B. R., ... Knudsen, G. M. (2010). Radiosynthesis and Evaluation of ¹¹C-CIMBI-5 as a 5-HT_{2A} Receptor Agonist Radioligand for PET. *Journal of Nuclear Medicine*, 51(11), 1763–1770. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.074021>
- Ettrup, Anders, Hansen, M., Santini, M. A., Paine, J., Gillings, N., Palner, M., ... Knudsen, G. M. (2011). Radiosynthesis and in vivo evaluation of a series of substituted ¹¹C-phenethylamines as 5-HT_{2A} agonist PET tracers. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 38(4), 681–693. <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1686-8>
- Fraser, D. (1974). The vocalizations and other behaviour of growing pigs in an “open field” test. *Applied Animal Ethology*, 1(1), 3–16. [https://doi.org/10.1016/0304-3762\(74\)90003-0](https://doi.org/10.1016/0304-3762(74)90003-0)
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., & Feer, H. (1987). Open field and elevated plus-maze: A behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide. *Behavioural Brain Research*, 25(2), 101–107. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(87\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0166-4328(87)90003-9)
- Geyer, M. A., Wilkinson, L. S., Humby, T., & Robbins, T. W. (1993). Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 34(6), 361–372. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(93\)90180-L](https://doi.org/10.1016/0006-3223(93)90180-L)
- Mark A. Geyer (2015) Prepulse inhibition. In: Encyclopedia of Psychopharmacology, Jean-Michel Schermmann, Springer Singapore Heidelberg New York Dordrecht London, pp. 96, ISBN 978-3-642-36173-9.
- González, D., Torrens, M., & Farré, M. (2015). Acute Effects of the Novel Psychoactive Drug 2C-B on Emotions. *BioMed Research International*, 2015.
- Gudelsky, G., Koenig, J., & Meltzer, H. (1986). Thermoregulatory responses to serotonin (5HT) RECEPTOR STIMULATION IN THE RAT. *Neuropharmacology*, 25(12), 1307–1313.
- Halberstadt, A. L. (2017). Pharmacology and Toxicology of N -Benzylphenethylamine (“NBOMe”) Hallucinogens. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 32, 283–312. <https://doi.org/10.1007/7854>
- Halberstadt, A. L., Buell, M. R., Masten, V. L., Risbrough, V. B., & Geyer, M. A. (2008). Modification of the effects of 5-methoxy- N , N -dimethyltryptamine on

- exploratory behavior in rats by monoamine oxidase inhibitors, 55–66.
<https://doi.org/10.1007/s00213-008-1247-z>
- Hall, C. S. (1934). Emotional Behavior in the Rat. *Journal of Comparative Psychology*, 18(5), 385–403. <https://doi.org/10.1037/h0071444>
- Handley, S. L., & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327(1), 1–5.
<https://doi.org/10.1007/BF00504983>
- Heal, D. J., Philpot, J., Molyneux, S. G., & Metz, A. (1985). Intracerebroventricular administration of 5,7-dihydroxytryptamine to mice increases both head-twitch response and the number of cortical 5-HT₂ receptors. *Neuropharmacology*, 24(12), 1201–1205.
- Heim, R. (2003). *Synthesis and pharmacology of potent 5-HT_{2A} receptor agonists which have a partial N-2-methoxybenzyl structure*. Retrieved from <https://refubium.fu-berlin.de/handle/fub188/11995>
- Horsley, R. R., Páleníček, T., Kolin, J., & Valeš, K. (2018). Psilocin and ketamine microdosing: effects of subchronic intermittent microdoses in the elevated plus-maze in male Wistar rats. *Behavioural Pharmacology*, 1–7.
<https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000394>
- Huang, H. H., & Bai, Y. M. (2011). Persistent psychosis after ingestion of a single tablet of "2C-B." *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35(1), 293–294. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.10.018>
- Humston, C., Miketic, R., Moon, K., Ma, P., & Tobias, J. (2017). Toxic Leukoencephalopathy in a Teenager Caused by the Recreational Ingestion of 25I-NBOMe : A Case Report and Review of Literature. *J Med Cases*, 8(6), 174–179.
- Kilgour, R. (1975). The open-field test as an assessment of the temperament of dairy cows. *Animal Behaviour*, 23(PART 3), 615–624.
[https://doi.org/10.1016/0003-3472\(75\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-3472(75)90139-6)
- King, L. A. (2014). New phenethylamines in Europe. *Drug Testing and Analysis*, 6(7–8), 808–818. <https://doi.org/10.1002/dta.1570>
- Krebs-Thomson, K., Ruiz, E. M., Masten, V., Buell, M., & Geyer, M. A. (2006). The roles of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the effects of 5-MeO-DMT on locomotor activity and prepulse inhibition in rats. *Psychopharmacology*, 189(3), 319–329. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0566-1>
- Kueppers, V. B., & Cooke, C. T. (2015). 25I-NBOMe related death in Australia: A Case Report. *Forensic Science International*.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.02.010>

