

ROZPRAWA DOKTORSKA

Pharmacological properties of the hallucinogenic compound 25I-NBOMe / Własności farmakologiczne związku halucynogennego 25I-NBOMe

Monika Herian

*Zakład Farmakologii, Zespół II, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk
w Krakowie*

Obecnie jednym z ważnych problemów na świecie jest rekreacyjne przyjmowanie nowych substancji psychoaktywnych (ang. *new psychoactive substances*, NPS), znanych również pod popularną nazwą „dopalacze”. Rosnąca w niekontrolowany sposób liczba NPS stwarza niezwykle duże niebezpieczeństwo wystąpienia trwałych uszczerbków na zdrowiu użytkowników. Pochodne fenyloetyloaminy, łącznie z syntetycznymi tryptaminami, należą do grupy substancji halucynogennych. Popularność tych substancji utrzymuje się od lat na stałym poziomie, a syntetyzowane nowe związki o działaniu halucynogennym przyczyniają się do wielu ciężkich zatruc, nierzadko kończących się śmiercią.

W ostatnich latach popularność zyskały pochodne fenyloetyloaminy tzw. związki NBOMe (*N*-(2-metoksybenzylo)fenyloetyloaminy). Początkowo związki te stanowiły legalną alternatywę dla dietyloamidu kwasu lizergowego (LSD). Efektami obwodowymi będącymi skutkiem ich przyjmowania są: halucynacje, agresja, psychoza z urojeniami, drgawki, hipertermia, drętwienie części ciała, zaburzenia funkcji poznawczych, rabdomioliza oraz zwężenie naczyń krwionośnych. Stwierdzono, że związki NBOMe wykazują silne działanie już w niskich mikrogramowych dawkach, a po ich przedawkowaniu odnotowano wiele przypadków śmiertelnych. Mimo popularności NBOMe na rynku dopalaczy, wiedza o ich własnościach farmakologicznych jest ograniczona.

Jednym z najbardziej popularnych przedstawicieli tej grupy jest 4-jodo-2,5-dimetoksy-*N*-(2-metoksybenzylo)fenyloetyloamina, w skrócie 25I-NBOMe. Celem poznania mechanizmu działania 25I-NBOMe w prezentowanej rozprawie doktorskiej podjęto badania polegające na scharakteryzowaniu wpływu związku 25I-NBOMe na neuroprzeżywalność mózgową, zachowanie zwierząt oraz neurotoksyczność. Badania przeprowadzono w schemacie podań jednorazowych (0,3, 1, 3 i 10 mg/kg) oraz wielokrotnych (7 dni) w dawce 0,3 mg/kg na samcach szczurów Wistar Han. Wpływ 25I-NBOMe na uwalnianie glutaminianu, serotoniny, dopaminy i acetylocholinę

analizowano metodą mikrodializy mózgu u swobodnie poruszających się szczurów. Kolejno badano zdolność 25I-NBOMe do wywoływania aktywności halucynogennej mierzonej epizodami potrzęsania głową i ciałem (WDS) oraz efekt tego związku na aktywność ruchową i eksploracyjną w teście otwartego pola (OF), a także wpływ na funkcje poznawcze w teście rozpoznawania nowego obiektu (NOR). Ponadto w teście jasnego/ciemnego pudełka (LDB) badano zachowanie lękowe pod wpływem 25I-NBOMe. Działanie neurotoksyczne 25I-NBOMe oceniano poprzez określenie oksydacyjnego uszkodzenia jądrowego DNA za pomocą testu kometkowego, wpływu na liczbę komórek nerwowych oznaczanego immunohistochemicznie oraz obecność sygnału apoptotycznego potwierdzaną przy użyciu metody TUNEL. Co więcej, oznaczono również ilość 25I-NBOMe w strukturach mózgu szczura przy pomocy techniki spektrometrii mas.

