

magister farmacji Katarzyna Alicja Kuczyńska

**Ocena neurotoksyczności  
MDPV (3,4-metylenodioksypirwaleronu)  
podawanego w okresie rozwoju  
ośrodkowego układu nerwowego u myszy**

**Assessment of neurotoxicity of MDPV (3,4-methylenedioxypropylone)  
administered during the period of development  
of the central nervous system in mice**

**Rozprawa na stopień doktora  
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

Promotor: dr hab. n. farm. Jakub Wojcieszak  
Zakład Farmakodynamiki, Katedra Biofarmacji, Wydział Farmaceutyczny,  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Akceptuję: .....  
(data i podpis promotora)

## Podziękowania

Chciałabym złożyć wyrazy wdzięczności **Pani prof. dr hab. n. farm. Jolancie Zawilskiej**. Pani Profesor była dla mnie inspiracją i pierwszą osobą, która ukierunkowała moje zainteresowania naukowe. Na mądrość, wsparcie Pani Profesor zawsze mogłam liczyć, stanowiło to nieocenioną motywację do pracy.

Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania **Panu dr. hab. n. farm. Jakubowi Wojcieszakowi** za ogromną możliwość rozwoju, zawsze cenne uwagi i opiekę naukową w trakcie wykonywania pracy pod kierunkiem Pana Doktora. Szczególnie dziękuję za przekazywaną przez lata wiedzę i umiejętności.

Badania naukowe wykonane na potrzeby prezentowanej rozprawy doktorskiej były pracą zespołową. Dziękuję za możliwość współpracy, zaangażowanie, merytoryczne wsparcie i konsultacje naukowe **Pani dr hab. Ruzannie Djavadian, prof. IBD PAN** i **Pani dr hab. Katarzynie Bartkowskiej** z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.

Dziękuję **Pani dr n. farm. Ewie Zwierzyńskiej** za pomoc, poświęcony czas, a także miłą atmosferę w trakcie realizacji badań.

Serdeczne podziękowania składam również **Koleżankom i Kolegom** z Zakładu Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, **Pani dr hab. n. farm. Bogusławie Pietrzak, prof. UM**, **Pani dr n. farm. Agacie Woldan-Tambor**, **Panu dr. n. farm. Dariuszowi Andrzejczakowi** i **Panu mgr. farm. Dominikowi Borgusiowi**. Wszystkimi Państwami dziękuję za zrozumienie, życzliwość i serdeczność.

# Spis treści

<b>Wykaz skrótów .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Wstęp .....</b>	<b>9</b>
1.1. Nowe substancje psychoaktywne – definicje, rozpowszechnienie, klasyfikacja i status prawny .....	9
1.2. Syntetyczne katynony .....	12
1.2.1. Pochodzenie i rozpowszechnienie .....	12
1.2.2. Budowa i mechanizm działania syntetycznych katynonów .....	16
1.2.3. Właściwości fizykochemiczne MDVP i sposoby jego przyjmowania .....	22
1.2.4. Metabolizm MDPV .....	23
1.2.5. Efekty działania MDPV na modelach zwierzęcych .....	23
1.2.6. Efekty działania syntetycznych katynonów u ludzi .....	24
1.2.7. Neurotoksyczność <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> syntetycznych katynonów i klasycznych związków psychostymulujących .....	27
1.3. Hipokamp i jego rola w procesach pamięciowych .....	32
1.3.1. Rodzaje pamięci .....	32
1.3.2. Rola formacji hipokampa i struktur funkcjonalnie powiązanych z hipokampem w procesach pamięciowych .....	33
1.3.3. Neuroplastyczność – neurogeneza i synaptogeneza w hipokampie .....	37
<b>2. Cel pracy .....</b>	<b>41</b>
<b>3. Materiały i metody .....</b>	<b>42</b>
3.1. Odczynniki i związki chemiczne .....	42
3.1.1. Podawane związki .....	42
3.1.2. Eutanazja i utrwalenie tkanek .....	42
3.1.3. Immunohistochemia .....	42
3.1.4. Western blot .....	44
3.2. Zwierzęta .....	46
3.3. Podawanie związków .....	48
3.4. Badania behawioralne .....	48
3.4.1. Test spontanicznej alternacji .....	49
3.4.2. Test rozpoznawania nowego obiektu .....	50
3.4.3. Test labiryntu wodnego Morrisa .....	51
3.4.3.1. Trening – ocena zdolności pływania .....	52
3.4.3.2. Ocena nauki przestrzennej lokalizacji platformy (ang. spatial learning, spatial acquisition) .....	52
3.4.3.3. Próba pamięci przestrzennej lokalizacji platformy .....	53

3.4.3.4	Ocena nauki przestrzennej nowej lokalizacji platformy (ang. spatial reversal).....	53
3.4.3.5	Próba pamięci przestrzennej nowej lokalizacji platformy .....	54
3.5.	Ocena neurogenezy w hipokampie przy użyciu metod immunohistochemicznych.....	54
3.5.1.	Eutanazja metodą perfuzji przezsercowej .....	54
3.5.2.	Izolacja mózgu.....	55
3.5.3.	Przygotowanie skrawków .....	55
3.5.4.	Ocena neurogenezy w zakręcie zębatym .....	55
3.5.4.1	Oznaczenie inkorporacji bromodeoksyurydyny .....	55
3.5.4.2	Ocena kolokalizacji BrdU z markerami komórek układu nerwowego .....	57
3.5.4.3	Analiza danych.....	57
3.6.	Ocena ekspresji białek związanych z neurogenezą i neuroplastycznością hipokampa.....	58
3.6.1.	Izolacja hipokampa .....	58
3.6.2.	Homogenizacja tkanek .....	58
3.6.3.	Pomiar zawartości białka w próbkach.....	59
3.6.4.	Oznaczenia ekspresji białek metodą Western blot .....	59
3.6.4.1	Przygotowanie próbek lizatów białkowych .....	59
3.6.4.2	Elektroforeza białek.....	60
3.6.4.3	Transfer rozdzielonych białek na membranę .....	60
3.6.4.4	Inkubacja membrany z przeciwciałami.....	60
3.6.4.5	Pomiar intensywności sygnału i kwantyfikacja .....	61
3.7.	Analiza statystyczna wyników .....	61
<b>4.</b>	<b>Wyniki .....</b>	<b>63</b>
4.1.	Wpływ MDPV na śmiertelność.....	63
4.2.	Wpływ MDPV na przyrost masy ciała .....	63
4.3.	Wpływ MDPV na roboczą pamięć przestrzenną.....	65
4.4.	Wpływ MDPV na zdolność rozpoznawania obiektów.....	66
4.4.1.	Retencja 3-godzinna.....	66
4.4.2.	Retencja 24-godzinna.....	67
4.5.	Wpływ MDPV na pamięć przestrzenną w teście labiryntu wodnego Morrisa.....	69
4.5.1.	Trening z widoczną platformą.....	69
4.5.2.	Nauka przestrzenna lokalizacji platformy.....	72
4.5.3.	Próba pamięci przestrzennej lokalizacji platformy .....	75
4.5.4.	Nauka przestrzenna nowej lokalizacji platformy .....	79
4.5.5.	Próba pamięci przestrzennej nowej lokalizacji platformy .....	82
4.5.6.	Bierne unoszenie się na powierzchni wody .....	86
4.6.	Wpływ MDPV na neurogenezę w zakręcie zębatym.....	89
4.6.1.	Proliferacja komórek w zakręcie zębatym.....	89

4.6.2.	Identyfikacja komórek w zakręcie zębatym.....	92
4.7.	Wpływ MDPV na poziom ekspresji białek związanych z plastycznością synaptyczną.....	97
4.7.1.	Ekspresja synaptofizyny .....	97
4.7.2.	Ekspresja białka gęstości postsynaptycznej 95 .....	99
<b>5.</b>	<b>Dyskusja .....</b>	<b>101</b>
<b>6.</b>	<b>Wnioski .....</b>	<b>111</b>
<b>7.</b>	<b>Streszczenie w języku polskim .....</b>	<b>113</b>
<b>8.</b>	<b>Streszczenie w języku angielskim .....</b>	<b>116</b>
	<b>Piśmiennictwo .....</b>	<b>118</b>
	<b>Wykaz tabel.....</b>	<b>136</b>
	<b>Wykaz rycin .....</b>	<b>137</b>
	<b>Całkowity dorobek naukowy .....</b>	<b>141</b>
	<b>Oświadczenie współautorów publikacji.....</b>	<b>146</b>

## Wykaz skrótów

3-CMC (ang. *3-chloromethcathinone*) – 3-chlorometkatynon

4-CMC (ang. *4-chloromethcathinone*) – 3-chlorometkatynon

3-MMC (ang. *3-methylmethcathinone*) – 3-metylmekkatynon

BBB (ang. *blood-brain barrier*) – bariera krew-mózg

BrdU – bromodeoksyurydyna, 5-bromo-2'-deoksyurydyna

BSA (ang. *bovine serum albumin*) – albumina z surowicy bydłowej

CA (łac. *Cornu ammonis*) – hipokamp właściwy

DAT (ang. *dopamine transporter*) – transporter dopaminy

DG (ang. *dentate gyrus*) – zakręt zębaty

EC (ang. *entorhinal cortex*) – kora śródwęchowa

EMCDDA (ang. *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*)  
– Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii

GFAP (ang. *glial fibrillary acidic protein*) – kwaśne białko włókienkowe

GIS – Główny Inspektorat Sanitarny

HHPV (ang. *3,4-dihydroxypyrovalerone*) – 3,4-dihydroksypirowaleron

HMPV (ang. *4-hydroxy-3-methoxypyrovalerone*) – 4-hydroksy-3-metoksy-  
pirowaleron

IgG – immunoglobulina G

MDMA (ang. *3,4-methylenedioxymethamphetamine*) – 3,4-metylenodioksy-  
metamfetamina

MDPV (ang. *3,4-methylenedioxypyrovalerone*) – 3,4-metylenodioksy-  
pirowaleron, 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(1-pyrolidinylo)-1-pentanon

MES (ang. *2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid*) – kwas 2-(N-morfolino)-  
etanosulfonowy

MTL (ang. *medial temporal lobe*) – przyśrodkowy płat skroniowy

MWM (ang. *Morris water maze*) – labirynt wodny Morrisa

NET (ang. *norepinephrine transporter*) – transporter noradrenaliny

NeuN (ang. *neuronal nuclear protein*) – neuronalne białko neurofilamentowe

NGS (ang. *normal goat serum*) – surowica kozia

NOR (ang. *novel object recognition*) – rozpoznawanie nowego obiektu

NPS (ang. *novel psychoactive substances*) – nowe substancje psychoaktywne

NuPAGE (ang. *neutral polyacrylamide gel electrophoresis*) – obojętny żel poliakrylamidowy do elektroforezy białek

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PB (ang. *phosphate buffer*) – bufor fosforanowy

PBS (ang. *phosphate buffer saline*) – sól fizjologiczna buforowana fosforanami

PER (ang. *perirhinal cortex*) – kora okołowęchowa

PFA (ang. *paraformaldehyde*) – paraformaldehyd

PFC (ang. *prefrontal cortex*) – kora przedczołowa

PD (ang. *postnatal day*) – dzień po narodzinach

PSD95 (ang. *postsynaptic density protein 95*) – białko gęstości postsynaptycznej

RIPA (ang. *radioimmunoprecipitation assay buffer*) – bufor lizujący

SERT (ang. *serotonin transporter*) – transporter serotoniny

SGZ (ang. *subgranular zone*) – warstwa podziarnista

SSC (ang. *saline sodium citrate buffer*) – roztwór soli fizjologicznej w buforze cytrynianowym

TBS (ang. *tris-buffered saline*) – sól fizjologiczna buforowana tris(hydroksymetylo)aminometanem

TBS-A (ang. *tris-buffer saline with Triton-X 100*) – sól fizjologiczna buforowana Tris z Triton-X 100

TBS-B (ang. *tris buffer saline with Triton-X 100 and BSA*) sól fizjologiczna buforowana Tris z Triton-X 100 i albuminą z surowicy bydlęcej

TBS-T (ang. *tris-buffered saline with Tween 20*) – sol fizjologiczna buforowana Tris z Tween 20

Tris (ang. *tris(hydroxymethyl)aminomethane*) – tris(hydroksymetylo)aminometan

UNODC (ang. *United Nations Office on Drugs and Crime*) – Biuro Narodów Zjednoczonych ds. Narkotyków i Przestępczości



# 1. Wstęp

## 1.1. Nowe substancje psychoaktywne – definicje, rozpowszechnienie, klasyfikacja i status prawny

Zażywanie substancji psychoaktywnych stanowi poważny problem zdrowotny i społeczny. Nowe substancje psychoaktywne (ang. *novel psychoactive substances*, NPS), w Polsce powszechnie znane jako „dopalacze”, pojawiły się w połowie pierwszej dekady XXI wieku jako tania i legalna alternatywa dla narkotyków objętych międzynarodową kontrolą. Wciąż wprowadzane są do obrotu nowe związki psychoaktywne, a rynek narkotykowy podlega dynamicznym zmianom [UNODC, 2013].

W odpowiedzi na rosnącą liczbę związków psychoaktywnych w maju 2005 roku Unia Europejska opracowała definicję NPS. Określa ona nową substancję psychoaktywną jako *„nowy środek odurzający lub nowy lek psychotropowy w postaci czystej lub w formie preparatu, która nie została zamieszczona w wykazach załączonych do Jednolitej konwencji ONZ o środkach odurzających z 1961 r. lub do Konwencji ONZ o substancjach psychotropowych z 1971 r., a która może stanowić porównywalne zagrożenie dla zdrowia publicznego jak substancje wymienione w wykazach I, II lub IV”* [decyzja Rady 2005/387/WSiSW]. Termin ten został następnie zaadaptowany przez Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (ang. *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, EMCDDA) i Biuro Narodów Zjednoczonych ds. Narkotyków i Przestępczości (ang. *United Nations Office on Drugs and Crime*, UNODC) [UNODC, 2013]. Niemniej jednak, zakres definicji i status prawny poszczególnych substancji może różnić się w zależności od kraju oraz podlega aktualizacjom.

W Polsce, w myśl znowelizowanej ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii, termin „nowa substancja psychoaktywna” oznacza *„każdą substancję lub grupy substancji pochodzenia naturalnego lub syntetycznego w formie czystej lub w formie preparatu działającą na ośrodkowy układ nerwowy, inną niż substancja psychotropowa i środek odurzający, stwarzającą zgodnie z rekomendacją Zespołu do spraw oceny ryzyka zagrożeń dla zdrowia lub życia*

*ludzi związanych z używaniem nowych substancji psychoaktywnych, o której mowa w art. 18b ust. 1 pkt 3, zagrożenia dla zdrowia lub zagrożenia społeczne porównywalne do zagrożeń stwarzanych przez substancję psychotropową lub środek odurzający, lub które naśladują działanie tych substancji, określoną w przepisach wydanych na podstawie art. 44f pkt 3” [Dz. U. z 2023 r. poz. 172].*

Jednakże określenie „nowa” może być mylące, sugerując, iż dany związek został niedawno zsyntetyzowany lub wyizolowany z materiału roślinnego. W rzeczywistości pojęcie to odnosi się do każdego związku, który zaczęto używać w celach rekreacyjnych [EMCDDA, 2023; UNODC, 2013]. Dotyczy to również związków psychoaktywnych zsyntetyzowanych wiele lat temu, zmodyfikowanych prekursorów związków psychoaktywnych lub substancji psychoaktywnych pochodzenia roślinnego [UNODC, 2013] bądź zwierzęcego [Orsolini i wsp., 2018]. Liczne NPS zostały zsyntetyzowane dekady temu przez firmy farmaceutyczne lub laboratoria uniwersyteckie w poszukiwaniu nowych leków, natomiast część związków przeznaczona była jedynie do przeprowadzania badań naukowych, m.in. służyła jako ligandy przeznaczone do badania funkcji określonych receptorów [UNODC, 2013].

NPS stanowią nieustannie rozwijającą się i bardzo zróżnicowaną pod względem budowy chemicznej i działania grupę substancji. W oparciu o wywoływane przez NPS efekty psychotropowe i oddziaływanie na zachowanie użytkowników znajdujących się pod ich wpływem, wyróżnia się cztery główne kategorie NPS, tj. syntetyczne kannabinoidy, związki psychostymulujące, związki halucynogenne/psychodysleptyczne i związki działające depresyjnie na ośrodkowy układ nerwowy (OUN) [Luethi i Liechti, 2020; Shafi i wsp., 2020]. Istnieje też szeroka grupa innych związków, których nie można jednoznacznie przyporządkować do żadnej z powyższych kategorii. Ponadto, leki takie jak podtlenek azotu czy tramadol, chociaż spełniają kryteria definicji NPS, nie są formalnie uznane za NPS, a obrót nimi nie podlega międzynarodowej kontroli prawnej [Luehti i Liechti, 2020; Shafi i wsp., 2020; UNODC, 2023].

Aby uniknąć odpowiedzialności karnej w przypadku zatrucia lub zgonu użytkowników, produkty zawierające NPS są oferowane jako „odczynniki chemiczne”, „mieszanki ziołowe”, „odżywki dla roślin”, „środki czyszczące”,

„odświeżacze powietrza” i opatrzone ostrzeżeniem, iż produkty te „nie są przeznaczone do spożycia przez ludzi” lub „są przeznaczone jedynie do celów naukowych” [UNODC, 2013]. Tego typu produkty również obejmuje znowelizowana ustawa o przeciwdziałaniu narkomanii, w której zostały one określone jako „środek zastępczy”, czyli „*produkt zawierający substancję o działaniu na ośrodkowy układ nerwowy, który może być użyty w takich samych celach jak środek odurzający, substancja psychotropowa lub nowa substancja psychoaktywna, których wytwarzanie i wprowadzanie do obrotu nie jest regulowane na podstawie przepisów odrębnych; do środków zastępczych nie stosuje się przepisów o ogólnym bezpieczeństwie produktów*” [Dz. U. z 2023 r. poz. 172].