- Kyriakou, C., Marinelli, E., Frati, P., Santurro, A., Afxentiou, M., Zaami, S., & Busardo, F. P. (2015). NBOMe: New potent hallucinogens-pharmacology, analytical methods, toxicities, fatalities: A review. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *19*(17), 3270–3281.
- Lawn, W., Barratt, M., Williams, M., Horne, A., & Winstock, A. (2014). The NBOMe hallucinogenic drug series: Patterns of use, characteristics of users and self-reported effects in a large international sample. *Journal of Psychopharmacology*, *28*(8), 780–788.
<https://doi.org/10.1177/0269881114523866>
- Leth-Petersen, C., Bundgaard, S., Hansen, M., Carnerup, M. A., Kehler, J., & Langgaard, J. (2018). Correlating the Metabolic Stability of Psychedelic 5-HT 2A Agonists with Anecdotal Reports of Human Oral Bioavailability. *Neurochem Res*, *39*, 2018–2023. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1253-y>
- Liu, R., Jolas, T., & Aghajanian, G. (2000). Serotonin 5-HT₂ receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Research*, *873*(1), 34–45. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02468-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02468-9)
- Marek, G. J., & Aghajanian, G. K. (1996). LSD and the phenethylamine hallucinogen DOI are potent partial agonists at 5-HT_{2A} receptors on interneurons in rat piriform cortex. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *278*(3).
- Matuszewich, L., & Yamamoto, B. K. (2003). Long-lasting effects of chronic stress on DOI-induced hyperthermia in male rats. *Psychopharmacology*, *169*, 169–175.
<https://doi.org/10.1007/s00213-003-1498-7>
- Menon, M. K., & Dandiya, P. C. (1969). Behavioural and brain neurohormonal changes produced by acute heat stress in rats: influence of psychopharmacological agents. *European Journal of Pharmacology*, *8*, 284–291.
- Murakami, N., & Sakata, Y. (1980). A POSSIBLE ROLE OF THE SEROTONERGIC SYSTEM IN THERMOREGULATION IN THE RABBIT. *Neuropharmacology*, *19*, 891–895.
- Nichols, D. E. (2004). Hallucinogens. *Pharmacology & Therapeutics*, *101*, 533–552.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418679-8.00017-4>
- Onaivi, E. S., Bishop-robinson, C., Darmani, N. A., & Sanders-bush, E. (1995). BEHAVIORAL EFFECTS OF (+)-1-(2,5-DIMETHOXY-4- IODOPHENYL)-2-AMINOPROPANE, (DOI) IN THE ELEVATED PLUS-MAZE TEST. *Life Sciences*, *57*(26), 2455–2466.
- Ouagazzal, A., Grottick, A., Moreau, J., & Higgins, G. (2000). Effect of LSD on Prepulse Inhibition and Spontaneous Behavior in the Rat : A Pharmacological

