

**Dr hab. Dariusz Zuba, prof. IES**

Instytut Ekspertyz Sądowych  
im. prof. dra Jana Sehna  
w Krakowie

Kraków, dnia 10 maja 2022 roku

**Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr inż. Moniki Herian  
pt. *Własności farmakologiczne związku halucynogennego 25I-NBOMe***

**Charakterystyka i znaczenie podjętej problematyki badawczej**

Zasadniczym celem rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Moniki Herian była ocena wpływu nowego związku halucynogennego występującego na rynku narkotykowym o akronimie 25I-NBOMe na neuroprzeżywalność mózgową oraz zachowanie zwierząt, a także oszacowanie jego potencjału neurotoksycznego.

Nie ulega wątpliwości, że rynek narkotykowy w Polsce i na całym świecie uległ w trakcie ostatnich kilkunastu lat ogromnym zmianom. „Klasyczne narkotyki” takie jak marihuana, amfetamina, kokaina czy heroina zostały bowiem częściowo zastąpione przez tzw. nowe substancje psychoaktywne (NPS) – związki często o zbliżonej budowie do substancji kontrolowanych, ale przede wszystkim wykazujące podobne efekty działania. Zakłada się, że podobieństwo obserwowanych efektów wynika z działania NPS na te same receptory w organizmie co „klasyczne narkotyki”. Niestety, NPS wprowadzane są na rynek bez jakichkolwiek badań klinicznych, w tym nie jest w żaden sposób oceniana ich toksyczność. Osoby odpowiedzialne za syntezę i wprowadzenie nowych związków dokonują drobnych modyfikacji struktury substancji o wykazanym działaniu psychoaktywnym z nadzieją, że kolejne pochodne okażą się równie atrakcyjne dla osób żądnych nowych doświadczeń. Oznacza to, że nawet tak podstawowe dane jak wielkość dawki, sposób i czas działania czy sposób dawkowania użytkownicy ustalają samodzielnie, metodą „prób i błędów”. Prowadzi to niestety do poważnych konsekwencji, w tym zatruczeń śmiertelnych. Użytkownicy zupełnie nie biorą pod uwagę efektów długoterminowych, skupiając się na „tu i teraz”, czyli na uzyskaniu efektu odurzenia. Niestety okazuje się, że nowe związki charakteryzują się często znacznie

większą toksycznością i są bardziej niebezpieczne dla zdrowia i życia ludzi niż substancje już objęte kontrolą przez ustawę o przeciwdziałaniu narkomanii.

Bardzo dobrym przykładem takich cech jest związek wybrany przez Doktorantkę do badań, czyli 4-jodo-2,5-dimetoksy-N-(2-metoksybenzylo)fenyloetyloamina, w skrócie 25I-NBOMe. Na rynku narkotykowym związek ten pojawił się w 2010 roku, jako efekt filtrowania literatury naukowej przez osoby pracujące na rzecz nielegalnych laboratoriów pod kątem związków mogących wykazywać działanie psychoaktywne. Ponieważ przy badaniach nad zastosowaniem w pozytonowej tomografii emisyjnej wykazano jego wysokie powinowactwo i selektywność względem receptorów serotoninowych 5-HT<sub>2A</sub> uznano zapewne, że może on stanowić atrakcyjną alternatywę dla klasycznego związku halucynogennego, tj. dietyloamidu kwasu D-lizergowego (LSD). Polska była pierwszym krajem, w którym wykryto 25I-NBOMe w kartonikach zabezpieczonych w sklepach z tzw. dopalaczami, a w kolejnych miesiącach w prasie i literaturze fachowej na całym świecie zamieszczono wiele artykułów opisujących zatrucia po przyjęciu tego związku, w tym liczne przypadki zgonów. Co istotne, zgony te wynikały z przedawkowania samego 25I-NBOMe, czyli efektu, który nie jest praktycznie obserwowany dla LSD. Nie ulega zatem wątpliwości, że istniała realna i bardzo istotna potrzeba poznania własności farmakologicznych 25I-NBOMe, w szczególności ustalenia wpływu tego nowego związku na neuroprzeżywalność mózgową oraz jego potencjału neurotoksycznego, co było przedmiotem badań Doktorantki.