W pierwszych kilku latach obecności NPS na rynku ze względu na to, iż były to substancje niekontrolowane w większości krajów, wśród użytkowników panowało iluzoryczne poczucie bezpieczeństwa i przekonanie o ich nieszkodliwości. Dodatkowo były one łatwo dostępne w tzw. smartshopach i anonimowo w Internecie oraz oferowane po bardzo niskiej cenie, co przyczyniło się do ich rozpowszechnienia wśród młodzieży i młodych dorosłych [Corkery i wsp., 2018]. W 2014 roku liczba NPS wykrytych po raz pierwszy w Europie osiągnęła poziom 101 związków, po czym zaczęła stopniowo się zmniejszać, oscylując wokół 50 nowych NPS w latach 2017-2021 [EMCDDA, 2023], co oznacza, iż wybuch pandemii COVID-19 nie zatrzymał wprowadzania na rynek nowych NPS [Catalani i wsp., 2021]. Natomiast, w 2022 roku osiągnęła najniższy poziom od 12 lat; po raz pierwszy zidentyfikowano 41 NPS [EMCDDA, 2023], a w 2023 roku po raz pierwszy zidentyfikowano jedynie 26 NPS, co świadczy o pogłębieniu się tendencji spadkowej [EMCDDA, 2024]. Do spadku liczby pojawiających się rokrocznie związków mogło przyczynić się wprowadzenie tzw. legislacji generycznej (analogowej), w myśl której wykazy kontrolowanych substancji zawierają nie tylko poszczególne związki wymienione z nazwy, ale też całe grupy związków o określonej budowie strukturalnej. Uwzględnione na listach grupy związków musi charakteryzować podobieństwo szkieletu węglowego do macierzystego związku kontrolowanego z wyszczególnieniem przewidywanych zmian podstawników w jego strukturze [UNODC, 2019]. Pomimo, iż tempo w jakim na rynku pojawiają się nowe

substancje maleje, to liczba substancji należących do NPS ciągle wzrasta [UNODC, 2023]. Wprowadzenie przepisów generycznych nie rozwiązuje całkowicie problemu, a niekiedy wręcz przyspiesza pojawianie się związków o zupełnie innej strukturze, lecz wykazujących podobne działanie psychofarmakologiczne do związków kontrolowanych [UNODC, 2019]. Na koniec 2023 roku EMCDDA monitorowała ponad 950 NPS [EMCDDA, 2024]. Analogiczne dane opublikowało UNODC. Szacuje się, że w 2021 roku na rynku światowym dostępnych było 618 substancji, z czego 87 zidentyfikowano po raz pierwszy, dając łącznie 1165 NPS kiedykolwiek zareportowanych do UNODC [UNODC, 2023]. Najbardziej popularną grupę NPS stanowią syntetyczne kannabinoidy (agoniści receptorów kannabinoidowych), natomiast tuż za nimi plasują się syntetyczne katynony, które zdominowały rynek psychostymulujących „dopalaczy” [EMCDDA, 2024; UNODC, 2023].

## **1.2. Syntetyczne katynony**

### **1.2.1. Pochodzenie i rozpowszechnienie**

Syntetyczne katynony są analogami katynonu – związku naturalnie występującego w młodych liściach i pąkach wiecznie zielonego krzewu – czuwaliczki jadalnej (*Catha edulis* Forsk, rodz. *Celastraceae*), zwanej potocznie khatem. Ze względu na łagodne działanie euforyzujące i psychostymulujące są one żute od setek lat przez mieszkańców południowo-wschodniej części Półwyspu Arabskiego i tzw. Rogu Afryki, głównie na terenach dzisiejszego Jemenu, Etiopii, Kenii i Somalii. Żucie khatu jest silnie zakorzenione w lokalnych społecznościach i praktykowane podczas wydarzeń kulturalnych bądź ceremonii o charakterze religijnym. Regularnie odbywają się też kilkugodzinne sesje żucia khatu [Valente i wsp., 2014]. Khat wzmaga czujność i znosi poczucie zmęczenia, działa anorektycznie, podnosi nastrój, ułatwia nawiązywanie kontaktów towarzyskich i zwiększa poczucie pewności siebie [Kalix, 1996; Silva i wsp., 2022].

Liście khatu zawierają ponad 40 różnych związków, z których działanie pobudzające wykazują alkaloidy należące do frakcji fenyloalkiloamin. Najsilniejsze działanie psychostymulujące wykazuje S(-)-katynon, (-)- $\alpha$ -aminopropiofenon [Valente i wsp., 2014], o sile działania podobnej

do S(+)-amfetaminy [Kalix, 1980], stąd czasem nazywany jest „naturalną amfetaminą” [Kalix, 1996]. Szacuje się, że efekty pobudzenia po typowej sesji żucia khatu są zbliżone do przyjęcia 5 mg amfetaminy [Feng i wsp., 2017]. Katynon może stanowić do 70% frakcji fenyloalkiloaminowej w khacie, występuje jednak wyłącznie w świeżych liściach [Kalix i Khan, 1984]. W trakcie dojrzewania rośliny oraz podczas wysychania zebranych liści, katynon ulega szybkiemu przekształceniu do katyny – (+)-norpseudoefedryny, o około 7- do 10-krotnie słabszym działaniu pobudzającym, oraz do (-)-norefedryny. Z tego powodu w celach rekreacyjnych stosowane są tylko liście młode, świeże – zerwane maksymalnie kilka dni wcześniej z krzewu, a zwyczaj żucia khatu ograniczał się do terenów endemicznego występowania rośliny. Jednak w związku z usprawnieniem sposobów transportu i dystrybucji stosowanie khatu rozpowszechniło się w krajach zachodnich wśród imigrantów z Jemenu i Somalii [Valente i wsp., 2014].

Katyna w liściach khatu została zidentyfikowana w 1930 roku, natomiast katynon dopiero w 1975 roku [De Felice, 2014]. Niezależnie od prowadzonych badań nad khatem, nie znając struktury chemicznej katynonu i katyny, podjęto się syntezy związków o podobnej strukturze do amfetaminy, które stały się pierwszymi przedstawicielami grupy syntetycznych katynonów. W 1928 roku zsyntetyzowano metkatynon (efedron), a rok później mefedron [Prosser i Nelson, 2012]. Wiele otrzymanych pochodnych katynonu badano pod kątem ich wykorzystania w medycynie, jednak w większości albo nie weszły one do lecznictwa, np. MDPV opatentowany w 1969 roku przez firmę Boeringer Ingelheim jako potencjalny lek analeptyczny [USPO, 1969], lub zostały z niego wycofane ze względu na potencjał uzależniający i wykazywanie działań niepożądanych, m.in. metkatynon stosowany jako lek przeciwdepresyjny w ZSRR [Prosser i Nelson, 2012] lub analeptyk w Stanach Zjednoczonych [Simmons i wsp., 2018], pirowaleron w leczeniu chronicznego zmęczenia lub jako lek zmniejszający apetyt [Corkery i wsp., 2018; EMCDDA, 2012], czy amfepramon w krótkotrwałym leczeniu otyłości w Niemczech i Danii [Europejska Agencja Leków, 2023]. Obecnie jedynym syntetycznym katynonem stosowanym jako lek jest bupropion wskazany w leczeniu depresji, otyłości i uzależnienia od nikotyny [Naglich i wsp., 2019].

Pierwsze doniesienia o stosowaniu syntetycznych katynonów w celach rekreacyjnych na szerszą skalę pojawiły się w latach 90. XX w. i dotyczyły zażywania metkatynonu w krajach byłego ZSRR, a następnie w Stanach Zjednoczonych [Prosser i Nelson, 2012; Simmons i wsp., 2018]. W połowie pierwszej dekady XXI wieku, dostępność i czystość MDMA – psychoaktywnego składnika tzw. tabletek „ecstasy”, gwałtownie spadły w wyniku wzmocnienia międzynarodowej kontroli zarówno prekursorów MDMA jak i gotowego produktu. W odpowiedzi na zapotrzebowanie na związki psychostymulujące zaczęto oferować związki należące do grupy syntetycznych katynonów [EMCDDA, 2013]. W 2005 roku do Europejskiego Systemu Wczesnego Ostrzegania został zgłoszony pierwszy syntetyczny katynon – metylon. W 2007 roku na europejskim rynku pojawił się mefedron, a rok wcześniej w Japonii zidentyfikowano po raz pierwszy 3,4-metylenodioksypirwaleron – MDPV [Zawilska i Wojcieszak, 2017]. Następnie MDPV rozprzestrzenił się w USA i w wielu krajach Europy, w tym w Polsce, stając się jednym z najczęściej wykrywanych na świecie składników „dopalaczy” [Zawilska i Wojcieszak, 2013], znanym pod nazwami *Magic*, *Super Coke*, *Peevee*, *New Ivory Wave* [Zawilska i Wojcieszak i wsp., 2017]. Wymienione katynony początkowo były sprzedawane jako MDMA lub amfetamina, po pewnym czasie promowano je jako „ecstasy” nowego typu, aby wreszcie prowadzić otwartą sprzedaż na szeroką skalę, co przyczyniło się do rozwoju ery „dopalaczy” [EMCDDA, 2013]. Co więcej, niektóre syntetyczne katynony nie służyły jedynie jako tymczasowe zamienniki dla klasycznych narkotyków, ale zyskały popularność wśród użytkowników i utrzymują się na rynku do dziś, np. mefedron [EMCDDA, 2024], aczkolwiek większość, w tym MDPV, traciła na popularności po ujęciu ich w wykazach substancji kontrolowanych [Zawilska i Wojcieszak, 2017]. Wraz z końcem 2023 roku EMCDDA monitorowało 167 syntetycznych katynonów, co czyni je drugą co do liczebności grupę NPS [EMCDDA, 2024].

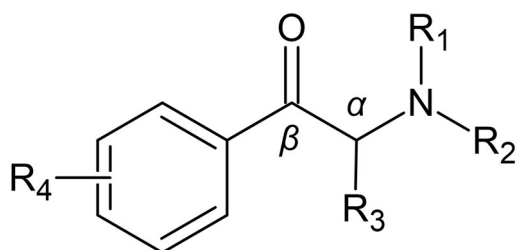
Obecnie syntetyczne katynony stanowią prawdopodobnie najczęściej zażywaną grupę „dopalaczy” w Polsce. Według danych epidemiologicznych, opublikowanych przez Główny Inspektorat Sanitarny (GIS), syntetyczne katynony zostały wykryte w 75% wszystkich badanych próbek NPS [GIS, 2019]. W 2023 roku GIS wydał ostrzeżenie publiczne w związku ze wzrostem liczby

zgonów spowodowanej zażyciem syntetycznych katynonów: 3-chlorometkatynonu (3-CMC) i 4-chlorometkatynonu (4-CMC) [GIS, 2023]. Co więcej, w Polsce w ostatnich latach wykrywa się największą liczbę nielegalnych laboratoriów syntetyzujących katynony w Europie. Tradycyjnie większość nowych substancji psychoaktywnych wykrywanych w Europie pochodzi z Chin i Indii. Trend ten jednak zaczął się zmieniać po 2020 roku; zarówno liczba likwidowanych laboratoriów w Europie jak i konfiskowanych prekursorów zwiększa się. W 2020 roku zlikwidowano 15 nielegalnych laboratoriów chemicznych – 2 w Holandii i 13 w Polsce [EMCDDA, 2022]. Podobnie w 2021 roku zlikwidowano 15 tego typu laboratoriów w Europie z czego 1 znajdowało się w Holandii a 14 w Polsce [EMCDDA, 2023]. Natomiast w 2022 roku liczba zlikwidowanych miejsc nielegalnej produkcji wzrosła do 29, z czego 6 na terenie Holandii i aż 23 na terenie Polski. Co więcej, ponad połowa, 355 kg z 558 kg, prekursorów syntetycznych katynonów została skonfiskowana w Polsce [EMCDDA, 2024]. Wysoka liczba wykrytych laboratoriów oraz prekursorów świadczy o istotnej roli Polski w produkcji syntetycznych katynonów w Europie [EMCDDA, 2024].

Syntetyczne katynony mają ugruntowaną pozycję na rynku europejskim. W 2022 roku wysoką popularnością odznaczały się 3-metylometkatynon (3-MMC), 2-metylometkatynon (2-MMC) i 3-CMC, które skonfiskowano w znacznych ilościach. Począwszy od tego samego roku odnotowuje się również wzrost ilości produktów oznaczonych jako MDMA fałszowanych syntetycznymi katynonami, zazwyczaj 4-CMC, 3-MMC, 4-metylometkatynonem (4-MMC) lub dipentylonem [EMCDDA, 2023; EMCDDA 2024]. Proceder ten dotyczy też kokainy [Fabregat-Safont i wsp., 2021]. Dlatego trudno dokonać jednoznacznej oceny rzeczywistego rozpowszechnienia syntetycznych katynonów, a skala ich zażywania prawdopodobnie jest niedoszacowana. O powszechności zażywania syntetycznych katynonów na świecie można wnioskować na podstawie przypadków udokumentowanych zatruc i zgonów po ich zażyciu, jak i szacując ich obecność w środowisku przy pomocy jakościowej i ilościowej analizy ścieków [Fabregat-Safont i wsp., 2021] lub zawartości zużytych strzykawek [EMCDDA, 2024].

### 1.2.2. Budowa i mechanizm działania syntetycznych katynonów

Syntetyczne katynony stanowią  $\beta$ -keto analogi amfetaminy i jej pochodnych [Glennon i wsp., 2014; Simmler i wsp., 2013], bądź inaczej  $\beta$ -keto fenyloetyloaminy (2-amino-1-fenylpropanonu) [Kolanos i wsp., 2013; Paillet-Loilier i wsp., 2014]. Ogólny wzór strukturalny syntetycznych katynonów [Ryc. 1] przedstawia możliwe sposoby rozmieszczenia podstawników. Mogą one znajdować się w czterech pozycjach cząsteczki katynonu: przy atomie azotu ( $R_1$ ,  $R_2$ ), przy atomie węgla połączonym z atomem węgla w pozycji  $\alpha$  ( $R_3$ ) i przy grupie fenylowej ( $R_4$ ), co umożliwia syntezę wielu różnorodnych pochodnych. Podstawniki mogą stanowić m.in. grupy alkilowe, alkoksylowe, alkilenodksylowe, halogenoalkilowe, halogenowe i fenyłowe [Gonçalves i wsp., 2021; Paillet-Loilier i wsp., 2014].

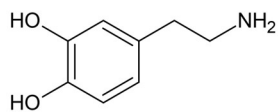


Ryc. 1. Ogólny wzór strukturalny pochodnych katynonu z uwzględnieniem możliwej lokalizacji podstawników.

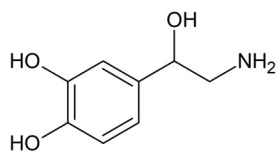
Syntetyczne katynony wykazują analogiczne działanie do klasycznych narkotyków należących do grupy psychostymulantów – metamfetaminy i kokainy lub empatogenów – MDMA [Eshleman i wsp., 2017]. Mechanizm działania syntetycznych katynonów wynika z ich podobieństwa strukturalnego do neuroprzekaźników monoaminergicznycy: dopaminy, noradrenaliny i serotoniny [Ryc. 2].



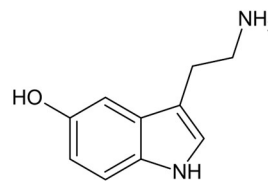
### Neuroprzekaźniki



Dopamina

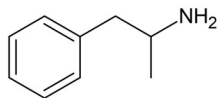


Noradrenalina

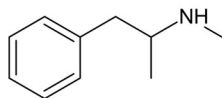


Serotonina

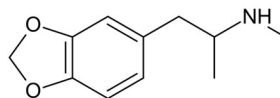
### Klasyczne związki psychostymulujące



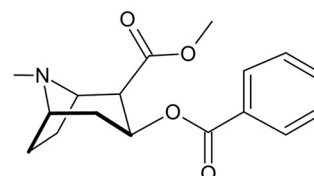
Amfetamina



Metamfetamina

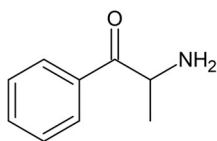


MDMA

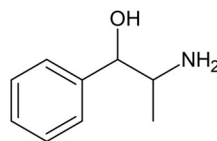


Kokaina

### Katynony *Catha edulis*

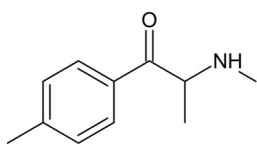


Katynon

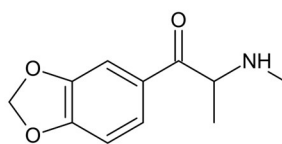


Katyna

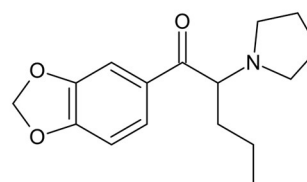
### Syntetyczne katynony



Mefedron



Metylon



MDPV

Ryc. 2. Wzory strukturalne neuroprzekaźników monoaminergicznych, klasycznych związków psychostymulujących oraz związków należących do grupy katynonów.

Podstawowym mechanizmem działania syntetycznych katynonów jest kokainopodobne hamowanie wychwytu zwrotnego neuroprzekaźników poprzez inhibicję odpowiednich białek transportujących dopaminę (ang. *dopamine transporter*, DAT), serotoninę (ang. *serotonin transporter*, SERT) i noradrenalinę (ang. *norepinephrine transporter*, NET) [Cameron i wsp., 2013; Eshleman i wsp.,

2017]. Białka te należą do rodziny białek transportujących SLC6 (ang. *solute carrier 6*). Ulegają one ekspresji w błonie komórkowej neuronów syntetyzujących wymienione neuroprzekaźniki monoaminowe i odpowiadają za wychwyt zwrotny uprzednio uwolnionych neuroprzekaźników do cytoplazmy neuronu presynaptycznego [Baumann i wsp. 2018]. Ten rodzaj transportu zachodzi w synapsach z dużą szybkością, zapewniając niemal natychmiastową odpowiedź. Zależy on od gradientu stężeń jonów sodu po obu stronach błony komórkowej neuronu, a białka stanowią kotransportery  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  [Jayaraman i wsp., 2021; Pramod i wsp., 2013].

Niektóre syntetyczne katynony mogą pełnić także rolę substratów dla transporterów, podobnie jak metamfetamina. W tym przypadku uwolnienie przekaźników monoaminowych odbywa się w sposób niezależny od egzocytozy. Po przyłączeniu się do białka transportującego syntetyczne katynony są translokowane przez kanał transportera do cytoplazmy neuronu, gdzie przy udziale pęcherzykowego transportera monoamin typu drugiego (ang. *vesicular monoamine transporter 2*, VMAT2) są przenoszone do wnętrza pęcherzyków synaptycznych, uniemożliwiając tym samym magazynowanie w nich monoamin. Dochodzi do postępującego wzrostu stężenia monoamin w cytozolu. W sytuacji, gdy stężenie monoamin w cytozolu jest wyższe od stężenia pozakomórkowego, w procesie odwróconego transportu są one przenoszone przez DAT, SERT i NET do szczeliny synaptycznej [Cameron i wsp., 2013; Baumann i wsp., 2018; Eshleman i wsp. 2013; Jitcá i wsp., 2021].