- Analysis and Comparison between Two Rat Strains. *Neuropsychopharmacology*, 25(01).
- Páleníček, T., Balíková, M., Bubeníková-Valešová, V., & Horáček, J. (2008). Mescaline effects on rat behavior and its time profile in serum and brain tissue after a single subcutaneous dose. *Psychopharmacology*, 196(1), 51–62. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0926-5>
- Páleníček, T., Balíková, M., Rohanová, M., Novák, T., Horáček, J., Fujáková, M., & Höschl, C. (2011). Behavioral, hyperthermic and pharmacokinetic profile of para-methoxymethamphetamine (PMMA) in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 98(1), 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.12.011>
- Páleníček, T., Fujáková, M., Brunovský, M., Horáček, J., Gorman, I., Balíková, M., ... Höschl, C. (2013). Behavioral, neurochemical and pharmacology-EEG profiles of the psychedelic drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in rats. *Psychopharmacology*, 225(1), 75–93. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2797-7>
- Páleníček, T., Hlíňák, Z., Bubeníková-Valešová, V., Novák, T., & Horáček, J. (2010). Sex differences in the effects of N,N-diethyllysergamide (LSD) on behavioural activity and prepulse inhibition. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34, 588–596. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.02.008>
- Papeschi, R., Sourkes, T., & Youdim, M. (1971). THE EFFECT OF YOHIMBINE ON BRAIN SEROTONIN METABOLISM, MOTOR BEHAVIOR AND BODY TEMPERATURE OF THE RAT. *European Journal of Pharmacology*, 15, 318–326.
- Passie, T., Halpern, J. H., Stichtenoth, D. O., Emrich, H. M., & Hintzen, A. (2008). The Pharmacology of Lysergic Acid Diethylamide: A Review. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 14, 295–314. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2008.00059.x>
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Poklis, J L, Raso, S. A., Alford, K. N., Poklis, A., & Peace, M. R. (2015). Analysis of 25I-NBOMe, 25B-NBOMe, 25C-NBOMe and Other Dimethoxyphenyl-N. 2-Methoxyphenyl) Methyl. *Journal of Analytical Toxicology*, 8(November 2013), 617–623.
- Poklis, Justin L., Devers, K. G., Arbefeville, E. F., Pearson, J. M., Houston, E., & Poklis, A. (2014). Postmortem detection of 25I-NBOMe [2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl]ethanamine] in fluids and tissues determined by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry from a traumatic death. *Forensic Science International*, 234,

- 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.10.015>
- Poklis, Justin L, Nanco, C. R., Troendle, M. M., & Wolf, E. (2013). Determination of 4-bromo-2, serum and urine by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry in a case of severe intoxication, (July). <https://doi.org/10.1002/dta.1522>
- Ramos, A. (2008). Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(10), 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.07.005>
- Rickli, A., Kopf, S., Hoener, M. C., & Liechti, M. E. (2015). Pharmacological profile of novel psychoactive benzofurans. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/bph.13128>
- Rickli, A., Luethi, D., Reinisch, J., Buchy, D., Hoener, M. C., & Liechti, M. E. (2015). Receptor interaction profiles of novel N-2-methoxybenzyl (NBOMe) derivatives of 2,5-dimethoxy-substituted phenethylamines (2C drugs). *Neuropharmacology*, 99, 546–553. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.08.034>
- Rohanová, M., Páleníček, T., & Balíková, M. (2008). Disposition of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) and its metabolite 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine in rats after subcutaneous administration. *Toxicology Letters*, 178(1), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.01.017>
- Schmitt, U. (1998). Combination of Open Field and Elevated Plus Maze. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 22, 1197–1215. Retrieved from [papers2://publication/uuid/A06AE5E9-9C80-4038-AD7D-F97B55552411](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9775552/)
- Shepherd, J. K., Grewal, S. S., Fletcher, A., Bill, D. J., & Dourish, C. T. (1994). Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*, 56–64.
- Shulgin, A. T., & Carter, M. F. (1975). Centrally Active phenethylamines. *Psychopharmacology Communications*, 1(1), 93–98.
- Siegel, G.J. et al., 2006. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, Elsevier Academic Press.
- Sipes, T. E., & Geyer, M. A. (1997). DOI disrupts prepulse inhibition of startle in rats via 5-HT 2A receptors in the ventral pallidum. *Brain Research*, 97–104. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00316-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00316-8)
- Stellpflug, S. J., Kealey, S. E., Hegarty, C. B., & Janis, G. C. (2013). 2-(4-Iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl]ethanamine (25I-NBOMe): Clinical Case with Unique Confirmatory Testing. *Journal of Medical Toxicology*, 10(1), 45–50. <https://doi.org/10.1007/s13181-013-0314-y>