Jednorazowe dawki 25I-NBOMe zwiększały uwalnianie glutaminianu w korze czołowej (FCx) oraz powodowały występowanie aktywności halucynogennej 25I-NBOMe, co związane jest głównie z aktywacją korowych receptorów serotoninowych 5-HT_{2A}. Zależność efektu od dawki na uwalnianie glutaminianu była nieliniowa i przyjmowała kształt litery „U”, z dawką pośrednią 3 mg/kg o najsłabszym działaniu. Podobny wpływ uzyskano w wywoływaniu aktywności halucynogennej. Natomiast efekt odwrotny (odwrócona litera „U”) obserwowano we wpływie 25I-NBOMe na uwalnianie monoamin. Zależności te mogą być związane z modulującą rolą pobudzonych przez 25I-NBOMe receptorów serotoninowych 5-HT_{2C} i 5-HT_{1A}.

Po wielokrotnych podaniach 25I-NBOMe w dawce 0,3 mg/kg efekt na uwalnianie glutaminianu oraz monoamin w FCx był osłabiony, co sugeruje rozwój tolerancji wynikający z podwrażliwości receptora 5-HT_{2A}. Osłabiona stymulacja komórek piramidowych po wielokrotnych podaniach 25I-NBOMe mogła być przyczyną zmniejszonej odpowiedzi wstępujących do FCx szlaków dopaminowych i serotoninowych, odpowiednio z pola brzuszego nakrywki (VTA) i jąder szwu (NR), co może mieć znaczenie w uwalnianiu innych neuroprzekaźników w prążkowie (STR) i jądrze półleżącym przegrody (NAS).

Zahamowanie aktywności motorycznej w teście OF oraz zaburzenie funkcji poznawczych w teście NOR po wielokrotnych podaniach 25I-NBOMe może wynikać ze zmian w sygnalizacji receptora 5-HT_{2A} i osłabienia uwalniania glutaminianu w FCx.

Wydłużony czas przebywania w strefie ciemnej po jednorazowym i wielokrotnych podaniach 25I-NBOMe w teście LDB sugeruje działanie prołękowe związku, będące skutkiem

obniżonego uwalniania serotoniny w FCx. Natomiast zwiększenie aktywności pionowej i stereotypowej po podaniach wielokrotnych może być wynikiem wzmożonego uwalniania dopaminy w STR oraz NAS.

Zarówno jednorazowe, jak i wielokrotne podania 25I-NBOMe wywołały uszkodzenie DNA w FCx i hipokampie (HP) szczura, które prawdopodobnie spowodowane są stresem oksydacyjnym. Zaburzenia te mogły przyczynić się do zmniejszenia liczby komórek glejowych w rejonach FCx, jednakże nie wywołały one śmierci komórek na drodze apoptozy.

W badaniu dystrybucji 25I-NBOMe w tkance mózgowej stwierdzono jego akumulację po podaniach wielokrotnych, głównie w FCx i HP, co może być dodatkowym czynnikiem wpływającym na uszkodzenie DNA i przeżywalność komórek.

Podsumowując, wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej opublikowane w postaci cyklu czterech oryginalnych prac wskazują, iż 25I-NBOMe znacząco wpływa na neuroprzeźnaczność mózgowe i zachowanie zwierząt za pośrednictwem korowych receptorów serotoninowych 5-HT_{2A} i 5-HT_{2C}. Ponadto 25I-NBOMe wykazuje potencjał neurotoksyczny, na co wskazują uszkodzenie jądrowego DNA, zmiany w liczbie komórek glejowych oraz znaczna akumulacja związku po podaniach wielokrotnych.

DOCTORAL DISSERTATION

Pharmacological properties of the hallucinogenic compound 25I-NBOMe / Własności farmakologiczne związku halucynogennego 25I-NBOMe

Monika Herian

Department of Pharmacology, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences in Krakow

Nowadays, one of the important problems of the world is the recreational use of new psychoactive substances (NPS), also known as ‘legal highs’. The uncontrolled increase in the number of NPS’ poses an extremely high risk of permanent damage to the health of users. Phenylethylamine derivatives, including synthetic tryptamines, belong to the group of hallucinogens. The popularity of these substances has remained constant for years and new synthesized hallucinogenic compounds contribute to serious poisoning, often fatal.

In recent years, phenylethylamine derivatives so-called NBOMe compounds (*N*-(2-methoxybenzyl)phenylethylamine) have gained popularity. Initially, these compounds were considered as a legal alternative to lysergic acid diethylamide (LSD). The peripheral effects resulting from their intake are: hallucinations, aggression, delusional psychosis, convulsions, hyperthermia, numbness in parts of the body, cognitive impairment, rhabdomyolysis and vasoconstriction. NBOMe compounds have been found to be potent at low microgram doses and many deaths have been reported following their overdose. Despite the popularity of NBOMe’s on the legal highs market, knowledge about their pharmacological properties is limited.