Niezależnie od mechanizmu molekularnego efektem działania wszystkich syntetycznych katynonów wchodzących w interakcje z transporterami jest znaczne zwiększenie stężenia neuroprzekaźników w szczeliny synaptycznej, co prowadzi do nasilenia impulsacji monoaminergicznej w mózgu [Baumann i wsp., 2018, Eshleman i wsp., 2017]. Mechanizm działania syntetycznych katynonów nie ogranicza się do interakcji z transporterami monoamin. Mogą one też wiązać się z różnymi receptorami. Niektóre syntetyczne katynony wykazują istotne powinowactwo do receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych i serotoninowych, m.in. 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> [Simmler i wsp., 2013; Simmler i wsp., 2014]. W odróżnieniu od pochodnych amfetaminy, syntetyczne katynony, np. mefedron i MDPV, mogą pobudzać receptory dopaminowe, zwiększając pobudzenie

psychoruchowe i działanie uzależniające [Ciudad-Roberts i wsp., 2015; Seaman i wsp., 2021; Wojcieszak i wsp., 2020]. Co więcej, mogą nasilać neuroprzeżyźnienie z większą siłą niż inne związki psychostymulujące. Syntetyczne katynony wykazują bardzo niskie powinowactwo do receptorów dla amin śladowych (ang. *trace amine-associated receptor 1*, TAAR1), których pobudzenie przez metamfetaminę, MDMA czy kokainę może powodować autoinhibicję przeżyźnienia dopaminergicznego i serotonergicznego [Achat-Mendes i wsp., 2012].

Mechanizm działania syntetycznych katynonów zależy od ich budowy cząsteczkowej. Syntetyczne katynony należące do grupy pirowaleronów ( $\alpha$ -pirolidynofenonów) charakteryzują się obecnością pierścienia pirolidynowego zamiast I- lub II-rzędowej grupy aminowej, oraz wydłużonym łańcuchem w pozycji  $\alpha$ . MDPV [Ryc. 2] jest modelowym przedstawicielem tej grupy [Zawilska i Wojcieszak, 2017; Paillet-Loilier i wsp., 2014].

Pierścień pirolidynowy nadaje cząsteczce MDPV wysoką lipofilowość, dzięki czemu powinna ona teoretycznie z łatwością przenikać barierę krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB), co potwierdziły badania *in vitro* [Simmler i wsp., 2013]. Jednakże izolowane warunki *in vitro* mogą nie oddawać złożoności tego procesu. Badania przeprowadzone *in vivo* oceniające stężenie wybranych syntetycznych katynonów w kresomózgowiu szczurów po podaniu dootrzewnowym wskazują, iż zdolność przenikania BBB wzrasta wraz ze wzrostem polarności cząsteczki. Sugeruje to, iż syntetyczne katynony mogą być transportowane przez BBB głównie przy pomocy białek nośnikowych, a w mniejszym stopniu poprzez dyfuzję bierną, tak jak ma to miejsce w przypadku kokainy [Fabregat-Safont i wsp., 2021]. Badania *in vitro* i *in vivo* sugerują, iż transport kokainy przez BBB odbywa się przy udziale antyportera protonowo-kokainowego niezależnego od jonów sodu. MDPV wykazuje powinowactwo wobec transportera dla kokainy i prawdopodobnie stanowi również jego substrat [Chapy i wsp., 2015]. Aktywny transport pirowaleronów przez BBB zapewnia osiągnięcie wyższych stężeń w OUN niż we krwi [Wojcieszak i wsp., 2016].

MDPV jest związkiem o bardzo wysokim powinowactwie do DAT i charakteryzującym się długim działaniem [Eshleman i wsp., 2013; Kolanos

i wsp., 2013]. Właściwości te są warunkowane przez kilka elementów budowy strukturalnej. Kluczowe znaczenie ma obecność łańcucha propylowego w pozycji  $\alpha$  łańcucha bocznego, który zapewnia cząsteczce MDPV wysokie powinowactwo do DAT [Kolanos i wsp., 2013]. Wykazano, iż bardzo wysokie powinowactwo do DAT posiadają związki o łańcuchu alifatycznym zawierającym od 3 do 6 atomów węgla [Eshleman i wsp., 2019]. Obserwacja ta jest zgodna z opiniami użytkowników, według których katynony o 3-węglowym łańcuchu alifatycznym takie jak MDPV,  $\alpha$ -PVP lub pentylon wykazują najsilniejsze działanie, dlatego są stosowane w niskich dawkach. Jeżeli łańcuch ten zostanie skrócony lub wydłużony, przyjmowana dawka jest wyższa [Fabregat-Safont i wsp., 2021]. Równie istotna jest obecność pierścienia pirolidynowego, stanowiącego aminę III-rzędową zwiększającą powinowactwo do DAT, w porównaniu do podstawników będących aminą II- lub I-rzędową [Kolanos i wsp., 2013]. Podstawienie pierścienia fenylowego grupą 3,4-metylenodioksy może wprowadzić zwiększenie powinowactwo do DAT i SERT, ale nie przekłada się ono istotnie na efekty działania związku [Eshleman i wsp., 2017; Kolanos i wsp., 2013; Rickli i wsp., 2015]. Podstawnik ten decyduje o długotrwałym działaniu farmakologicznym MDPV, ale, co ciekawe, zmniejsza przenikanie przez BBB [Chapy i wsp., 2015]. Zazwyczaj podstawniki decydujące o właściwościach hamujących DAT, zmniejszają lub znoszą aktywność wobec SERT [Glennon i Dukat, 2017]. MDPV jest wysoce selektywny względem DAT, wykazuje umiarkowane powinowactwo wobec NET, a jego powinowactwo do SERT jest znikome [Eshleman i wsp., 2013].

Stosunek inhibicji DAT/SERT decyduje o potencjale uzależniającym związku, jego profilu psychofarmakologicznym i sile działania, a tym samym o stosowanej dawce. Substancje o niskim współczynniku DAT/SERT ( $< 0,1$ ) działają empatogennie, natomiast te o wysokim współczynniku ( $> 10$ ) wykazują silny efekt psychostymulujący i obarczone są wysokim ryzykiem rozwoju uzależnienia [Luethi i Liechti, 2020]. Dopamina jest głównym neuroprzekaźnikiem w układzie nagrody, odpowiedzialnym za rozwój uzależnienia [Koob i Volkow, 2016], a DAT odznaczają się szczególnie gęstym rozmieszczeniem na zakończeniach aksonów neuronów jądra półleżącego przegrody (łac. *nucleus accumbens*; NAc), gdzie związki psychostymulujące wywierają swoje działanie

[Rodriguez i wsp., 2011]. Wysoka siła inhibicji DAT i NET przez związki psychostymulujące uzyskana w badaniach *in vitro* pozwala przewidywać, że związki te działają psychostymulująco już w niskich dawkach. Dla związków hamujących SERT zależność ta jest odwrotna [Luethi i Liechti, 2018]. MDPV jest jednym z najbardziej wybiórczych związków względem DAT. Współczynnik inhibicji DAT/SERT dla MDPV wyznaczony przez Simmlera i wsp. (2013) w warunkach *in vitro* na transfekowanych transporterami monoamin komórkach HEK 293 wynosi ponad 100, co oznacza, że jest on wyższy niż w przypadku klasycznych narkotyków. Dla porównania, współczynnik DAT/SERT dla amfetaminy i metamfetaminy wynosi ponad 10, a dla MDMA 0,08 [Simmler i wsp., 2013]. MDPV wykazuje też wyższe od amfetaminy, metamfetaminy i MDMA powinowactwo do NET [Simmler i wsp., 2013]. Baumann i wsp. (2017) wykorzystując szczurze synaptosomy określili współczynnik DAT/SERT dla MDPV jako 816,82, dla amfetaminy jako 36,7, a kokainy – 1,48.

Podsumowując, MDPV jest bardzo silnym inhibitorem wychwytu zwrotnego amin katecholowych, lecz podobnie jak inne katynony należące do grupy pirowaleronów, nie wpływa na ich uwalnianie z neuronów. MDPV nie wywiera istotnego wpływu na przekaźnictwo serotonergiczne [Baumann i wsp., 2013; Eshleman i wsp., 2013, Simmler i wsp., 2013].

Cząsteczka MDPV posiada centrum chiralności, co oznacza, że istnieją dwa enancjomery – *R*(+)-MDPV i *S*(-)-MDPV. W „dopalaczach” i materiale biologicznym wykrywana jest forma racemiczna (*R,S*)-MDPV. W warunkach *in vivo* enancjomery MDPV nie przekształcają się w siebie wzajemnie [Hambuchen i wsp., 2017]. Obie formy MDPV wykazują aktywność biologiczną, jednak enancjomer *R*(+)-MDPV charakteryzuje najwyższa siła działania, dlatego większość efektów neurochemicznych i behawioralnych MDPV w formie racemicznej wynika z jego aktywności [Gannon i wsp., 2016; Kolanos i wsp., 2015]. Enancjomer *S*(-) MDPV wykazuje bardzo niską aktywność, np. pomimo iż jest preferowany przez myszy w porównaniu do soli fizjologicznej, to nie wywołuje wzrostu aktywności motorycznej [Gannon i wsp., 2016]. Biodostępność (*R,S*)-MDPV po podaniu dootrzewnowym jest zależna od płci – u samców szczurów jest większa niż u samic, co może tłumaczyć

znacząco wyższe pobudzenie lokomotoryczne u samców [Hambuchen i wsp., 2017].

### **1.2.3. Właściwości fizykochemiczne MDVP i sposoby jego przyjmowania**

Syntetyczne katynony są dostępne pod postacią białego, żółtawego lub brązowego krystalicznego proszku, dlatego sprzedawane są pod nazwą „soli do kąpiel” ewentualnie „odżywek do roślin” [Gonçalves i wsp., 2021]. MDPV w formie wolnej zasady ma postać amorficznego brązowego lub żółto-zielonego proszku, podczas gdy jego chlorowodrek jest higroskopijnym proszkiem o brązowo-białej barwie [EMCDDA, 2014]. Proszek ten jest zazwyczaj przyjmowany na błonę śluzową nosa, rzadziej doustnie – zawinięty w cienką bibułkę, tzw. „bombing”, lub w formie tabletek/kapsułek, może być także rozpuszczony w płynach. Mniej popularne drogi podania obejmują wstrzyknięcia podskórne, domięśniowe bądź dożylnie, wlewki doodbytnicze lub wcieranie w gałkę oczną, tzw. „eyeballing”, lub dziąsła [Prosser i Nelson, 2012; Zawilska i Wojcieszak, 2013]. Wielkość przyjmowanej dawki zależy od danego związku, oczekiwanej przez użytkowników siły działania oraz ich wcześniejszego doświadczenia. MDPV najczęściej przyjmowany jest doustnie lub donosowo [Zawilska i Wojcieszak, 2017]. Efekty psychostymulujące MDPV występują już przy niskich dawkach rzędu 1-6 mg, przy czym dawka donosowa mieści się w przedziale 1-20 mg (zwykle 5-11 mg), a doustna – 2-25 mg (zwykle 8-15 mg) [Erowid, 2013]. W celu uzyskania zarówno szybkich jak i długotrwałych efektów często łączone są różne drogi podania [EMCDDA, 2014]. Należy jednak uwzględnić fakt, iż produkty zawierające syntetyczne katynony sprzedawane nawet pod tą samą nazwą mogą różnić się składem jakościowym i ilościowym [Araújo i wsp., 2015]. Często nie zawierają jedynie deklarowanego na etykiecie syntetycznego katynonu, ale stanowią mieszaninę różnych syntetycznych katynonów lub innych związków aktywnych, które mogą naśladować ich działanie, m.in. kofeiny, benzokainy czy lidokainy [Gonçalves i wsp., 2021; Marinetti i Antonides, 2013]. Dodatkowo w ich skład mogą wchodzić substancje wypełniające lub pozostałe po syntezie zanieczyszczenia [Gonçalves i wsp., 2021], mogące zwiększać toksyczność. Ze względu na dużą siłę działania istnieje wysokie ryzyko nieświadomego przedawkowania MDPV. Szczególnie, że niektóre opakowania „dopalaczy” zawierają nawet 500 mg

MDPV, a sugerowana dawka na etykiecie może być zawyżona do 50 mg [Zawilska i Wojcieszak, 2013]. W zależności od drogi podania początek działania MDPV występuje w ciągu 5-30 minut, a efekty działania utrzymują się od 2 do 7 godzin [EMCDDA, 2014].

#### **1.2.4. Metabolizm MDPV**

Metabolizm MDPV przebiega w sposób typowy dla syntetycznych katynonów i związków posiadających grupę metylenodioksy, np. MDMA i MDA (3,4-metylenodioksyamfetamina). Uczestniczą w nim liczne izoenzymy mikrosomalne cytochromu P450 (CYP) wątroby, w szczególności CYP2D6, ale też CYP2C19 czy CYP1A2. W pierwszym etapie zachodzi otwarcie pierścienia metylenodioksy, a następnie jego O-demetylacja, co prowadzi do utworzenia katecholopirowaleronu (3,4-dihydroksypirowaleronu; HHPV), który ulega metylacji preferencyjnie w pozycji 3 przy udziale katecholo-O-metylotranferazy dając metylokatecholopirowaleron (4-hydroksy-3-metoksy-pirowaleron; HMPV). Nie stwierdzono obecności metabolitów hydroksylowanych czy deaminowanych. Przeważająca ilość MDPV pozostaje w postaci niezmienionej [Strano-Rossi i wsp., 2010]. HHPV ma zbliżony profil działania do MDPV, z podobną siłą hamuje DAT i NET oraz jest pozbawiony aktywności wobec SERT. Metylacja HHPV do HMPV skutkuje znacznym zmniejszeniem aktywności wobec DAT i NET. HMPV stanowi główny metabolit MDPV wykrywany w moczu. Jednak powstałe metabolity ulegają intensywnemu sprzęganiu z resztami kwasu siarkowego i glukuronowego w procesach II fazy, dlatego też ich farmakologiczna aktywność *in vivo* jest nieistotna, pomimo długiego okresu półtrwania. Za efekty behawioralne odpowiada jedynie MDPV, a nie jego metabolity [Anizan i wsp., 2016; Concheiro i wsp., 2022; Luethi i wsp., 2019].

#### **1.2.5. Efekty działania MDPV na modelach zwierzęcych**

Efekty behawioralne wywoływane przez MDPV zostały obszernie przebadane na modelach mysim i szczurzym. Aktywność ruchowa jest warunkowana pobudzeniem receptorów D1-dopaminowych przez MDPV [Wojcieszak i wsp., 2020]. MDPV powoduje zależny od czasu i dawki wzrost spontanicznej aktywności lokomotorycznej horyzontalnej i wertykalnej.

Pobudzenie występuje w zakresie dawek 0,5-30 mg/kg po podaniu dootrzewnowym lub podskórnym, a początek działania pojawia się natychmiast po podaniu. Krzywa zależności stopnia pobudzenia ruchowego od dawki MDPV przybiera kształt odwróconej litery „U”. Aktywność lokomotoryczna wzrasta wraz ze wzrostem dawki aż do osiągnięcia maksymalnego pobudzenia. Przy stosowaniu wysokich dawek występuje spadek aktywności lokomotorycznej spowodowany nasilonymi ruchami stereotypowymi charakterystycznymi dla związków psychostymulujących, tj. powtarzaniem potrząsaniem i obracaniem głowy, lizaniem, węszeniem i gryzieniem, w tym skutkującym samouszkodzeniem z towarzyszącym krwawieniem [Aarde i wsp., 2013; Berquist i wsp., 2016; Marusich i wsp., 2012; Huang i wsp., 2012, Fantegrossi i wsp., 2013; Gatch i wsp., 2013; Wojcieszak i wsp., 2020]. Pobudzenie psychomotoryczne jest silniejsze po zastosowaniu MDPV niż w przypadku metamfetaminy [Aarde i wsp., 2013], MDMA [Fantegrossi i wsp., 2013] i kokainy [De-Giorgio i wsp., 2019]. MDPV wywołuje większą agresję u myszy niż kokaina. Siła odpowiedzi agresywnej wzrasta po wielokrotnym podaniu MDPV [De-Giorgio i wsp., 2019].

Właściwości uzależniające MDPV wykazano w badaniach behawioralnych: warunkowanej preferencji miejsca [Karlsson i wsp., 2014], sensytyzacji lokomotorycznej [Berquist i wsp., 2016] i samopodawania [Aarde i wsp., 2013; Gatch i wsp., 2013; Geste i wsp., 2018].

#### **1.2.6. Efekty działania syntetycznych katynonów u ludzi**

Oczekiwane przez użytkowników efekty działania syntetycznych katynonów obejmują: pobudzenie psychoruchowe, poczucie przyływu energii, zmniejszenie apetytu i potrzeby snu, wzrost czujności i empatii, otwartość, łatwiejsze nawiązywanie nowych kontaktów towarzyskich, wielomówność, podwyższony nastrój i euforię [Baumann i wsp., 2013; Baumann i wsp., 2018; Daziani i wsp., 2023; Prosser i Nelson, 2012].

Zażycie syntetycznych katynonów w dużej dawce bądź ich regularne stosowanie może prowadzić do wystąpienia licznych działań toksycznych. Przeważają objawy ze strony układu nerwowego i sercowo-naczyniowego, które można zaklasyfikować do objawów toksydromu sympatykomimetycznego



i/lub halucygenego [Daziani i wsp., 2023; Froberg i wsp., 2015; Marinetti i Antonides, 2013]. Listę najważniejszych objawów zatrucia przedstawia Tabela I [Borek i Holstege, 2012; Daziani i wsp., 2023; EMCDDA, 2014; Froberg i wsp., 2015; Marinetti i Antonides, 2013; Paillet-Loilier i wsp., 2014, Riley i wsp., 2020].

Tabela I *Działania niepożądane syntetycznych katynonów*

<b>Wpływ na</b>	<b>Objawy</b>
układ nerwowy	bóle i zawroty głowy, bezsenność, dreszcze, drgawki, hipertermia, zaburzenia widzenia, rozszerzenie źrenic, parestezje, hipertermia, encefalopatia, udar krwotoczny mózgu, śpiączka
psychikę	drażliwość, agresja, lęk, napady paniki, myśli samobójcze, depresja, epizody psychotyczne, omamy
funkcje poznawcze	splątanie, dezorientacja, długotrwałe osłabienie pamięci, gonitwa myśli
układ sercowo-naczyniowy	tachykardia, kołatanie serca, nadciśnienie tętnicze, nagły skurcz naczyń wieńcowych, zatrzymanie akcji serca, rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe
układ moczowy	ostra niewydolność nerek
układ pokarmowy	nudności/wymioty, anoreksja
układ mięśniowy	drżenia mięśniowe, mioklonie, rabdomioliza, bruksizm
układ oddechowy	przyspieszenie oddechu

Ostre przedawkowanie MDPV manifestuje się najczęściej hipertermią, rabdomiolizą, hiponatremią, kwasicą i drgawkami. W ciężkich przypadkach może dojść do udaru krwotocznego i obrzęku mózgu, zapaści krążeniowo-oddechowej, zawału serca, niewydolności wielonarządowej [Froberg i wsp., 2015; Paillet-Loilier i wsp., 2014]. Zażywanie syntetycznych katynonów w sesjach, tj. przez 2-3 kolejne dni, może doprowadzić do rozwoju zagrażającego życiu zespołu majaczeniowego z towarzyszącym pobudzeniem (ang. *excited delirium syndrome*) [Paillet-Loilier i wsp., 2014, Penders i wsp., 2012]. Objawy kliniczne zespołu rozwijają się nagle i obejmują: dziwne i agresywne zachowanie, krzyk, paranoję, napady paniki, samouszkodzenia, akty przemocy fizycznej i nadspodziewaną siłę fizyczną. U pacjentów rozwija się hipertermia, odwodnienie, rabdomioliza i niewydolność nerek. Zgon następuje zazwyczaj z powodu depresji oddechowej lub silnej arytmii serca. Zespół ten diagnozuje się po zażyciu wysokich dawek substancji zwiększających przewodność dopaminergiczną, szczególnie często odnotowywany jest przy zatruciu kokainą [Penders i wsp., 2012, Takeuchi i wsp., 2011].