- Suzuki, J., Poklis, J. L., Poklis, A., Suzuki, J., D, M., Poklis, J. L., ... Ph, D. (2014). "My Friend Said it was Good LSD": A Suicide Attempt Following Analytically Confirmed 25I-NBOMe Ingestion. *Journal of Psychoactive Drugs*, 1072, 3–7. <https://doi.org/10.1080/02791072.2014.960111>
- Tang, M. H. Y., Ching, C. K., Tsui, M. S. H., Chu, F. K. C., & Mak, T. W. L. (2014). Two cases of severe intoxication associated with analytically confirmed use of the novel psychoactive substances 25B-NBOMe and 25C-NBOMe. *Clinical Toxicology*, 1–5. <https://doi.org/10.3109/15563650.2014.909932>
- Titeler, M., Lyon, R. A., & Glennon, R. A. (1988). Radioligand binding evidence implicates the brain 5-HT₂ receptor as a site of action for LSD and phenylisopropylamine hallucinogens. *Psychopharmacology*, 94(2), 213–216. <https://doi.org/10.1007/BF00176847>
- Valle, F. P. (1970). Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. *The American Journal of Psychology*, 83(1), 103–111.
- Villalobos, C. A., Bull, P., Sáez, P., Cassels, B. K., & Huidobro-Toro, J. P. (2004). 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) and structurally related phenylethylamines are potent 5-HT_{2A} receptor antagonists in *Xenopus laevis* oocytes. *British Journal of Pharmacology*, 1167–1174. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705722>
- Vollenweider, F. X., Csomor, P. A., Knappe, B., Geyer, M. A., & Quednow, B. B. (2007). The effects of the preferential 5-HT_{2A} agonist psilocybin on prepulse inhibition of startle in healthy human volunteers depend on interstimulus interval. *Neuropsychopharmacology*, 32(9), 1876–1887. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301324>
- Vollenweider, F. X., Vontobel, P., Hell, D., & Leenders, K. L. (1998). 5-HT Modulation of Dopamine Release in Basal Ganglia in Psilocybin-Induced Psychosis in Man — A PET Study with [11C]raclopride. *Neuropsychopharmacology*, (98).
- Walterscheid, J., Phillips, G. T., Lopez, A. E., Gonsoulin, M. L., Chen, H., & Sanchez, L. A. (2014). Pathological Findings in 2 Cases of Fatal 25I-NBOMe Toxicity. *Am J Forensic Med Pathol*, 35(1), 20–25. <https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000082>
- Walz, N., Mühlberger, A., & Pauli, P. (2016). A Human Open Field Test Reveals Thigmotaxis Related to Agoraphobic Fear. *Biological Psychiatry*, 80(5), 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.12.016>
- Wozniak, K. M., Aulakh, C. S., Hill, J. L., & Murphy, D. L. (1988). The Effect of 8-OH-DPAT on Temperature in the Rat and Its Modification by Chronic Antidepressant Treatments. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 30.
- Yamamoto, T., & Ueki, S. (1975). Behavioral effects of 2,5-dimethoxy-4-methylamphetamine (DOM) in rats and mice. *European Journal of*

Pharmacology, 32, 156–162.

Yoshida, K., Kanju, S., Kaori, S.-I., Maeda, H., Nakajima, M., Hara, S., ... Sakamoto, T. (2015). CASE REPORT A case of fatal intoxication due to the new designer drug 25B-NBOMe. *Forensic Toxicology*, 396–401. <https://doi.org/10.1007/s11419-015-0276-7>

Zuba, D., & Seku, K. (2012). Analytical characterization of three hallucinogenic N - (2-methoxy) benzyl derivatives of the 2C-series of phenethylamine drugs, (July). <https://doi.org/10.1002/dta.1397>