One of the most popular representative of this series is 4-iodo-2,5-dimethoxy-*N*-(2-methoxybenzyl) phenylethylamine, in short 25I-NBOMe. In order to understand the 25I-NBOMe mechanism of action, the presented doctoral dissertation aimed to characterize the effect of the 25I-NBOMe compound on brain neurotransmission, animal behavior and neurotoxicity. The studies were carried out in a single (0.3, 1, 3 and 10 mg/kg) and multiple (7 days) administration regimen with a dose of 0.3 mg/kg on male Wistar Han rats. The effect of 25I-NBOMe on glutamate, serotonin, dopamine and acetylcholine release was analyzed through brain microdialysis in freely moving rats. Subsequently, the ability of 25I-NBOMe to induce hallucinogenic activity was measured by episodes of head and body shaking (WDS) counts, its effect on motor and exploratory activity as well as on cognitive functions were examined in the

open field test (OF) and in the new object recognition test (NOR), respectively. Moreover, anxiety behavior under the influence of 25I-NBOMe was investigated in the light/dark box (LDB) test. The neurotoxic effect of 25I-NBOMe was assessed by measuring the oxidative DNA damage with the comet assay, the effect on the nerve cells number was determined by immunohistochemistry and the presence of an apoptotic signal was confirmed by the TUNEL assay. Moreover, the amount of 25I-NBOMe in the rat brain structures was also studied using mass spectrometry.

Single administration of 25I-NBOMe increased the release of glutamate in the frontal cortex (FCx) and induced hallucinogenic activity of 25I-NBOMe which is mainly related to the activation of cortical serotonin 5-HT_{2A} receptors. The dose-effect dependence in the glutamate release was non-linear and 'U'-shaped with the intermediate dose of 3 mg/kg having the least effect. A similar effect was obtained in inducing hallucinogenic activity. In contrast, the opposite effect (inverted 'U'-shaped) was observed in the influence of 25I-NBOMe on monoamine release. These relationships may be related to the modulatory role of the serotonin 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors stimulated by 25I-NBOMe.

After repeated administration of 25I-NBOMe at a dose of 0.3 mg/kg the effect on glutamate and monoamine release in the FCx was reduced suggesting the development of tolerance due to 5-HT_{2A} receptor desensitization. The weakened pyramidal cells stimulation after repeated administrations of 25I-NBOMe could result in decreased responses of ascending dopamine and serotonin pathways to FCx from the ventral tegmental area (VTA) and raphe nuclei (NR), respectively, which may be important in the release of other neurotransmitters in the striatum (STR) and nucleus accumbens septi (NAS).

Inhibition of motor activity in the OF test and cognitive impairment in the NOR test after multiple administrations of 25I-NBOMe may be due to changes in 5-HT_{2A} receptor signaling and attenuation of glutamate release in the FCx.

The prolonged time spent in the dark zone after single and repeated administration of 25I-NBOMe in the LDB test suggest an anxiogenic effect of the compound as a result of decreased serotonin release in the FCx. On the other hand, the increase in vertical and stereotypic activity after multiple administration may be the result of increased dopamine release in the STR and NAS.

Both single and multiple injections of 25I-NBOMe induced DNA damage in the rat FCx and hippocampus (HP), possibly caused by oxidative stress. These impairments may have contributed

to a reduction in the number of glial cells in the FCx regions, however, they did not induce cell death by apoptosis.

In the study of the 25I-NBOMe distribution in brain tissue the drug was found to be accumulated after multiple doses, mainly in the FCx and HP, which may be an additional factor having an influence on the DNA damage and cells survival.

In conclusion, the results of this doctoral dissertation, composed of a series of the four original articles, indicate that 25I-NBOMe significantly affects the brain neurotransmission and animals behavior through the cortical serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. In addition, 25I-NBOMe exhibits neurotoxic potential as evidenced by nuclear DNA damage, changes in glial cell numbers and significant compound accumulation after multiple administrations.