Obecnie nie istnieje specyficzna odtrutka, która mogłaby być zastosowana w zatruciach syntetycznymi katynonami, dlatego leczenie jest jedynie objawowe [Paillet-Loilier i wsp., 2014]. Nie istnieje też żaden zarejestrowany lek, który byłby wskazany w leczeniu uzależnienia od związków psychostymulujących [Galaj i Xi, 2019].

Dane kliniczne wskazują, iż zażywanie MDPV jest obarczone bardzo wysokim ryzykiem wystąpienia zagrażających życiu powikłań zdrowotnych. MDPV został wykryty we krwi i moczu wielu pacjentów w Europie i Stanach Zjednoczonych, którzy byli hospitalizowani z powodu przedawkowania „soli do kąpielii” lub przedawkowanie skutkowało zgonem, w tym samobójstwem [Baumann i wsp., 2017; Marinetti i Antonides, 2013; Marusich i wsp., 2012]. Użytkownicy MDPV są silnie pobudzeni, stają się agresywni i dokonują aktów przemocy fizycznej częściej niż po zażyciu klasycznych narkotyków psychostymulujących [EMCCDA, 2014]. Zażywanie MDPV szczególnie często prowadzi do wystąpienia objawów takich jak agresja, omamy i paranoja [Marusich i wsp., 2012]. Wielu pacjentów po detoksykacji wymaga dalszego leczenia na oddziale psychiatrycznym [Baumann i wsp., 2017; Froberg i wsp.,

2015]. MDPV należy również do syntetycznych katynonów, które najczęściej powodują wystąpienie objawów zatrucia związanych z toksycznością wobec komórek nerwowych mózgu [Daziani i wsp., 2023].

### **1.2.7. Neurotoksyczność *in vivo* i *in vitro* syntetycznych katynonów i klasycznych związków psychostymulujących**

Długotrwałe zażywanie syntetycznych katynonów prowadzi do uzależnienia i wystąpienia objawów odstawiennych. Niektóre objawy neuropsychiatryczne mogą się utrzymywać po zaprzestaniu ich stosowania np. uporczywe obniżenie nastroju, a także upośledzenie funkcji kognitywnych [Homman i wsp., 2018], czy pamięci roboczej i epizodycznej [Freeman i wsp., 2012], zależnych od funkcjonowania wyspecjalizowanej struktury mózgowej – hipokampa. Pomimo szerokiego rozpowszechnienia syntetycznych katynonów i licznych przypadków wystąpienia efektów toksycznych ze strony OUN, dysponujemy niewielką liczbą badań dotyczących neurotoksyczności syntetycznych katynonów *in vivo*. Wiadomo, że powodują one zaburzenia funkcji poznawczych i pamięci u gryzoni w wyniku podania w okresie dorosłości [Bernstein i wsp., 2020; den Hollander i wsp., 2013; Marszałek-Grabska i wsp. 2022; Sewalia i wsp., 2018] i adolescencji [Daniel i Hughes, 2016; López-Arnau i wsp., 2014; López-Arnau i wsp., 2015; Motbey i wsp., 2012], lecz długotrwałe następstwa ekspozycji na syntetyczne katynony w okresie wczesnego rozwoju OUN są bardzo słabo poznane. Wobec powyższych obserwacji szczególnie niepokojące są doniesienia o zażywaniu syntetycznych katynonów przez kobiety w ciąży [Adamowicz i Hydzik, 2019; Gómez-Ruiz i wsp., 2022; Pichini i wsp., 2014].

Szkodliwy wpływ klasycznych związków psychostymulujących na procesy poznawcze i pamięć zaobserwowano u niemowląt i dzieci, których matki zażywały narkotyki w trakcie ciąży. U noworodków zmiany neurobehawioralne manifestują się słabą odpowiedzią na bodźce i zwiększonym poziomem stresu, a u dzieci i nastolatków niższym ilorazem inteligencji, problemami z utrzymaniem uwagi i ukończeniem rozpoczętych zadań, wolniejszym uczeniem się, osiąganiem słabszych wyników w nauce, zaburzeniami pamięci werbalnej i przestrzennej [Diaz i wsp., 2014; Jablonski i wsp., 2016]. Zmiany mają również

charakter organiczny. Mózgi dzieci przedszkolnych, których matki zażywały metamfetaminę podczas ciąży, cechowało zmniejszenie objętości, szczególnie w obszarach z wysoką liczbą neuronów dopaminergicznych, włącznie z hipokampem [Diaz i wsp., 2014; Jablonski i wsp., 2016].

Badania z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych wykazały, że MDPV przenika przez mysie łożysko a jego stężenie w mózgu płodu przewyższa stężenie w mózgu matki oraz wykazuje dłuższy okres półtrwania, narażając mózg płodu na dłuższą ekspozycję na związek. Ponadto MDPV uzyskuje wyższe stężenia w mózgu płodu niż inne syntetyczne katynony tj. mefedron czy metylon [Strange i wsp., 2017]. Obecnie nie ma dowodów, aby MDPV w znaczący sposób zaburzał rozwój cewy nerwowej u mysich embrionów [Gerecsei i wsp., 2019]. Jednak MDPV podawany samicom myszy C57BL/6J w okresie od 8 do 14 dnia ciąży, podczas którego rozwijają się pierwsze neurony dopaminergiczne, i który jest wczesnym etapem rozwoju układu limbicznego, spowodował u osesków w wieku 7 dni większą aktywność ruchową z częstą zmianą kierunku świadcząca o pobudzeniu psychoruchowym [Gerecsei i wsp., 2018]. Działanie neurotoksyczne MDPV może ujawnić się nawet po jednokrotnym podaniu. U 7-dniowych mysich osesków w ciągu 24 godzin po podaniu MDPV w dawce 10 mg/kg, nastąpiła neurodegeneracja wielu regionów mózgu odpowiadających za pamięć, w tym hipokampa. Apoptozą dotknięte zostało pole CA1 hipokampa, lecz nie zakręt zębaty hipokampa (ang. *dentate gyrus*, DG). Zmian tych nie zaobserwowano powtarzając procedurę u dorosłych zwierząt [Ádám i wsp., 2014]. Mimo, iż jednorazowe podanie MDPV nie spowodowało organicznych zmian w mózgu dorosłych myszy wiadomo, że chroniczna ekspozycja dorosłych szczurów na MDPV powoduje upośledzenie pamięci roboczej, przejawiające się zaburzeniami zdolności odróżniania nowego obiektu od poznanego wcześniej [Bernstein i wsp., 2020]. Obecnie nie przeprowadzono badań behawioralnych oceniających wpływ ekspozycji gryzoni na MDPV podczas rozwoju OUN na pamięć. Udowodniono natomiast neurotoksyczne działanie innych popularnych syntetycznych katynonów. Wielokrotne podanie mefedronu ciężarnym samicom myszy skutkuje upośledzeniem pamięci przestrzennej i referencyjnej testowanej u potomstwa po osiągnięciu wieku 60 dni [Naseri i wsp., 2018]. U szczurów w wieku adolescencji mefedron i metylon powodował

osłabienie pamięci referencyjnej testowanej tydzień po zaprzestaniu podawania związków [López-Arnau i wsp., 2014; López-Arnau i wsp., 2015]. Zaburzenia pamięci występują także u dorosłych zwierząt, które otrzymywały przewlekle syntetyczne katynony w okresie adolescencji. Wysokie dawki mefedronu powodują u szczurów upośledzenie zdolności rozpoznawania nowego obiektu [Motbey i wsp., 2012], a metylon zaburzenia roboczej pamięci przestrzennej [Daniel i Hughes, 2016].

Chociaż nie dysponujemy danymi dotyczącymi syntetycznych katynonów, udowodniono, że wczesna ekspozycja postnatalna na klasyczne związki psychostymulujące zaburza funkcje poznawcze i pamięć zwierząt laboratoryjnych w późniejszych okresach życia. W wielu procedurach związki te podawano w kluczowym okresie rozwoju hipokampa od 11 do 20 dnia po narodzeniu (ang. *postnatal day* 11-20, PD11-20). Wykazano, iż podawanie metamfetaminy myszom C57BL/6J w okresie PD11-20 skutkuje zaburzeniami pamięci w adolescencji i w dorosłości. Zaburzenia te obejmują upośledzenie pamięci rozpoznawczej, przestrzennej czy referencyjnej, przejawiające się spadkiem czasu eksploracji nowego obiektu, upośledzeniem rozpoznawania nowej lokalizacji obiektu, osłabieniem zdolności lokalizacji platformy ukrytej pod powierzchnią wody w labiryncie wodnym Morrisa (ang. *Morris water maze*, MWM), czy też brakiem preferencji wobec przebywania w kwadrancie, w którym uprzednio znajdowała się platforma [Acevedo i wsp., 2007; Siegel i wsp., 2011]. Zaburzenia pamięci w dorosłości zaobserwowano również u szczurów traktowanych metamfetaminą w wieku PD11-15. Wykazywały one zaburzenia pamięci przestrzennej i referencyjnej, o czym świadczy wolny postęp nauki położenia przestrzennego platformy w basenie w teście MWM, zarówno jej początkowej jak i nowej lokalizacji, a także trudności z zapamiętaniem drogi ucieczki z labiryntu wodnego Cincinnati [Vorhees i wsp., 2008]. Analogiczne zaburzenia pamięci przestrzennej występowały u szczurów, otrzymujących MDMA lub kokainę w okresie PD11-20 [Melnick i wsp., 2001; Skelton i wsp., 2008].

Do mechanizmów wywołujących zaburzenia poznawcze po ekspozycji prenatalnej na narkotyki o działaniu psychostymulującym, można zaliczyć spadek stężenia neuroprzekaźników w krótkim czasie po urodzeniu, zmiany

we wrażliwości receptorów dopaminowych i serotoninowych, zmiany w ekspresji transporterów dla monoamin, wzrost stężenia kortykosteroidów, ekscytotoksyczność i oksydacyjne uszkodzenia DNA [Jablonski i wsp., 2016; Skelton i wsp., 2008]. Ponadto, odnotowano zmiany w ekspresji białek oraz genów związanych z neurogenezą i plastycznością synaptyczną [Dong i wsp., 2018; Jalayeri-Darbandi i wsp., 2018; Seyedhosseini Tamijani i wsp., 2019; Zhao i wsp., 2015]. Skutkuje to spadkiem liczby nowopowstających neuronów w mózgu mysich lub szczurzych osesków traktowanych związkami psychostymulującymi w okresie rozwoju mózgu [Ismail i Bedi, 2007].

Badania *in vitro* wskazują, że uszkodzenia neuronów i upośledzenie ich funkcji wywierane przez syntetyczne katynony zachodzą według podobnych mechanizmów do tych opisanych dla klasycznych związków psychostymulujących [Valente i wsp., 2017b]. Dowiedziono, iż MDPV działa neurotoksycznie wobec ludzkiej linii komórkowej SH-SY5Y [Valente i wsp., 2017a; Valente i wsp., 2017b; Wojcieszak i wsp., 2016]. Niezróżnicowane komórki SH-SY5Y pod względem morfologicznym wykazują podobieństwo do niedojrzałych neuronów katecholaminergicznych, chociaż ze względu na niską aktywność enzymów synteza amin katecholowych jest ograniczona. W odpowiednich warunkach hodowli komórki SH-SY5Y mają zdolność do różnicowania się w komórki o fenotypie przypominającym dojrzałe neurony, np. dopaminergiczne, które posiadają wypustki zawierające synaptofizynę, oraz enzymy specyficzne dla neuronów dopaminergicznych, dopaminę i receptory dopaminowe oraz DAT [Kovalevich i Langford, 2013; Xie i wsp., 2010]. MDPV w sposób zależny od stężenia zmniejsza żywotność zarówno niezróżnicowanych komórek SH-SY5Y [Valente i wsp., 2017b; Wojcieszak i wsp., 2016] jak i zróżnicowanych o fenotypie dopaminergicznym, przy czym komórki zróżnicowane były bardziej wrażliwe na działanie cytotoksyczne związku [Valente i wsp., 2017b]. Mechanizm neurotoksyczności jest złożony. MDPV powoduje uszkodzenie błony komórkowej i nekrozę komórek jedynie w wysokich stężeniach, lecz przy niższych stężeniach obserwuje się zmniejszenie proliferacji komórek [Rosas-Hernandez i wsp., 2016]. MDPV zwiększa stres oksydacyjny powodując wzrost produkcji reaktywnych form tlenu i azotu, spadek produkcji zredukowanego glutationu i wzrost stężenia jego oksydowanej formy, upośledza

funkcjonowanie mitochondriów i uruchamia szlaki apoptotyczne. Ostatecznie, zmiany te skutkują autofagią lub apoptozą komórek SH-SY5Y [Rosas-Hernandez i wsp., 2016; Valente i wsp. 2017a; Valente i wsp., 2017b].

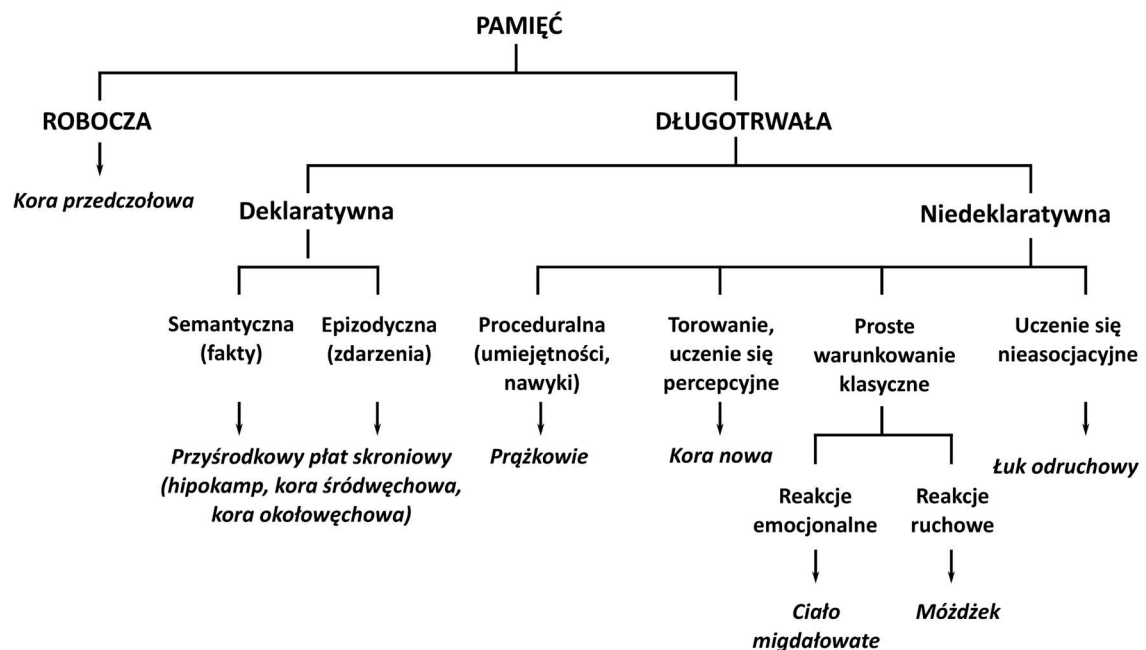
HHPV, jeden z metabolitów MDPV, powoduje zależne od stężenia i czasu ekspozycji efekty neurotoksyczne wobec komórek SH-SY5Y [Coccini i wsp., 2019; Wojcieszak i wsp., 2016], na które bardziej wrażliwe są komórki zróżnicowane od niezróżnicowanych [Coccini i wsp., 2019]. Natomiast nie zaobserwowano neurotoksycznego działania HMPV [Wojcieszak i wsp., 2016].

Dotychczas nie przeprowadzono badań nad wpływem MDPV na linie komórkowe hipokampa. Jednak istnieją dane dotyczące cytotoksycznego działania 3-fluorometkatynonu (3-FMC), który w sposób zależny od stężenia zmniejszał żywotność mysiej linii komórek hipokampa HT22, przypominających dzielące się neurony prekursorowe [Siedlecka-Kroplewska i wsp., 2014; Siedlecka-Kroplewska i wsp., 2018].

## 1.3. Hipokamp i jego rola w procesach pamięciowych

### 1.3.1. Rodzaje pamięci

U ssaków występuje wiele typów pamięci funkcjonujących równolegle i niezależnie od siebie, kontrolowanych przez różne struktury mózgowe [Ryc. 3]. W niektórych sytuacjach różne rodzaje pamięci mogą uzupełniać się wzajemnie dla optymalizacji zachowania, w innych mogą ze sobą konkurować [Squire i Dede, 2015].



Ryc. 3. Rodzaje pamięci i kontrolujące je struktury mózgowe [wg Squire i Dede, 2015; zmodyfikowano].