Celem rozprawy było scharakteryzowanie własności farmakologicznych oraz neurotoksyczności 25I-NBOMe w modelu zwierzęcym. Badania te w szczególności obejmowały ocenę wpływu tego związku na zachowanie zwierząt w modelach otrępywania głową i ciałem, ruchliwości i eksploracji, funkcji poznawczych i pamięci, jak również ocenę działania 25I-NBOMe na neuroprzeżywalność mózgową w modelu mikrodializy mózgu tłumaczącego działanie halucynogenne, wpływ na lęk i rozwój tolerancji. Analizowane było także zaangażowanie różnych podtypów receptorów serotoninowych w efekt działania 25I-NBOMe, oceniono jego neurotoksyczność *in vivo* poprzez określenie oksydacyjnego uszkodzenia jądrowego DNA oraz zaburzeń struktury mózgu, jak również ustalono dystrybucję i akumulację 25I-NBOMe w różnych obszarach mózgowych.

Nie mam wątpliwości, że badania przedstawione w recenzowanej pracy mają ogromne znaczenie dla zrozumienia sposobu działania 25I-NBOMe i określenia zagrożeń wynikających z jego jednorazowego i wielokrotnego przyjmowania. Wyniki badań zostały opublikowane w czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu, cieszących się dużym uznaniem badaczy z zakresu farmakologii i toksykologii, co oznacza nie tylko szansę na upowszechnienie wiedzy na temat zagrożeń wynikających ze stosowania tego związku, ale może również pomóc w terapii osób uzależnionych.

### **Układ pracy i poruszane zagadnienia**

Podstawę recenzowanej rozprawy stanowi zbiór czterech oryginalnych publikacji spójnych tematycznie, które Autorka opublikowała w latach 2019 – 2022 w czasopismach o międzynarodowym zasięgu, takich jak *Neurotoxicity Research*, *Pharmacological Reports*, *Psychopharmacology* oraz *Scientific Reports*, charakteryzujących się wysoką wartością pięcioletniego współczynnika cytowań, mieszczącego się w zakresie od 3,427 do 5,134. We wszystkich tych pracach Doktorantka odegrała wiodącą rolę i była ich pierwszą autorką. Praca napisana została w języku polskim i została sporządzona zgodnie z Zaleceniami Komisji Rady ds. Prowadzenia Czynności w Sprawie Nadania Stopnia Doktora Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk.

Rozprawa doktorska po przedstawieniu informacji o źródle finansowania badań i spisie treści, rozpoczyna się wykazem publikacji stanowiących jej podstawę, wykazem stosowanych skrótów oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim.

Część wprowadzająca do pracy przedstawiona została na 18 stronach. Omówiono w niej m.in. takie zagadnienia jak: definicja i klasyfikacja nowych substancji psychoaktywnych (NPS), rodzaje i własności farmakologiczne substancji halucynogennych, historia syntezy, właściwości i toksyczność związków z grupy NBOMe u ludzi, określenie profilu receptorowego tej grupy związków, w tym selektywność powinowactwa do receptorów serotoninowych 5-HT<sub>2A</sub> i 5-HT<sub>2C</sub>, ich cytotoksyczność i wpływ na zachowanie zwierząt, toksyczność wykazaną w badaniach *in vivo*, wyniki analiz toksykologicznych oraz metabolizm, a także możliwości wykorzystania związków halucynogennych w terapii.

Następnie jasno przedstawiony został cel główny badań oraz spójne cele szczegółowe. W części zatytułowanej „Materiał i metody” Autorka rozprawy podała informacje dotyczące zwierząt stosowanych w badaniach, a przede wszystkim sposób podawania związku 25I-NBOMe i schematy poszczególnych doświadczeń dotyczących badania zachowania zwierząt, mikrodializy mózgu u swobodnie poruszających się szczurów, badania neurotoksyczności, oznaczania zawartości związku w mózgu oraz metod statystycznych wykorzystywanych do interpretacji uzyskanych wyników eksperymentalnych.

Wyniki badań omówiono oddzielnie dla poszczególnych zagadnień. W kontekście badania wpływu 25I-NBOMe na zachowanie zwierząt Autorka rozprawy opisała wpływ jednorazowych i wielokrotnych podań 25I-NBOMe na liczbę epizodów otrzepywania głową i ciałem, ruchliwość zwierząt, ich funkcje poznawcze i pamięć, a także zachowania lękowe. Kolejnym poruszonym zagadnieniem było badanie efektów jednorazowych podań 25I-NBOMe na uwalnianie dopaminy, serotoniny i glutamianu w korze czołowej szczura. Rolę poszczególnych podtypów receptorów serotoninowych w działaniu 25I-NBOMe Doktorantka ustaliła dzięki badaniu wpływu ich antagonistów na uwalnianie glutamianu, dopaminy i serotoniny w korze czołowej zwierząt oraz liczby epizodów potrząsania głową i ciałem po podaniu badanego związku. W kolejnym kroku badane były efekty wielokrotnych podań 25I-NBOMe na uwalnianie dopaminy, serotoniny, glutamianu i acetylocholin w korze czołowej, prążkowie oraz jądrze półleżącym przegrody szczura. Z kolei działanie neurotoksyczne 25I-NBOMe wykazano m.in. poprzez określenie wpływu jednorazowych podań tego związku na zawartość tkankową dopaminy i serotoniny oraz ich metabolitów w korze czołowej, ocenę wpływu wielokrotnych podań 25I-NBOMe na zmiany liczby komórek w strukturach korowych i hipokampie, a także ustalenie wpływu jednorazowych i wielokrotnych podań tej substancji na oksydacyjne uszkodzenia jądrowego DNA w korze czołowej i hipokampie szczura. Doktorantka określiła również metody identyfikacji, a także odniosła się do dystrybucji i akumulacji 25I-NBOMe w osoczu i strukturach mózgu tych zwierząt. Ta część przedstawiona została na 11 stronach.

Przeprowadzona dyskusja wyników własnych oraz ich odniesienie do danych literaturowych potwierdziły zdolność Doktorantki do samodzielnej analizy wyników badań przedstawionych w zbiorze publikacji, a także wykazana została ich spójność

tematyczna. Na podstawie analizy danych Doktorantka wyciągnęła właściwe wnioski, mające pełne potwierdzenie w uzyskanych wynikach. Potrafiła je jasno i precyzyjnie przedstawić, wzmacniając przekaz za pomocą stosownej ryciny.

Autorka rozprawy przedstawiła również spis bibliografii wykorzystanej we wprowadzeniu oraz dyskusji wyników. Dobór pozycji literaturowych należy uznać za właściwy.

Rozprawę uzupełniają oświadczenia współautorów publikacji oraz oryginalne wersje publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

Układ pracy jest prawidłowy, a poruszane zagadnienia są ściśle związane z założeniami i celami pracy.

Rozprawa napisana jest w sposób bardzo staranny. Zauważa się też dbałość Doktorantki o formę graficzną pracy. W konsekwencji pracę, która stanowi kompendium aktualnej wiedzy na temat nowej substancji halucynogennej jaką jest 25I-NBOMe, czyta się z dużym zainteresowaniem. Autorka rozprawy posługuje się poprawną polszczyzną, swobodnie operując nią w złożonej tematyce naukowej.

### **Ocena metod badawczych, sposobu przeprowadzenia badań i analizy uzyskanych wyników**

Recenzowana praca miała charakter eksperymentalny. Badania zostały zaplanowane we właściwy sposób, a dobór rodzaju eksperymentów oraz aparatury badawczej, jak również sposób przeprowadzenia badań oraz interpretacja uzyskanych wyników były właściwe.

Badania przedstawione w pracy miały na celu ocenę wpływu 25I-NBOMe na neuroprzeżywalność mózgową i zachowanie zwierząt oraz neurotoksyczności tego związku. Wykonano je w schemacie podań jednorazowych, w dawkach wynoszących 0,3, 1, 3 i 10 mg/kg, a także podań wielokrotnych w dawce 0,3 mg/kg przez 7 dni. Do eksperymentów wykorzystano samce szczurów Wistar Han.

Uwalnianie glutaminy, serotoniny, dopaminy i acetylocholiny pod wpływem 25I-NBOMe badano wykonując mikrodializę mózgu u swobodnie poruszających się

szczurów. Doktorantka oceniała zdolność 25I-NBOMe do wywoływania aktywności halucynogennej poprzez śledzenie epizodów potrząsania głową i ciałem (WDS) oraz wpływ tego związku na aktywność ruchową i eksploracyjną wykonując test otwartego pola (OF). Z kolei wpływ 25I-NBOMe na funkcje poznawcze był oceniany w teście rozpoznawania nowego obiektu (NOR), a zachowania lękowe wywoływane przez ten związek badano w teście jasnego/ciemnego pudełka (LDB).

Test kometkowy, metoda immunohistochemiczna i TUNEL były wykorzystane w ocenie działania neurotoksycznego 25I-NBOMe i pozwoliły na określenie oksydacyjnego uszkodzenia jądrowego DNA, wpływu na liczbę komórek nerwowych oraz obecność sygnału apoptotycznego.

Do ustalenia ilości 25I-NBOMe w poszczególnych strukturach mózgu szczura wykorzystano technikę spektrometrii mas z pułapką jonową, po uprzednim oczyszczeniu próbek na kolumnkach z ekstrakcją do fazy stałej, a także rozdziale na kolumnie chromatograficznej. Jak specjalista z zakresu chemii analitycznej odczuwam pewien niedosyt odnośnie ilości informacji co do sposobu przeprowadzenia tych badań, bowiem z uwagi na bardzo niskie stężenia 25I-NBOMe jego oznaczanie było z pewnością bardzo trudne. Potwierdzają to ryciny z publikacji 4 (w czasopiśmie *Scientific Reports*), w szczególności rycina 1, gdzie wysokość sygnału dla próby kontrolnej i po podaniu 10 mg/kg 25I-NBOMe w korze czołowej były zbliżone.