Dwa główne rodzaje pamięci stanowi pamięć długotrwała i pamięć robocza. Pamięć długotrwałą, w zależności od rodzaju dostępu do niej, można podzielić na pamięć deklaratywną i niedeklaratywną. Pamięć niedeklaratywna (nieświadoma) opiera się głównie na zbieraniu doświadczeń, które znajdują swoje odzwierciedlenie w zachowaniu i wykonywaniu określonych czynności bez konieczności świadomego przypominania sobie informacji. Obejmuje umiejętności i nawyki, proste formy warunkowania, torowanie i uczenie percepcyjne, w tym habituację i sensytyzację związaną z plastycznością behawioralną. Z kolei pamięć deklaratywna polega na gromadzeniu wiedzy, która może być świadomie przywoływana z „pokładów” pamięci długotrwałej jako



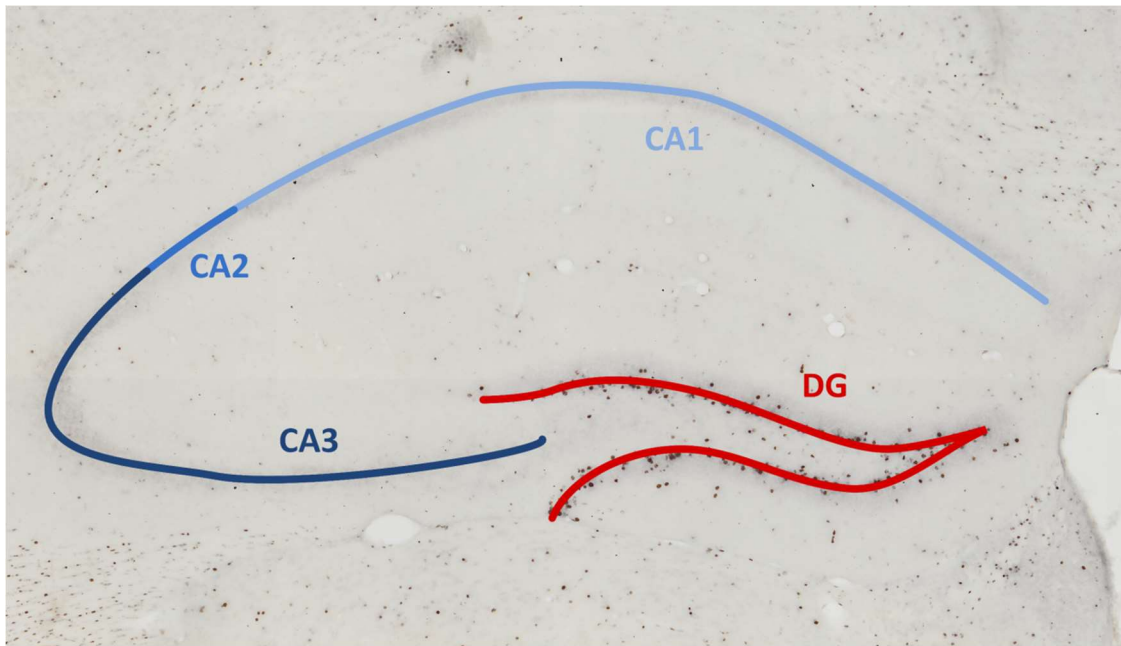
informacje werbalne lub niewerbalne. Wyróżnia się pamięć semantyczną, która opiera się na znajomości pojęć i faktów o świecie, oraz pamięć epizodyczną polegającą na zdolności do przywołania z pamięci konkretnych wydarzeń z życia i umiejscowienia ich w określonym czasie. Pamięć deklaratywna pozwala na porównanie nowo zapamiętanych informacji z informacjami zgromadzonymi wcześniej. Mniej precyzyjne pojęcie pamięci krótkotrwałej jest coraz częściej zastępowane przez pojęcie pamięci roboczej [Squire i Dede, 2015]. Pamięć robocza odnosi się do zdolności zapamiętania ograniczonej ilości informacji. Wspiera ona funkcje poznawcze, takie jak uczenie się i wnioskowanie, niezbędne do utrzymania uwagi i skutecznego wykonywania zadań. Pamięć robocza jest kontrolowana przez korę przedczołową (ang. *prefrontal cortex*, PFC) [D'Ardenne i wsp., 2012]. Chociaż pamięć robocza jest niezależna od pamięci długotrwałej i niezwiązana ze strukturami przyśrodkowego płata skroniowego (ang. *medial temporal lobe*; MTL), to jeżeli zadanie wymaga zapamiętania dużej ilości informacji przekraczającej pojemność pamięci roboczej lub gdy jej funkcjonowanie jest zakłócone przez konieczność wykazania podzielności uwagi, to wówczas jego wykonanie zależy od pamięci długotrwałej [Squire i Dede, 2015].

### **1.3.2. Rola formacji hipokampa i struktur funkcjonalnie powiązanych z hipokampem w procesach pamięciowych**

W regulację pamięci długotrwałej (deklaratywnej) zaangażowane są w szczególności struktury należące do MTL. W jego skład wchodzi: hipokamp, przyległe do niego kora śródwęchowa (ang. *entorhinal cortex*, EC), okołowęchowa (ang. *perirhinal cortex*, PER) i okołohipokampowa [Squire i Dede, 2015, Squire i wsp., 2004]. Hipokamp stanowi strukturę układu limbicznego, który jest uważany za „pierwotną” część mózgu odpowiedzialną za zachowania mające zapewnić przeżycie, m.in. odczuwanie głodu, bólu, przyjemności, emocji, motywację i pamięć [Anand i Dhikav, 2012]. Kodowanie informacji, ich konsolidacja i przywoływanie z pamięci zależy od wielu wzajemnie połączonych ze sobą obszarów mózgu, których kluczowe funkcje pełni hipokamp.

Formacja hipokampa jest złożoną strukturą mózgu, która u ludzi i innych naczelnych znajduje się w przyśrodkowej części płata skroniowego kory

kresomózgowia, rozmieszczona parzyście w obydwu półkulach mózgu [Anand i Dhikav, 2012]. Choć formacja hipokampa ludzi i gryzoni różni się pod względem topograficznym to jest ona do siebie podobna pod względem histologicznym [Schröder i wsp., 2020]. W skład formacji hipokampa wchodzi hipokamp właściwy, DG i podkładka, a także obszar parahipokampalny obejmujący *presubikulum*, *parasubikulum*, korę śródwęchową, korę okołowęchową oraz korę zawęchową [Furtak, 2007]. Anatomicznie główną część stanowi hipokamp właściwy (łac. *Cornu ammonis*; CA), nazywany także rogami Amona, w którym wyróżnia się trzy pola: CA1, CA2, CA3. Razem z DG tworzą strukturę w kształcie dwóch połączonych ze sobą liter „C” [Anand i Dhikav, 2012]. DG jest wewnętrznym obszarem hipokampa o kształcie litery „V” w płaszczyźnie grzbietowej bądź „U” w płaszczyźnie brzusznej otoczonym regionami CA1-CA3 [Ryc. 4]. Komórki tworzące hipokamp właściwy układają się w trzy warstwy: drobinową, piramidową i komórek wielokształtnych. Dominującą warstwę stanowi warstwa komórek piramidalnych [Anand i Dhikav, 2012]. DG także składa się z trzech warstw – drobinowej, komórek wielokształtnych i ziarnistej [Amaral i wsp., 2007; Bartsch i Wulff, 2005]. Znajdująca się w wewnętrznej części DG warstwa komórek wielokształtnych nazywana jest także wnęką (łac. *hilus*) [Scharfman i Myers, 2013]. Największą jednak populację komórek w DG stanowią komórki ziarniste [Amaral i wsp., 2007; Bartsch i Wulff, 2005]. W obrębie warstwy ziarnistej, na jej granicy z warstwą komórek wielokształtnych, wyróżnić można warstwę komórek podziarnistych. Jest to szczególne miejsce, w którym przez całe życie ssaków występują podziały komórek progenitorowych [Barha i wsp., 2009].



Ryc. 4. Budowa hipokampa myszy [zdjęcie własne].

W formacji hipokampa wyróżnia się trzy główne rodzaje połączeń neuronalnych: połączenia dochodzące do hipokampa z innych części kory, połączenia wewnętrzne pomiędzy jego częściami i połączenia wychodzące do innych struktur korowych i podkorowych mózgu [Amaral i wsp. 2007; Anand i Dhikav, 2012; Bartsch i Wulff, 2015]. Przy czym, charakterystyczną cechą hipokampa jest obecność licznych jednokierunkowych połączeń neuronalnych, które determinują jego końcową rolę w procesach pamięciowych [Amaral i wsp., 2007]. Hipokamp jest zaangażowany w procesy kognitywne i nawigację przestrzenną [Lisman i wsp., 2017]. Poszczególne pola hipokampa i regiony z nimi związane pełnią wyspecjalizowane role. Do pola CA1 docierają informacje z DG i CA3, ale również bezpośrednie projekcje z EC. Sugeruje to, iż pole CA1 ma za zadanie porównać nowe informacje otrzymane z EC z informacjami przechowywanymi w CA3 pod względem wykrywania niezgodności, błędów lub elementów nowości [Anand i Dhikav, 2012, Tao i wsp., 2021]. DG będąc regionem, który odgrywa kluczową rolę w procesowaniu informacji przekazywanych z EC do pola CA3, bierze udział w odróżnianiu od siebie wysoce podobnych doświadczeń, a także tworzeniu pamięci skojarzeniowej [Anand i Dhikav, 2012; Denoth-Lippuner i Jessberger, 2021]. **Liczne badania wskazują, iż tworzenie nowych neuronów (neurogeneza) i połączeń synaptycznych w DG jest kluczowe dla rozwoju pamięci przestrzennej i procesów uczenia się.** Nowopowstałe neurony w DG warunkują zależną od hipokampa pamięć

przestrzenną i elastyczność behawioralną np. nauczenie się przez myszy nowego położenia platformy w teście MWM. Nowe neurony odpowiadają wówczas nie tylko za kodowanie nowych doświadczeń, ale także za zacieranie poprzednich śladów pamięciowych [Denoth-Lippuner i Jessberger, 2021]. Nowo powstałe neurony w DG tworzą połączenia z polem CA2 hipokampa, które uczestniczy w rozróżnianiu informacji kontekstowych związanych z pamięcią. Powstające w okresie dorosłości neurony DG pobudzają neurony piramidalne pola CA3, włókna mszyste i interneurony wnętrza hipokampa, struktur niezbędnych w przywoływaniu wspomnień [Fares i wsp., 2019].

PFC umożliwia uczenie się relacji pomiędzy wykonywaną czynnością a jej rezultatem i gromadzenie informacji jakie postępowanie jest optymalne w danym kontekście sytuacyjnym [Singh i wsp., 2019]. Odpowiada ona więc za zachowania adaptacyjne, zachodzące w odpowiedzi na zmianę warunków otoczenia lub stanowiące korektę postępowania w przypadku popełnienia błędu. Adaptacja zachowania bazuje na znajomości zarówno bezpośredniej przeszłości jak i percepcji teraźniejszości. Wykazano, iż w przypadku wykonywania zadań wymagających intensywnego używania pamięci roboczej aktywność przyśrodkowej kory przedczołowej (ang. *medial prefrontal cortex*, mPFC) pozwala na przywołanie informacji o bezpośredniej przeszłości, takich jak zapamiętane obiekty czy sekwencje, i dokonywania na jej podstawie wyboru np. w teście spontanicznej alternacji w labiryncie Y [Maggi i wsp., 2018; Maggi i Hunphries, 2022]. Do mPFC docierają bezpośrednio projekcje neuronów z pola CA1 hipokampa, co umożliwia integrację informacji przestrzennych o otoczeniu [Maggi i wsp., 2018]. Wiadomo również, iż podczas uczenia się dochodzi do synchronizacji wyładowań w rytmie fal *theta* w PFC i hipokampie, przyczyniając się do indukcji zmian w plastyczności i przechowywaniu informacji [Liu i wsp., 2018].

Do PER docierają przede wszystkim włókna sensoryczne pochodzące z kory mózgowej (głównie części skroniowej), ośrodków podkorowych, ciała migdałowatego i formacji hipokampa [Furtak, 2007]. PER odpowiada za pamięć wizualną i pamięć związaną z zapachami, warunkującą rozpoznawanie indywidualnych obiektów i przechowywanie informacji o nich. Prawdopodobnie identyfikacja obiektu i ocena jego wcześniejszej znajomości są oddzielnymi

procesami pamięciowymi, aczkolwiek są one ze sobą ściśle powiązane. PER jest odpowiedzialna za ocenę obiektów względem ich wcześniejszego napotkania i na tej podstawie pozwala odróżnić obiekt znany od nowego, również w przypadku obiektów wyglądających podobnie do siebie. Większość badań wskazuje na preferencje gryzoni do eksploracji nieznanego obiektu. Uważa się, że zjawisko to zachodzi zarówno przy pojedynczej jak i wielokrotnej ekspozycji na dany obiekt. Jednakże w przypadku wielokrotnej ekspozycji rozpoznawanie obiektu może być związane z kontekstem w jakim jest on prezentowany i zależeć od funkcji hipokampa. Uszkodzenie PER u gryzoni i małą skutkuje zaburzeniami w rozwiązywaniu zadań wizualnych związanych ze znajomością pojedynczego obiektu, jak i zaburzeniami w rozwiązywaniu złożonych zadań wizualnych [Brown i Banks, 2015].

### **1.3.3. Neuroplastyczność – neurogeneza i synaptogeneza w hipokampie**

Rozwój OUN jest złożonym procesem determinowanym przez genetycznie uwarunkowane procesy biologiczne oraz czynniki środowiskowe. Przebiega on według ściśle określonej sekwencji, w której bardziej pierwotne filogenetycznie struktury mózgu (m.in. układ limbiczny) formują się przed bardziej złożonymi strukturami (np. korą mózgową) [Martin i Dombrowski, 2008].

Początkiem wszystkich struktur OUN jest cewa nerwowa, której tworzenie następuje w pierwszych tygodniach rozwoju embrionalnego [Cayuso i Martí, 2005; Rodier, 1994]. Cewę nerwową, budują komórki neuroektodermy, które dzieląc się, formują warstwy komórek neuroepitelialnych [Cayuso i Martí, 2005]. Są to komórki macierzyste ośrodkowego układu nerwowego, które po podziałach przekształcają się w komórki progenitorowe, dające początek wszystkim rodzajom komórek układu nerwowego – neuronom i komórkom glejowym (astrocytom, oligodendrocytom) [de Lahunta i wsp., 2016]. Cewa nerwowa, w której można wyróżnić warstwę komorową (ang. *ventricular zone*, VZ) – zawierającą komórki progenitorowe zdolne do podziału oraz warstwę płaszczową (ang. *mantle zone*, MZ) – zbudowaną z komórek w fazie postmitotycznej [Cayuso i Martí, 2005], różnicuje się w przedniej części tworząc wypuklenia – pierwotne pęcherzyki mózgowie, a następnie wtórne pęcherzyki mózgowie. W jednym z najbardziej ku przodowi wysuniętym wtórnym pęcherzyku

mózgowym – w kresomózgowiu, wykształca się formacja hipokampa [de Lahunta i wsp., 2016; Martin i Dombrowski, 2008].

W okresie rozwoju liczba komórek neuronalnych sukcesywnie zwiększa się. Neurony i komórki glejowe migrują z warstwy komorowej do swoich właściwych lokalizacji, gdzie dochodzi do ich różnicowania i dojrzewania [Martin i Dombrowski, 2008]. Proces, w którym następuje generacja neuronów nazywa się neurogenezą, natomiast formowanie komórek glejowych – gliogenezą [Urbán i Guillemot, 2014]. W okresie prenatalnym poza licznymi podziałami komórkowymi, zachodzi nasilona synaptogeneza, czyli tworzenie połączeń między komórkami układu nerwowego. Neurony formują wypustki – rozgałęzione dendryty, odbierające informacje od otaczających komórek, mające aktywność postsynaptyczną oraz akson – najdłuższą wypustkę przekazującą impulsy do kolejnych komórek, wykazującą aktywność presynaptyczną [Martin i Dombrowski, 2008]. Jednocześnie szybko wzrasta synteza neuroprzekazników i receptorów, charakterystycznych dla danego typu neuronu [Jablonski i wsp., 2016]. Liczba powstających komórek i połączeń synaptycznych przewyższa wymaganą dla prawidłowego funkcjonowania dojrzałego OUN [Martin i Dombrowski, 2008]. U młodych, dorosłych gryzoni znaczna część nowo powstałych neuronów hipokampa ginie w ciągu 3 tygodni. W przypadku rozwoju formacji hipokampa około 60% komórek obumiera już po 24-48 godzinach od podziału komórek progenitorowych [Denoth-Lippuner i Jessberger, 2021]. Neurony, które nie utworzą odpowiednich połączeń ulegają apoptozie rozwojowej [Martin i Dombrowski, 2008]. Druga faza obumierania komórek następuje po 12-16 dniach od ich powstania [Denoth-Lippuner i Jessberger, 2021]. U ludzi, najwyższa gęstość połączeń synaptycznych jest osiągnięta w wieku 2 lat po czym sukcesywnie spada. Szacuje się, że w wieku nastoletnim w sposób fizjologiczny utraconych zostaje około 60% wytworzonych synaps [Martin i Dombrowski, 2008].

Mózg charakteryzuje się neuroplastycznością określaną jako zdolność do reorganizacji związanej z budową i funkcjonowaniem. Zmiany mogą mieć charakter morfologiczny, taki jak tworzenie nowych połączeń międzyneuronalnych lub neuronów, ale także charakter neurobiochemiczny. Dojrzały mózg jest w stanie funkcjonalnie skompensować uszkodzenia generując

nowe połączenia pomiędzy istniejącymi neuronami w procesie synaptogenezy. Chociaż najbardziej intensywny rozwój OUN zachodzi w okresie prenatalnym i w pierwszych latach życia to istnieją obszary mózgu, w których neurogeneza jest kontynuowana przez całe życie. Aktywna neurogeneza u dorosłych ssaków przebiega dzięki obecności neuronalnych komórek progenitorowych w strefie okołokomorowej (ang. *subventricular zone*, SVZ) położonej w komorach bocznych, skąd nowo powstałe neurony przemieszczają się do opuszki węchowej, oraz w warstwie podziarnistej (ang. *subgranular zone*, SGZ) DG [Denoth-Lippuner i Jessberger, 2021; Fares i wsp., 2019]. Neurogeneza w obrębie dojrzałego hipokampa jest złożonym procesem. Neuronalne komórki macierzyste dzielą się i tworzą neuronalne komórki progenitorowe w SGZ, które następnie różnicują się w niedojrzałe neurony i wbudowują się w warstwę ziarnistą DG, gdzie dojrzewają w ciągu kilku tygodni tworząc neurony ziarniste [Cho i Kim, 2010; Denoth-Lippuner i Jessberger, 2021; Gonçalves i wsp., 2016]. Do nasilenia neurogenezy w DG przyczyniają się neuroprzekaźniki (np. serotonina), hormony (np. estrogeny, feromony samców) i szereg czynników neurotroficznycy. Tym samym wzrost stężenia wymienionych czynników i pozytywna stymulacja wspomaga procesy poznawcze i pamięć [Cho i Kim, 2010; Denoth-Lippuner i Jessberger, 2021; Gonçalves i wsp., 2016; Zhao i wsp., 2015]. Zmniejszoną neurogenezę w hipokampie zaobserwowano w przypadku ekspozycji na alkohol etylowy lub substancje psychoaktywne, m.in. metamfetaminę, MDMA i kokainę w dorosłości jak i podczas rozwoju pre- i postnatalnego [Cho i Kim, 2010].

Mózg to narząd najbardziej wrażliwy na działanie teratogenne z uwagi na długi okres rozwoju. Ponieważ każdy z obszarów wykazuje największą wrażliwość na czynniki szkodliwe w czasie wzmożonego wzrostu, tworzy się okno czasowe podatności na uszkodzenia, czyli decydujący wpływ ma czas ekspozycji na czynniki szkodliwe, na które dojrzały mózg byłby odporny [Martin i Dombrowski, 2008; Rodier, 1994]. Szacuje się, że u myszy i szczurów wiek pomiędzy PD1 a PD21, stanowi okres rozwoju mózgu odpowiadający w przybliżeniu II połowie ciąży u człowieka [Jablonski i wsp., 2016], a wiek od PD11 do PD20 koresponduje z III trymestrem ludzkiej ciąży, który jest okresem krytycznym dla rozwoju hipokampa [Morford i wsp., 2002] – następuje

wtedy proliferacja komórek ziarnistych w DG [Rice i Barrone, 2000]. W tym czasie rozwijają się obszary mózgu odpowiedzialne za wyższe funkcje poznawcze i są one wysoce podatne na uszkodzenia spowodowane ksenobiotykami, w tym związkami psychostymulującymi. W przypadku ekspozycji gryzoni na metamfetaminę w modelu późnego okresu ciąży wystąpiły długotrwałe deficyty pamięci przestrzennej, natomiast nie wystąpiły one w modelach wcześniejszych etapów ciąży [Jablonski i wsp., 2016].



## 2. Cel pracy

Odległe skutki ekspozycji na syntetyczne katynony w okresie rozwoju OUN oraz neurobiologiczne mechanizmy leżące u podłoża ich występowania są złożone i nie do końca poznane. Negatywny wpływ klasycznych związków psychostymulujących na funkcje poznawcze i pamięć odnotowano u dzieci kobiet stosujących narkotyki w okresie ciąży. Wiadomo, iż ekspozycja gryzoni w okresie rozwoju OUN na klasyczne narkotyki psychostymulujące prowadzi do wystąpienia zaburzeń poznawczych oraz zaburzeń pamięci u młodych i dorosłych zwierząt.

**Celem niniejszej pracy jest ocena wpływu MDPV, syntetycznego katynonu o silnym działaniu dopaminergicznym, podawanego myszom w okresie pomiędzy 11 a 20 dniem po urodzeniu, na rozwój i funkcje hipokampa oraz procesy poznawcze i pamięć zwierząt po osiągnięciu dorosłości.**

### **3. Materiały i metody**

#### **3.1. Odczynniki i związki chemiczne**

##### **3.1.1. Podawane związki**

Bromodeoksyurydyna (BrdU) (B5002) – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Chlorowodorek 3,4-metylenodioksy-pirowaleronu [MDPV, 3,4-MDPV, 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(1-pyrrolidinylo)-1-pentanon] (10684) – Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)

Sterylny roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl) w ampułkach – Polpharma (Starogard Gdański, Polska)

##### **3.1.2. Eutanazja i utwalenie tkanek**

Bufor fosforanowy (ang. *phosphate buffer*, PB) – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Euthasol vet. 400 mg/ml (pentobarbital sodu, roztwór do wstrzykiwań) – Le Vet Pharma (Oudewater, Holandia)

Paraformaldehyd – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. *phosphate buffer saline*, PBS) – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Sterylny roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl) do infuzji – Fresenius Kabi (Kutno, Polska)

##### **3.1.3. Immunohistochemia**

Albumina z surowicy bydłowej (ang. *bovine serum albumin*, BSA) (A1470) – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Azydek sodu – POCh S.A. (Gliwice, Polska)

DePeX (18243.01) – Serva, Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Niemcy)

Ekstrawidyna skoniugowana z peroksydazą chrzanową (E8386) – Sigma-Aldrich, (Darmstadt, Niemcy)

Etanol – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Glicerol – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Glikol etylenowy – Chempur (Piekary Śląskie, Polska)

HCl – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Ksylen – Chempur (Piekary Śląskie, Polska)

Kwas borowy – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Medium do przymrażania tkanek (14020108926) – Leica (Wielka Brytania)

Nadtlenek wodoru – Chempur (Piekary Śląskie, Polska)

PBS – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Przeciwciało biotynylowane kozie II-rzędowe skierowane przeciwko szczurzym IgG (112-065-003) – Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)

Przeciwciało kozie II-rzędowe skierowane przeciwko króliczym IgG skoniugowane z fluorochromem Alexa Fluor® 568 (ab175471) – Abcam (Cambridge, Wielka Brytania)

Przeciwciało królicze I-rzędowe skierowane przeciwko GFAP (Z0334) – DAKO, Agilent Technologies (Santa Clara, CA, Stany Zjednoczone)

Przeciwciało królicze I-rzędowe skierowane przeciwko NeuN (24307) – Cell Signaling Technology (Danvers, MA, Stany Zjednoczone)

Przeciwciało szczurze I-rzędowe skierowane przeciwko BrdU (ab6326) – Abcam (Cambridge, Wielka Brytania)

Sacharoza – Chempur (Piekary Śląskie, Polska)

Streptawidyna skoniugowana z fluorochromem Alexa Fluor® 488 (S11223) – ThermoFischer Scientific (Waltham, MA, Stany Zjednoczone)

Surowica kozia (ang. *normal goat serum*, NGS) (S26-M) – Millipore (Darmstadt, Niemcy)

Roztwór soli fizjologicznej w buforze cytrynianowym (ang. *saline sodium citrate buffer*, SSC) 20-krotnie stężony – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Triton X-100 (TRX506.500) – BioShop (Burlington, ON, Kanada)

Trizma base – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Trizma HCl – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Zestaw do wykrywania peroksydazy DAB Peroxidase Substrate Kit (SK-4100)  
– Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA).

#### **3.1.4. Western blot**

Bufor kwasu 2-(N-morfolino)etanosulfonowego (MES), koncentrat 20x (NP0002)  
– Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Niemcy)

Bufor Laemmli dwukrotnie stężony Sample buffer, Laemmli 2x Concentrate (S3401) – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Bufor lizujący RIPA (ang. *radioimmunoprecipitation assay buffer*) (R0278)  
– Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Glicyna – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Inhibitor proteaz *cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Tablets* (04693159001) – Roche (Bazylea, Szwajcaria)

Membrana nitrocelulozowa (1620112) – Bio-Rad (Hercules, CA, Stany Zjednoczone)

Mleko w proszku, odtłuszczone – Gostyń, Polska

Odczynnik Bradforda *Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent Bio-Rad* (5000205)  
– Bio-Rad (Hercules, CA, Stany Zjednoczone)

Przeciwciało królicze I-rzędowe skierowane przeciwko PSD95 (3450) – Cell Signaling Technology (Danvers, MA, Stany Zjednoczone)

Przeciwciało królicze I-rzędowe skierowane przeciwko synaptofizynie (5461)  
– Cell Signaling Technology (Danvers, MA, Stany Zjednoczone)

Przeciwciało mysie I-rzędowe skierowane przeciwko  $\beta$ -aktynie (3700) – Cell Signaling Technology (Danvers, MA, Stany Zjednoczone)

Przeciwciało ośle II- rzędowe IRDye 680RD skierowane przeciwko mysim IgG (926-68072) – LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, Stany Zjednoczone)

Przeciwciało ośle II-rzędowe IRDye 800CW skierowane przeciwko króliczym IgG (926-32213) – LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, Stany Zjednoczone)

Standard białkowy *Bio-Rad Protein Assay Standard II* (5000007) – Bio-Rad (Hercules, CA, Stany Zjednoczone)

Tween 20 – Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy)

Wzorzec masy molekularnej *Chameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder* (928-60000) – LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, Stany Zjednoczone)

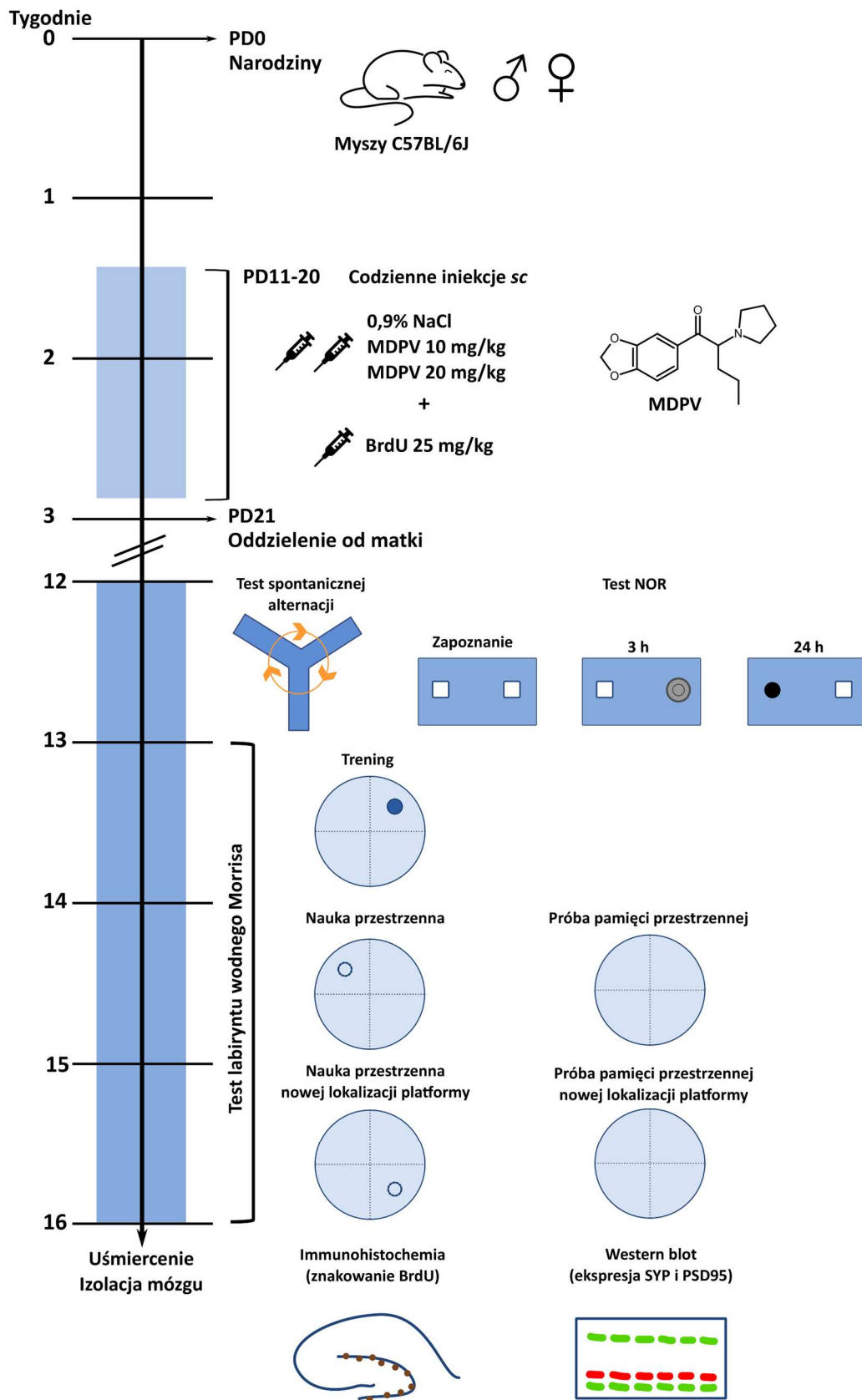
Żel poliakryloamidowy *NuPAGE Bis-Tris gel* (4-12%; 1,5 mm; 15-dołkowy; NP0321PK2) – Invitrogen (Waltham, MA, Stany Zjednoczone)

## 3.2. Zwierzęta

Hodowla zwierząt została założona z myszy szczepu wsobnego C57BL/6J – 4 samców i 8 samic w wieku 8 tygodni zakupionych od firmy Charles River (Sulzfeld, Niemcy). Myszy umieszczono po 4 osobniki tej samej płci w standardowych klatkach wzbogaconych materiałem do budowania gniazda oraz papierowym tunelem, służącym za miejsce do schronienia, materiał do gryzienia i zabawkę. Zwierzęta miały nieograniczony dostęp do wody i standardowej karmy (Rodentia Basic, Agropol, Motycz, Polska). Myszy przebywały w wyciszonych pomieszczeniach z kontrolowanym poziomem temperatury (20-24°C) i wilgotności (45-65%); w dobowym cyklu oświetlenia: 12 godz. światła – 12 godz. ciemności (światło włączano o godzinie 6:00). Okres aklimatyzacji zwierząt do nowych warunków bytowania wynosił 7 dni. Do rozrodu samice były umieszczane po dwie w klatce z jednym samcem. W przypadku stwierdzenia ciąży samicę umieszczano w osobnej klatce. Do doświadczeń wykorzystano samce i samice myszy pochodzące z 12 miotów. Wszystkie procedury prowadzone były podczas fazy jasnej cyklu oświetlenia (między godziną 8:00 a 17:00). Doświadczenia behawioralne były nagrywane przy użyciu kamery Logitech c920 Pro HD (Lozanna, Szwajcaria).

Warunki bytowania myszy oraz wykonywane na nich procedury były zgodne z wytycznymi Unii Europejskiej dotyczącymi ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dyrektywa Rady 2010/63/EU z dnia 22 września 2010 r.), wytycznymi ARRIVE i zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną do spraw doświadczeń na Zwierzętach z siedzibą przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (Uchwała nr 56/ŁB189/2020 z dn. 07.12.2020 r.). Jednocześnie warunki przetrzymywania zwierząt były zgodne z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 grudnia 2016 r. w sprawie minimalnych wymagań, jakie powinien spełniać ośrodek oraz minimalnych wymagań w zakresie opieki nad zwierzętami utrzymywanymi w ośrodku.

Kolejność procedur i doświadczeń przeprowadzonych na zwierzętach przedstawiono na Ryc. 5.



Ryc. 5. Schemat przedstawiający kolejność przeprowadzonych procedur i doświadczeń na zwierzętach.

### **3.3. Podawanie związków**

W obrębie danego miotu mysie oeski płci żeńskiej i męskiej w wieku PD11-20 otrzymywały dwie podskórne iniekcje roztworu MDPV (10 lub 20 mg/kg masy ciała) lub soli fizjologicznej (grupa kontrolna) z zachowaniem 2-godzinnego odstępu. Myszy były przydzielane do poszczególnych grup w sposób losowy, tak aby po zakończeniu etapu podawania związków grupy poddane doświadczeniom liczyły po 12 myszy danej płci – łącznie 72 osobniki. Ogony zwierząt oznakowano markerem, aby można było odróżnić od siebie poszczególne osobniki. Znakowanie było codziennie powtarzane. Każdego dnia rano myszy były ważone z dokładnością do 0,1 g. Związki zostały rozpuszczone w jałowym roztworze soli fizjologicznej, po czym wstrzykiwano je podskórnie w okolicę karku w objętości 0,1 ml/10 g masy ciała. Dawki MDPV zostały dobrane na podstawie wcześniejszych badań z użyciem tego związku [Ádám i wsp., 2014; Karlsson i wsp., 2014; Wojcieszak i wsp., 2020]. Zastosowane dawki nie wywołują wzrostu śmiertelności u dorosłych myszy, natomiast powodują wyraźne efekty pobudzenia i uzależnienia. Podanie odbywało się dwa razy dziennie w odstępie dwóch godzin, ponieważ substancje psychostymulujące, w tym MDPV, charakteryzują się krótszym okresem półtrwania u gryzoni niż u ludzi [Calinski i wsp., 2019; Jablonski i wsp., 2016; Skelton i wsp., 2008].

W celu oceny procesów neurogenezy w okresie rozwoju wszystkie myszy otrzymywały raz dziennie podskórne iniekcje roztworu BrdU (25 mg/kg masy ciała) po upływie 30 minut od wykonania pierwszego podania (NaCl lub MDPV).

W wieku 21 dni myszy oddzielono od matek i umieszczono po 4 osobniki w osobnych klatkach dla każdej z płci. Aby odróżnić poszczególne osobniki, myszy trwale oznakowano, wykonując dziurki w uszach przy pomocy dziurkarki dla zwierząt (Ø2mm, FST GmbH, Heidelberg, Niemcy).

### **3.4. Badania behawioralne**

W wieku 12 tygodni myszy zostały poddane standardowym testom behawioralnym oceniającym pamięć i zdolności poznawcze.



### 3.4.1. Test spontanicznej alternacji

Ocenę wpływu MDPV na roboczą pamięć przestrzenną przeprowadzono testem spontanicznej alternacji wg Hölter i wsp. (2015) z modyfikacjami. W badaniach wykorzystano labirynt w kształcie litery Y (Ugo Basile, Gemonio, VA, Włochy). Test ten opiera się na naturalnej skłonności myszy do eksploracji nowego środowiska.

Badania wykonano w wyciszonym pomieszczeniu. Labirynt umieszczono na stole i oświetlono w centrum światłem o natężeniu około 50 lx, a jego każde ramię zostało oznaczone wirtualnie literami – A, B i C. Kamerę umieszczono na statywie nad labiryntem tak, aby swoim zasięgiem obejmowała wszystkie jego ramiona. W celu aklimatyzacji myszy przyniesiono do pokoju doświadczalnego na 30 minut przed rozpoczęciem testu. Zwierzęta przez cały czas oczekiwania na swoją próbę miały swobodny dostęp do karmy i wody pitnej. Myszy podzielono na grupy testowe wg płci. Na początku danego dnia testowane były wszystkie samce, natomiast później samice, aby uniknąć podążania samców po ewentualnych szczątkowych śladach zapachowych samic. Badaną mysz umieszczano w wybranym ramieniu labiryntu, pyskiem do ściany, na 5 minut, w ciągu których mogła bez ograniczeń eksplorować labirynt. Myszy w obrębie danego miotu były umieszczane w tym samym ramieniu startowym. Po zakończonej próbie mysz nie powracała do swojej klatki bytowej, lecz była umieszczana w nowej oddzielnej klatce, by uniknąć stresu i konfliktów z osobnikami oczekującymi na swoją próbę. Po każdym pojedynczym badaniu labirynt był czyszczony przy użyciu środka dezynfekującego (70% roztwór etanolu) w celu usunięcia śladów zapachowych i wycierany do sucha.

Nagrania były analizowane przez dwóch niezależnych eksperymentatorów przy użyciu niekomercyjnego programu komputerowego. Ocenianym parametrem była liczba trójek stanowiących 3 kolejne wejścia do ramion labiryntu w stosunku do wszystkich wejść. Za wejście nie uznawano umieszczenia myszy w ramieniu startowym. Myszy, które wykonały mniej niż 10 wejść były wykluczane z analizy. W przypadku myszy bez zaburzeń kognitywnych większość trójek wejść powinna być wykonana do trzech różnych ramion (np. ABC). Natomiast myszy z deficytami poznawczymi mogą częściej

wracać do tego samego ramienia (np. AAB) lub do poprzednio odwiedzonego ramienia (np. ABA).

### **3.4.2. Test rozpoznawania nowego obiektu**

Test rozpoznawania nowego obiektu (ang. *novel object recognition*, NOR) posłużył do oceny wpływu MDPV na pamięć myszy związaną z funkcjonowaniem kory okołowęchowej powiązanej z hipokampem, [Jo i Lee, 2010; Reichel i wsp., 2012]. Jest on oparty na naturalnej tendencji myszy do dłuższej eksploracji obiektu nowego. Zakłada się, że myszy bez zaburzeń kognitywnych eksplorują nowy obiekt przez dłuższy czas niż ten wcześniej poznany, natomiast myszy z deficytami pamięciowymi eksplorują oba obiekty w podobnym stopniu, ponieważ nie rozróżniają nowego obiektu od uprzednio poznanego. Doświadczenie zostało wykonane wg Hölter i wsp. (2015) z modyfikacjami.