Analiza danych przedstawionych w rozprawie wskazuje jednoznacznie, że doboru metod badawczych dokonywano właściwie do zamierzonego celu.

Autorka rozprawy wykazała, że już jednorazowe dawki 25I-NBOMe zwiększały uwalnianie glutaminianu i monoamin w korze czołowej oraz powodowały występowanie aktywności halucynogennej 25I-NBOMe i opisała zależności efektu od dawki. Udowodniła również receptorowy mechanizm działania 25I-NBOMe we wpływie na uwalnianie glutaminianu, a także iż aktywność halucynogenna tego związku opiera się głównie na aktywacji korowych receptorów 5-HT<sub>2A</sub> i 5-HT<sub>2C</sub>. Wykazała także osłabienie efektu uwalniania glutaminianu oraz monoamin w korze czołowej po wielokrotnych podaniach 25I-NBOMe w niskiej dawce. Doktorantka stwierdziła, iż tolerancja obserwowana w uwalnianiu neuroprzekaźników w korze czołowej oraz zachowaniu zwierząt po wielokrotnych podaniach 25I-NBOMe jest wynikiem zmian w sygnalizacji receptora

5-HT<sub>2A</sub>. Bardzo istotne było również udowodnienie uszkodzenia DNA w korze czołowej i hipokampie szczura zarówno po jednorazowym, jak i wielokrotnym podaniu 25I-NBOMe.

Przeprowadzone badania pozwoliły zatem Doktorantce na wyciągnięcie szeregu bardzo istotnych wniosków. Wykazała Ona bowiem między innymi, że podanie 25I-NBOMe wywołuje zmiany w neuroprzekąźnictwie dopaminowym, serotoninowym, glutaminianergicznym i cholinergicznym, zarówno po podaniach jednorazowych, jak i wielokrotnych. Wielokrotne podanie tego związku spowodowało rozwój tolerancji i Doktorantka wskazała jej możliwą przyczynę. Określiła również rolę podtypów receptorów 5-HT<sub>2A</sub> oraz 5-HT<sub>2C</sub> w mechanizm działania 25I-NBOMe. Wykazała, że efektem zaburzonej homeostazy w uwalnianiu glutamianu i dopaminy pod wpływem tego związku jest generowanie wolnych rodników powodujących oksydacyjne uszkodzenie jądrowego DNA, a zatem potwierdziła neurotoksyczność in vivo 25I-NBOMe w modelu zwierzęcym. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę pozwoliły również na pokazanie zdolność akumulacji 25I-NBOMe w mózgu po wielokrotnych podaniach obwodowych. Wartość merytoryczna rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Moniki Herian jest zatem w mojej ocenie bardzo wysoka.

## **Podsumowanie**


Treść rozprawy doktorskiej potwierdza, że Pani mgr inż. Monika Herian posiada dużą wiedzę na temat substancji halucynogennych, bardzo dobry warsztat badawczy, potrafi właściwie zaplanować i przeprowadzić badania z wykorzystaniem nowoczesnej, zaawansowanej aparatury oraz zinterpretować uzyskane wyniki. W sposób właściwy odniosła wyniki badań własnych do danych literaturowych, z należytą krytyką podchodząc do własnych ustaleń.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Moniki Herian zawiera wiele elementów nowości. Kluczowe wydaje się potwierdzenie po raz pierwszy neurotoksyczności in vivo 25I-NBOMe w modelu zwierzęcym i wykazanie uszkodzenia jądrowego DNA, zmian w liczbie komórek glejowych oraz znacznej akumulacji po podaniach wielokrotnych tego związku. Doktorantka wykazała również, że 25I-NBOMe znacząco wpływa na neuroprzekąźnictwo mózgowe i zachowanie zwierząt za pośrednictwem korowych

receptorów serotoninowych 5-HT<sub>2A</sub> i 5-HT<sub>2C</sub> i opisała ilościowo te procesy. Warta docenienia jest również umiejętność ustalenia ilości 25I-NBOMe w materiałach pobranych od szczurów, z uwagi na bardzo niskie stężenia badanego związku.

#### WNIOSEK

Na podstawie przeprowadzonej oceny rozprawy doktorskiej stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające Ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669) i stawiam wniosek do Wysokiej Rady Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr inż. Moniki Herian do publicznej obrony.



Dr hab. Dariusz Zuba  
Profesor instytutu