Badanie było przeprowadzane przez cztery kolejne dni. W celu aklimatyzacji myszy każdorazowo przynoszono do pokoju doświadczalnego na 30 minut przed rozpoczęciem testu. Zwierzęta przez cały czas oczekiwania na swoją próbę miały swobodny dostęp do karmy i wody. W pierwszym etapie doświadczenia zwierzęta poddano 2-dniowej habituacji do areny, którą stanowiła standardowa klatka bytowa z bezbarwną płytką ze szkła akrylowego ułożoną na dnie. Każda mysz eksplorowała arenę przez 20 minut przy włączonym górnym czerwonym świetle. Po próbie mysz przenoszono do klatki bytowej. Habituacja umożliwia zwierzęciu zapoznanie się z areną, dzięki czemu podczas właściwego testu z obiektami umieszczonymi w arenie zwiększa się prawdopodobieństwo, iż będzie ono zainteresowane eksploracją obiektów, a nie areny. W drugim etapie doświadczenia mysz umieszczano na 5 minut na arenie z ułożoną na dnie płytką ze szkła akrylowego, do której przyklejono dwa identyczne małe obiekty (białe sześciany). Każdą mysz poddano trzem próbom, podczas których mysz zapoznawała się z obiektami i je zapamiętywała. Pomiędzy próbami było 15 minut przerwy. Po upływie 3 godzin od ostatniej ekspozycji na identyczne obiekty, mysz umieszczono na 5 minut na arenie z poznanym wcześniej obiektem (białym sześcianem) oraz nowym obiektem (czarnym walcem). Po upływie 24 godzin od poprzedniej ekspozycji, mysz umieszczono na 5 minut na arenie z płytką, do której przytwierdzony był znajomy obiekt (biały sześcian) i nowy

(metalowa śrubka). Aby wykluczyć możliwą preferencję myszy wobec jednej ze stron areny (lewej lub prawej), położenie nowego obiektu było zmieniane dla próby po 24 godzinach w stosunku do próby po 3 godzinach. Wszystkie klatki służące za arenę i płytki akrylowe z przyklejonymi obiektami po jednokrotnym użyciu dokładnie wyczyszczono przy użyciu środka dezynfekującego (70% roztwór etanolu) w celu usunięcia śladów zapachowych i wytarte do sucha. Zarówno podczas przerw w czasie ekspozycji na dwa identyczne obiekty, jak i 3- oraz 24-godzinnej retencji myszy umieszczano w indywidualnych, standardowych klatkach bytowych. Podczas 3- i 24-godzinnej retencji myszy miały zapewniony swobodny dostęp do standardowej karmy i wody pitnej. Po zakończonym doświadczeniu myszy przenoszono do klatek bytowych w poprzednio utworzonych grupach.

Za eksplorację uznawano obwąchiwanie obiektu w odległości maksimum 2 cm. Gryzienia obiektu, wspinania lub opierania się o obiekt nie uznawano za eksplorację. Eksplorację nagrywano, a jej czas został poddany ocenie przez dwóch niezależnych eksperymentatorów przy użyciu niekomercyjnego programu komputerowego. Wyniki przedstawiono w postaci indeksu preferencji wyrażonego w procentach jako stosunek czasu, w którym mysz była zainteresowana nowym obiektem do całkowitego czasu zainteresowania oboma obiektami.

### **3.4.3. Test labiryntu wodnego Morrisa**

Do oceny zdolności uczenia się i pamięci przestrzennej zależnej od hipokampa wykorzystano test MWM. Test ten opiera się na naturalnej tendencji gryzoni do ucieczki z wody na stałe podłoże. Test przeprowadzono wg Vorheesa i Williama (2006) z modyfikacjami.

W badaniach wykorzystano okrągły basen (Ø120 cm; Ugo Basile, Gemonio, VA, Włochy) wypełniony do połowy głębokości wodą zmętnioną przy użyciu białej nietoksycznej farby Carioca Tempera (Carioca, Turyn, Włochy). Temperaturę wody utrzymywano w granicach 20-22°C. Powierzchnia wody w basenie została wirtualnie podzielona na cztery kwadranty (strefy): NE, NW, SE i SW. Pozycja i ruch myszy były nagrywane za pomocą kamery zawieszanej na suficie nad środkiem basenu. Nagrania były analizowane

w czasie rzeczywistym przy pomocy oprogramowania ANY-maze (wersja 4.82, Stoelting Co., IL, USA). Doświadczenie było prowadzone w pokoju oświetlonym białym światłem przy pomocy lampy wolnostojącej (około 100 lx), skierowanym w podłogę, tak aby nie powstawały rozbłyski na tafli wody w basenie. W celu aklimatyzacji myszy każdorazowo przynoszono do pokoju doświadczalnego na 30 minut przed rozpoczęciem testu. Mysz była umieszczana w basenie pyskiem skierowanym w stronę ściany i puszczana wolno przez eksperymentatora, wówczas, gdy znalazła się na poziomie wody. Pozycja startowa nigdy nie znajdowała się w kwadrancie z platformą. Po każdej próbie mysz umieszczano na 5 minut w klatce wyłożonej papierowymi ręcznikami, aby mogła odpocząć, wyschnąć i uniknąć wychłodzenia. Na koniec każdego dnia doświadczenia myszy przenoszono do klatek bytowych.

#### **3.4.3.1 Trening – ocena zdolności pływania**

W pierwszym etapie doświadczenia myszy poddano 3-dniowemu treningowi, aby sprawdzić czy zwierzęta nie różnią się fizyczną zdolnością do pływania i motywacją do ucieczki z wody. Podczas tego etapu myszy uczyły się, że ucieczkę z wody stanowi wpłynięcie na platformę. W basenie umieszczono platformę (Ø10 cm; Ugo Basile, Gemonio, VA, Włochy) wynurzoną nad powierzchnię wody na wysokość około 1 cm. Dodatkowo, w środku platformy znajdowała się szklana bagietka laboratoryjna z żółtym, plastikowym, okrągłym klokiem na jej szczycie, wystającym na wysokość około 15 cm od powierzchni platformy. Każdego dnia mysz była poddawana 4 sesjom, a każda próba rozpoczynała się z innej pozycji startowej. Podczas prób mysz umieszczano w basenie na 60 sekund, podczas których szukała drogi ucieczki. Jeżeli mysz dotarła na platformę była na niej pozostawiana na 15 sekund. W przypadku, gdy mysz nie zdołała dopłynąć do platformy była na niej umieszczana przez eksperymentatora na 15 sekund.

#### **3.4.3.2 Ocena nauki przestrzennej lokalizacji platformy (ang. *spatial learning, spatial acquisition*)**

Ten etap badań odbywał się przez 5 kolejnych dni. Platformę ustawiono w innym kwadrancie basenu niż podczas treningu. Była ona zanurzona w wodzie na głębokości około 1 cm pod powierzchnią oraz nie posiadała dodatkowych

oznaczeń. Każdego dnia mysz była poddawana 4 sesjom, a każda próba rozpoczynała się z innej pozycji startowej. Próba kończyła się po upływie 60 sekund lub w momencie wpłynięcia myszy na platformę. Jeżeli mysz dotarła na platformę była na niej pozostawiana na 15 sekund, natomiast w przypadku, gdy nie zdołała dopłynąć do platformy była na niej umieszczana przez eksperymentatora również na 15 sekund. Podczas tego etapu mysz uczyła się położenia platformy w basenie na podstawie wskazówek zewnętrznych, takich jak wyposażenie pokoju, czy celowo naklejone na ścianach dodatkowe oznaczenia. Pozycje tych elementów nie zmieniano przez cały czas trwania doświadczenia. Również eksperymentator po umieszczeniu myszy w basenie zawsze zajmował tę samą pozycję. Do oceny wykorzystano czas, po którym mysz wpłynęła na platformę, pokonany przez nią dystans, odsetek czasu spędzonego przez mysz w kwadrancie z platformą oraz odsetek dystansu przepłyniętego w kwadrancie z platformą.

#### **3.4.3.3 *Próba pamięci przestrzennej lokalizacji platformy***

Próbie pamięci przestrzennej przeprowadzano po upływie 24 godzin od ostatniego dnia nauki przestrzennej. Z basenu usunięto platformę. Mysz została poddana tylko jednej 60-sekundowej próbie. Analizowanym parametrem była liczba wpłynięć myszy na obszar, w którym uprzednio znajdowała się platforma, odsetek czasu spędzonego przez mysz w kwadrancie, w którym uprzednio znajdowała się platforma oraz odsetek dystansu przepłyniętego w kwadrancie, w którym uprzednio znajdowała się platforma.

#### **3.4.3.4 *Ocena nauki przestrzennej nowej lokalizacji platformy (ang. spatial reversal)***

Ten etap badań przebiegał analogicznie do etapu nauki przestrzennej, lecz platformę umieszczano w nowym miejscu, w kwadrancie znajdującym się naprzeciwko kwadrantu, w którym znajdowała się podczas wcześniejszego etapu. Zastąpienie starych śladów pamięciowych nowymi opiera się na elastyczności kognitywnej, którą warunkuje neurogeneza i plastyczność synaptyczna w hipokampie [Jablonski i wsp., 2016; Vorhees i Williams, 2006]. Pozwala to na wykrycie łagodniejszych zaburzeń poznawczych, ponieważ stanowi trudniejsze zadanie w porównaniu do początkowej nauki przestrzennej.

#### **3.4.3.5 Próba pamięci przestrzennej nowej lokalizacji platformy**

Analogicznie do poprzedniego etapu, próbę pamięci przestrzennej przeprowadzono po upływie 24 godzin od ostatniego dnia nauki przestrzennej nowej lokalizacji platformy. Z basenu usunięto platformę. Mysz została poddana tylko jednej próbie trwającej 60 sekund. Analizowanym parametrem była liczba wpłynięć myszy na obszar, w którym poprzednio znajdowała się platforma, odsetek czasu, spędzonego przez mysz w kwadrancie, w którym uprzednio znajdowała się platforma oraz odsetek dystansu przepłyniętego w kwadrancie, w którym uprzednio znajdowała się platforma.

Po zakończeniu testu MWM mioty myszy podzielono na dwie grupy. Jedną grupę wykorzystano do badań immunohistochemicznych, natomiast drugą do analizy ekspresji wybranych białek metodą Western blot.

### **3.5. Ocena neurogenezy w hipokampie przy użyciu metod immunohistochemicznych**

#### **3.5.1. Eutanazja metodą perfuzji przezsercowej**

Procedurę wykonano wg Gage i wsp. (2012) z modyfikacjami. Przed wykonaniem eutanazji myszy zważono, a następnie wstrzyknięto dootrzewnowo subletalną dawkę pentobarbitalu sodu (100 mg/kg masy ciała) i umieszczono w oddzielnej standardowej klatce bytowej. Gdy mysz przestała odpowiadać na bodźce zewnętrzne została ułożona na grzbiecie na plastikowej kratce do perfuzji i unieruchomiona. Od tego momentu procedura odbywała się pod włączonym dygestorium. U myszy wykonano nacięcie powłok ciała w okolicach klatki piersiowej, a następnie przecięto żebra, aby wyeksponować serce. Ostrożnie przecięto worek osierdziowy, wprowadzono igłę do lewej komory serca poprzez koniuszek serca i niezwłocznie przecięto prawy przedsionek. Przy pomocy pompy perystaltycznej (Ismatec, model ISM832A; Zurych, Szwajcaria) wykonano perfuzję 0,9% roztworem NaCl. Po wypłukaniu krwi z krwiobiegu zmieniono płyn do perfuzji na 4% roztwór paraformaldehydu (PFA) w 0,1 M buforze fosforanowym (PB) o pH = 7,4 pełniący rolę środka utrwalającego.

### **3.5.2. Izolacja mózgu**

Mysz poddano dekapitacji przy użyciu nożyczek. Aby uwidocznic czaszkę, skórę przecięto na głowie w części grzbietowej w kierunku od szyi do nosa. Mięśnie szyi odcięto i delikatnie włożono nożyczki w otwór wielki czaszki (łac. *foramen magnum*), po czym dokonano cięcia do wysokości punktu lambda (punktu ciemniaczka tylnego, łac. *posterior fontalle*) trzymając ostrze nożyczek jak najbliżej kości czaszki, aby nie uszkodzić mózgu. Następnie delikatnie usunięto górne kości czaszki, a odsłonięty mózg wyjęto w całości. Wyizolowany mózg zważono i umieszczono we fiolkach wypełnionych 4% PFA. Barwienia immunohistochemiczne wykonano wg procedur opisanych w Bartkowska i wsp. (2021) oraz Tepper i wsp. (2020) z modyfikacjami.

### **3.5.3. Przygotowanie skrawków**

Mózgi myszy inkubowano w roztworach o zwiększających się stężeniach sacharozy (10%, 20% i 30%) w 0,1 M PB, w każdym przez 24 godziny. Następnie mózgi zatopiono w medium do przymrażania tkanek i skrojono w płaszczyźnie koronalnej, zaczynając od opuszek węchowych, na skrawki o grubości 40 µm na kriostatcie (Leica Biosystems, CM1950, Richmond, IL, USA) w temperaturze -20°C. Skrawki z każdego mózgu zostały ułożone w 10 seriach – 8 serii skrawków wolno pływających i 2 serie skrawków naniesionych bezpośrednio na mikroskopowe szkiełka podstawowe pokryte uprzednio 9% roztworem żelatyny w PBS. Skrawki wolnopływające zanurzone w roztworze zapobiegającym zamarzaniu (0,02% azydek sodu, 15% sacharoza, 30% glikol etylenowy w PB) i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu ich wykorzystania.

### **3.5.4. Ocena neurogenety w zakręcie zębatym**

#### **3.5.4.1 Oznaczenie inkorporacji bromodeoksyurydyny**

Jedna z losowo wybranych serii skrawków wolnopływających z mózgu każdej myszy została poddana barwieniu immunohistochemicznemu w celu wykrycia BrdU, która jest analogiem tymidyny, wbudowującym się w DNA dzielących się komórek, a następnie wykrywanym przy pomocy odpowiednich przeciwciał [Hildebrandt i wsp., 1999]. Wolnopływające skrawki mózgu

przeplukano w 2-krotnie stężonym roztworze soli fizjologicznej w buforze cytrynianowym (2xSSC). Aby zwiększyć dostępność BrdU przeprowadzono denaturację DNA inkubując skrawki przez 30 minut w 2 N HCl w temperaturze 37°C. Reakcję zakończono stosując przez 10 minut 0,1 M kwas borowy (pH = 8,5). Następnie w celu zablokowania endogennej peroksydazy, skrawki zanurzono na 30 minut w 3% roztworze nadtlenu wodoru w TBS (79,1 mM Trizma HCl i 20,9 mM Trizma base w wodzie). Następnie skrawki płukano przez 15 minut w TBS z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100 (TBS-A) i przez kolejne 15 minut w TBS-A z dodatkiem albuminy z surowicy bydlęcej (TBS-B). Skrawki blokowano przez 1 godzinę w 10% roztworze surowicy koziej (NGS) w TBS-B w celu redukcji sygnału tła i zapobieganiu niespecyficznemu łączeniu się przeciwciała II-rzędowego z tkanką. Następnie skrawki inkubowano przez noc w temperaturze 4°C ze szczurzym przeciwciałem I-rzędowym skierowanym przeciwko BrdU w stężeniu 1:1000 w TBS-B. Kolejnego dnia skrawki poddano 15-minutowemu płukaniu w TBS-A i przez taki sam czas w TBS-B. Przeplukane skrawki inkubowano przez 45 minut z biotynylowanym kozim przeciwciałem II-rzędowym skierowanym przeciwko szczurzym IgG w stężeniu 1:200. Po inkubacji skrawki ponownie dwukrotnie przeplukano, najpierw w TBS-A, a potem w TBS-B. Następnie skrawki inkubowano przez 1 godzinę z roztworem ekstrawidyny skoniugowanej z peroksydazą chrzanową w TBS w stężeniu 1:200. Peroksydaza została wykryta w 3-minutowej reakcji z 0,05% roztworem 3,3'-diaminobenzidyny (DAB) i 0,003% roztworem nadtlenu wodoru w obecności jonów niklu. W wyniku reakcji powstaje szaro-czarny produkt nierozpuszczalny w wodzie i większości rozpuszczalników organicznych. Ostatnim etapem było 3-krotne, 5-minutowe przeplukanie skrawków w TBS. Wolno pływające skrawki naniesiono na żelatynowane szkiełka w porządku wg struktur anatomicznych. Następnie skrawki zostały odwodnione poprzez zanurzanie szkiełek na 2 minuty kolejno w roztworach: 50% etanolu, 70% etanolu, 96% etanolu, 100% etanolu, 100% etanolu z ksylenem w stosunku 1:2, 100% etanolu z ksylenem w stosunku 2:1 oraz w ksylenie. Szkiełka ze skrawkami zabezpieczono pokrywając je DePeX i niezwłocznie przykrywając szkiełkiem nakrywkowym.



#### **3.5.4.2 Ocena kolokalizacji BrdU z markerami komórek układu nerwowego**

Losowo wybrane serie skrawków wolnoptywających zostały poddane podwójnemu barwieniu w celu oznaczenia kolokalizacji BrdU z neuronalnym białkiem neurofilamentowym (ang. *neuronal nuclear protein*, NeuN) lub BrdU z kwaśnym białkiem włókienkowym (ang. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP). Skrawki przepłukano w TBS, a następnie inkubowano w buforze blokującym (10% NGS i 1% BSA w TBS-A) przez 1 godzinę. W kolejnym kroku skrawki pozostawiono przez noc w temperaturze 4°C w roztworze króliczych przeciwciał I-rzędowych skierowanych: przeciwko NeuN w stężeniu 1:20 lub GFAP w stężeniu 1:500 w TBS-T z dodatkiem 5% NGS i 0,5% BSA. Kolejnego dnia, skrawki płukano 3-krotnie przez 30 minut w TBS-T, po czym inkubowano przez 1 godzinę z kozim II-rzędowym przeciwciałem skierowanym przeciwko króliczym IgG skoniugowanym z fluorochromem Alexa Fluor® 568 w stężeniu 1:600 w dwukrotnie rozcieńczonym buforze blokującym. Aby zwiększyć dostępność BrdU oraz zminimalizować niespecyficzne barwienie skrawki inkubowano kolejno z 2xSSC, 2 N HCl, 0,1 M kwasem borowym oraz 10% NGS w TBS-T. Następnie skrawki inkubowano przez noc w temperaturze 4°C ze szczurzym przeciwciałem skierowanym przeciwko BrdU w stężeniu 1:1000 w dwukrotnie rozcieńczonym buforze blokującym. Następnego dnia skrawki inkubowano przez 1 godzinę z biotynylowanym kozim przeciwciałem II-rzędowym skierowanym przeciwko szczurzym IgG w stężeniu 1:100 w dwukrotnie rozcieńczonym buforze blokującym. Po trzykrotnym 10-minutowym przepłukaniu w TBS skrawki inkubowano przez 1 godzinę z roztworem streptawidyny skoniugowanej z fluoochromem Alexa Fluor® 488 w stężeniu 1:1600 w TBS. Po przepłukaniu skrawki ułożono na szkiełkach mikroskopowych i pokryto 60% glicerolem w PBS.

#### **3.5.4.3 Analiza danych**

Zdjęcia skrawków zabarwionych immunohistochemicznie na obecność BrdU wykonano przy pomocy mikroskopu Olympus BX61V8 z systemem automatycznie skanującym preparaty Olympus SV120, podłączonego do komputera z oprogramowaniem Olympus VS-ASW-S5 (Olympus, Tokio, Japonia). Liczba neuronów posiadających BrdU w DG została policzona manualnie w obrębie prostokątnego obszaru o wymiarach 1600x900  $\mu\text{m}^2$

w czterech reprezentatywnych skrawkach z mózgu każdej myszy po jednym z części przedniej hipokampa, dwóch ze środkowej i jednym z tylnej. Skrawki zostały wybrane w obrębie całego DG w odległości mieszczącej się w zakresie od -1,4 do -3,4 mm od bregmy [Paxinos i Franklin, 2013].

Zdjęcia podwójnie barwionych skrawków na obecność BrdU i NeuN lub BrdU i GFAP wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego z wirującym dyskiem (Zeiss, Niemcy). Komórki znakowane BrdU policzono w dwóch skrawkach DG na mysz w czterech kwadratowych obszarach o powierzchni 125 000  $\mu\text{m}^2$  w celu oceny kolokalizacji komórek zawierających BrdU z NeuN i BrdU z GFAP. Liczba powstałych w okresie podawania MDPV neuronów (komórek z kolokalizacją BrdU z NeuN) lub astrocytów (komórek z kolokalizacją BrdU z GFAP) została wyrażona jako odsetek komórek zawierających BrdU.

### **3.6. Ocena ekspresji białek związanych z neurogenezą i neuroplastycznością hipokampa**

#### **3.6.1. Izolacja hipokampa**

Izolację hipokampa wykonano wg López-Arnau i wsp. (2015) z modyfikacjami. Myszy poddano eutanazji poprzez dyslokację kręgów szyjnych. Wyizolowany mózg zważono i położono na szkiełko zegarkowe umieszczone na lodzie. Następnie wyizolowano hipokamp według granic anatomicznych i umieszczono go w probówce typu eppendorf. Po zważeniu hipokampa próbówki zamrożono w suchym lodzie, a następnie przechowywano je w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu ich wykorzystania.

#### **3.6.2. Homogenizacja tkanek**

Hipokamp homogenizowano w buforze lizującym RIPA z dodatkiem inhibitora proteaz przy użyciu plastikowego homogenizatora ręcznego w dwóch etapach trwających po 10 sekund, podczas homogenizacji i pomiędzy etapami próbówki były pozostawione w lodzie. Homogenat hipokampa odwirowano przez 45 minut przy prędkości 13 900 x g (20 800 rpm) w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$  (wirówka MPW-351RH, MPW Med. Instruments; Warszawa, Polska). Otrzymany supernatant przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.6.3. Pomiar zawartości białka w próbkach**

Do oceny zawartości białka w każdej z próbek zastosowano metodę Bradforda. Metoda ta polega na wiązaniu się białka z barwnikiem Coomassie Blue G250 w jego formie anionowej o niebieskim zabarwieniu, wykazującej maksymalną absorbancję przy długości fali 590 nm. Wartość absorbancji jest wprost proporcjonalna do ilości białka zawartego w próbce [Kruger i wsp., 2009]. Odczynnik Bradforda rozcieńczono wodą destylowaną w stosunku 1:4. Standard białkowy BSA o stężeniu 1,41 mg/ml naniesiono na płytkę 96-dołkową w objętościach 0-5  $\mu$ l (co 0,5  $\mu$ l) w czterech powtórzeniach, aby wykreślić krzywą wzorcową absorbancji. Porcje supernatantu hipokampa rozcieńczono 10-krotnie buforem RIPA i naniesiono w czterech powtórzeniach na tę samą płytkę 96-dołkową co standard białkowy. Do każdego dołka dodano po 200  $\mu$ l odczynnika Bradforda, płytkę przykryto wieczkiem i pozostawiono na 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie zdjęto wieczko i zmierzono absorbancję przy długości fali 595 nm z zastosowaniem czytnika mikroplatek Sunrise (Tecan, Szwajcaria) i oprogramowania XFluor4 (Tecan, Szwajcaria).

### **3.6.4. Oznaczenia ekspresji białek metodą Western blot**

Metoda Western blot jest powszechnie stosowana do identyfikacji określonych białek w ich mieszaninie. Polega ona na rozdzieleniu białek wg ich masy molowej przy zastosowaniu elektroforezy, a następnie przeniesieniu na membranę nitrocelulozową i inkubacji z przeciwciałami wiążącymi się specyficznym z badanymi białkami w celu ich uwidocznienia na membranie i oceny ekspresji [Mahmood i Yang, 2012].

#### **3.6.4.1 Przygotowanie próbek lizatów białkowych**

Z każdej próbki supernatantu pobrano porcję odpowiadającą zawartości 30  $\mu$ g lub 7,5  $\mu$ g białka w przypadku wykonywania odpowiednio oznaczeń ekspresji synaptofizyny (ang. *synaptophysin*; SYP) i białka gęstości postsynaptycznej (ang. *postsynaptic density protein*; PSD95), po czym dopełniono do 5  $\mu$ l buforem RIPA z dodatkiem inhibitora proteaz. Następnie, pod wyciągiem, do każdej próbki dodano 5  $\mu$ l dwukrotnie stężonego buforu Laemmli zawierającego czynnik denaturujący – dodecylsulfian sodu

(ang. *sodium dodecyl sulphate*, SDS) i merkaptoetanol. Całość szybko odwirowano i wytrząsnięto. Otrzymane próbki umieszczono w łaźni suchej i ogrzewano przez 7 minut w temperaturze 94°C w celu denaturacji białek. Po inkubacji próbki umieszczono w lodzie w celu schłodzenia, a następnie odwirowano.

#### **3.6.4.2 Elektroforeza białek**

Komorę do elektroforezy zalano 1x buforem MES o pH = 7,3. W naczyniu umieszczono 15-dołkowy 4-12% żel poliakryloamidowy NuPAGE Bis-Tris. Po upewnieniu się, że cały żel jest zanurzony w buforze, wyjęto grzebień. Lizat białkowy naniesiono na żel objętości 10 µl na ścieżkę. Na skrajne ścieżki naniesiono po 2 µl roztworu wzorca masy molekularnej Chameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder uzupełnione do 10 µl buforem Laemmli. Elektroforezę przeprowadzono w naczyniu z lodem, pod napięciem 120 V przez 80 minut, do momentu, kiedy czoło zabarwionych białek dotarło na dół żelu (około 1 cm od krawędzi kasety).

#### **3.6.4.3 Transfer rozdzielonych białek na membranę**

„Kanapki” do transferu wykonano wykorzystując specjalne kratki, do których kolejno wkładano zwilżone buforem do transferu: gąbkę, bibułę filtrującą, membranę nitrocelulozową, na którą ostrożnie przełożono żel; bibułę filtrującą i gąbkę, po czym zamknięto kratki. „Kanapki” umieszczono w komorze do transferu, zawierającym bufor transferowy (roztwór 20% metanolu w wodzie, 12 mM Trizma Base, 96 mM glicyny). Transfer białek prowadzono przez 1 godzinę, przy natężeniu prądu 150 mA stosując wkłady chłodzące w celu obniżenia temperatury buforu. Dalszą część doświadczenia prowadzono w temperaturze pokojowej. Membrany blokowano przez 1 godzinę w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBS-T na wytrząsarce kołyskowej.

#### **3.6.4.4 Inkubacja membrany z przeciwciałami**

Całonocną inkubację membran z przeciwciałami przeprowadzono w chłodni, umieszczając pojemniki na wytrząsarce. Wszystkie roztwory przeciwciał zostały przygotowane w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBS-T. Membrany zalano roztworem przeciwciał I-rzędowych skierowanych

przeciwko badanym białkom: SYP (królicze, stężenie 1:1000) i PSD95 (królicze, stężenie 1:4000), a także przeciwko  $\beta$ -aktynie – ang. *actin beta*; ACTB (mysie, stężenie 1:2000), służącej jako białko referencyjne względem, którego przeprowadzono normalizację. Następnego dnia membrany 3-krotnie przepłukano TBS-T przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po przepłukaniu membrany inkubowano w warunkach ochrony przed światłem z roztworami II-rzędowych przeciwciał: przeciwciało ośle skierowano przeciwko króliczym IgG, (stężenie 1:10000) i przeciwciało ośle skierowano przeciwko mysim IgG (stężenie 1:10000) i w 5% roztworze mleka w TBS-T przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie membrany jednokrotnie przepłukano roztworem TBS-T.

#### **3.6.4.5 Pomiar intensywności sygnału i kwantyfikacja**

W celu detekcji białek dokonano pomiaru intensywności fluorescencji przy pomocy czytnika LI-COR Odyssey DLx (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) i skwantyfikowano używając zintegrowanego programu Image Studio wersja 5.2. Ekspresję SYP i PSD95 znormalizowano w oparciu o ACTB i przedstawiono jako procent kontroli z tego samego żelu.

### **3.7. Analiza statystyczna wyników**

Wszystkie analizy statystyczne zostały przeprowadzone przy użyciu programu RStudio wersja 2022.12.0.353 (Posit Software, PBC, Boston, MA, USA). Wyniki dostosowano do liniowego modelu mieszanego, w którym uwzględniono czynniki stałe (podany związek, płeć) oraz czynnik losowy (miot). Następnie przeprowadzono dwuczynnikową analizę wariancji (podany związek  $\times$  płeć) lub dwuczynnikową analizę wariancji (podany związek  $\times$  płeć) dla powtórzonych pomiarów, aby określić, czy wystąpił istotny wpływ czynników stałych i ich interakcji. W analizie wyników testu NOR dodatkowo zastosowano test t-Studenta dla jednej próby, aby porównać wartość indeksu preferencji myszy z teoretyczną wartością wynoszącą 50%, która wskazuje na losowy wybór obiektu. Różnice pomiędzy grupami sprawdzono przy użyciu testu *post hoc* Tukey'a. Różnice uznano za istotne statystycznie w przypadku, gdy  $p < 0,05$ . Ponieważ we wszystkich przeprowadzonych analizach nie wykazano istotnej statystycznie interakcji między podaniem MDPV a płcią, wyniki dla samców

i samic przeanalizowano łącznie przy pomocy testu *post hoc* i zaprezentowano razem na wykresach. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  błąd standardowy średniej (SEM). Liczba powtórzeń (n) w każdym eksperymencie odnosi się do liczby myszy wykorzystanych w doświadczeniu.

Ryciny przygotowano przy pomocy programu GraphPad Prism wersja 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Wzory związków chemicznych przygotowano w ChemSketch, wersja 2023.1.2, (Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs), Toronto, ON, Canada, [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com)).

## 4. Wyniki

### 4.1. Wpływ MDPV na śmiertelność

Śmiertelność na etapie podawania związków wyniosła 7,69% (2 osobniki w grupie kontrolnej, 1 osobnik w grupie otrzymującej MDPV w dawce 10 mg/kg i 3 osobniki w grupie otrzymującej MDPV w dawce 20 mg/kg) [Tabela II].

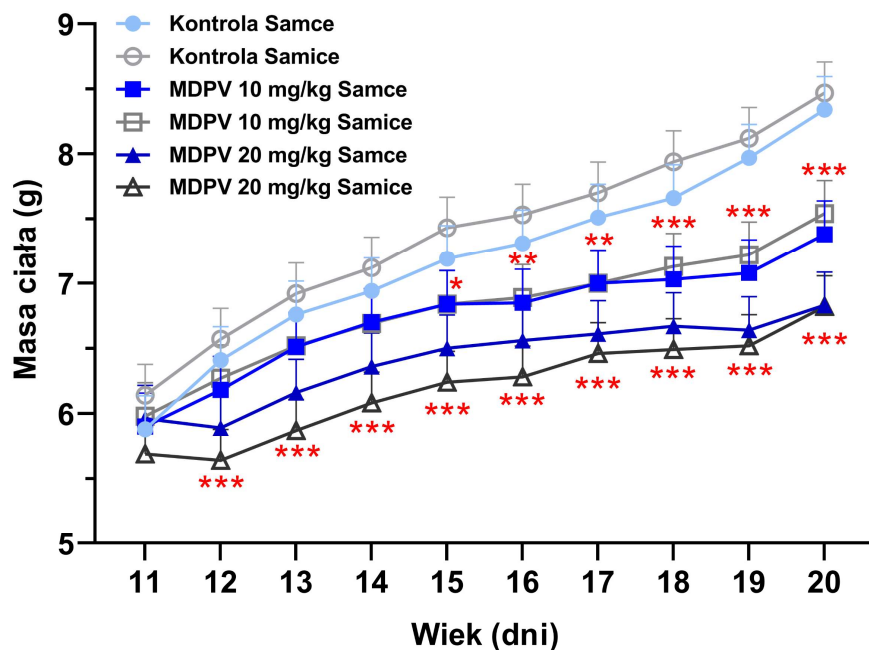
*Tabela II Śmiertelność w wieku PD11-20 w zależności od płci i podanego związku*

Związek	Ogólna	Samce	Samice
0,9% NaCl	2/26 (7,69%)	1/13 (7,69%)	1/13 (7,69%)
MDPV 10 mg/kg	1/25 (4,00%)	0/12 (0%)	1/13 (7,69%)
MDPV 20 mg/kg	3/27 (11,11%)	2/14 (14,28%)	1/13 (7,69%)

### 4.2. Wpływ MDPV na przyrost masy ciała

Dwuczynnikowa analiza wariancji dla powtórzonych pomiarów wyników uzyskanych dla myszy, którym podawano MDPV w dawkach 10 i 20 mg/kg oraz grupy kontrolnej wykazała istotny wpływ MDPV [F (2, 61) = 33,998;  $p < 0,001$ ], dnia [F (9, 591) = 249,889;  $p < 0,001$ ] oraz interakcji MDPV i dnia [F (18, 591) = 13,888;  $p < 0,001$ ] na masę ciała myszy. Płeć nie miała wpływu na masę ciała myszy [F (1, 55) = 0,015;  $p = 0,904$ ]. Nie wykazano również istotnej interakcji pomiędzy MDPV i płcią [F (2, 60) = 1,510;  $p = 0,229$ ].

MDPV w dawce 10 mg/kg spowodował spowolnienie przyrostu masy ciała myszy od 5. do 10. dnia podawania (odpowiednio od 15. do 20. dnia życia). Masa ciała myszy w grupie otrzymującej MDPV w dawce 20 mg/kg była niższa od masy ciała myszy z grupy kontrolnej od drugiego do ostatniego dnia podawania związku (12-20 dzień życia) [Ryc. 6].



Ryc. 6. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na masę ciała myszy w okresie podawania związku. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli.

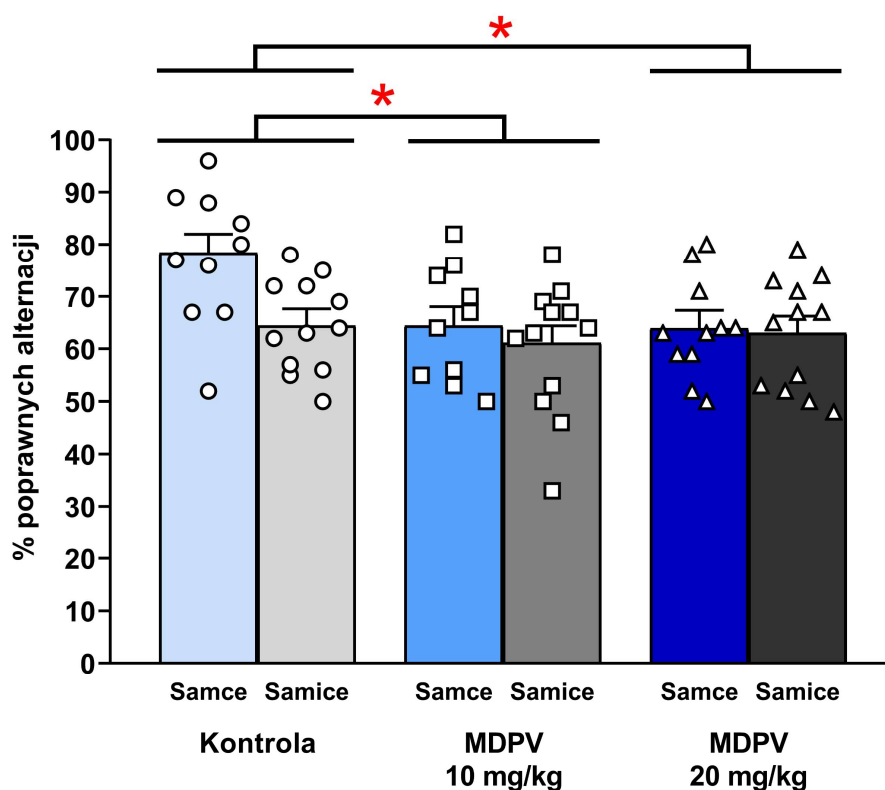
W dniu uśmiercenia, po ukończeniu badań behawioralnych, ponownie zważono myszy. Dwuczynnikowa analiza wariancji wyników uzyskanych dla grup myszy, które otrzymały MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg oraz grupy kontrolnej nie wykazała istotnego wpływu MDPV na masę ciała myszy [ $F(2, 54) = 0,472$ ;  $p = 0,626$ ] [dane nieprzedstawione na rycinie].



### 4.3. Wpływ MDPV na roboczą pamięć przestrzenną

Dwuczynnikowa analiza wariancji wyników uzyskanych dla myszy, którym podawano MDPV w dawkach 10 i 20 mg/kg oraz grupy kontrolnej wykazała istotny wpływ MDPV [ $F(2, 53) = 4,733$ ;  $p = 0,013$ ] oraz płci [ $F(1, 59) = 5,473$ ;  $p = 0,023$ ] na roboczą pamięć przestrzenną myszy ocenianą przy pomocy testu spontanicznej alternacji. Jednak nie wystąpiła istotna statystycznie interakcja MDPV i płci [ $F(2, 52) = 2,602$ ;  $p = 0,084$ ].

MDPV w obu podawanych dawkach wywołał istotne zaburzenia roboczej pamięci przestrzennej u myszy. Myszy z grupy kontrolnej uzyskały średnio 71,4% poprawnych trójek wejść do ramion labiryntu (samce: 78,4%, samice: 64,4%). Podczas gdy dla grup otrzymujących MDPV w dawce 10 mg/kg odsetek poprawnych alternacji wyniósł średnio 62,8% (samce: 63,9%, samice: 61,1%), a dla grup traktowanych dawką 20 mg/kg wyniósł średnio 63,5% (samce: 63,9%, samice: 63,5%) [Ryc. 7].



Ryc. 7. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na roboczą pamięć przestrzenną myszy. Wyniki przedstawiono jako indywidualne wartości oraz jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 10-12$ ). \* $p < 0,05$  względem kontroli.

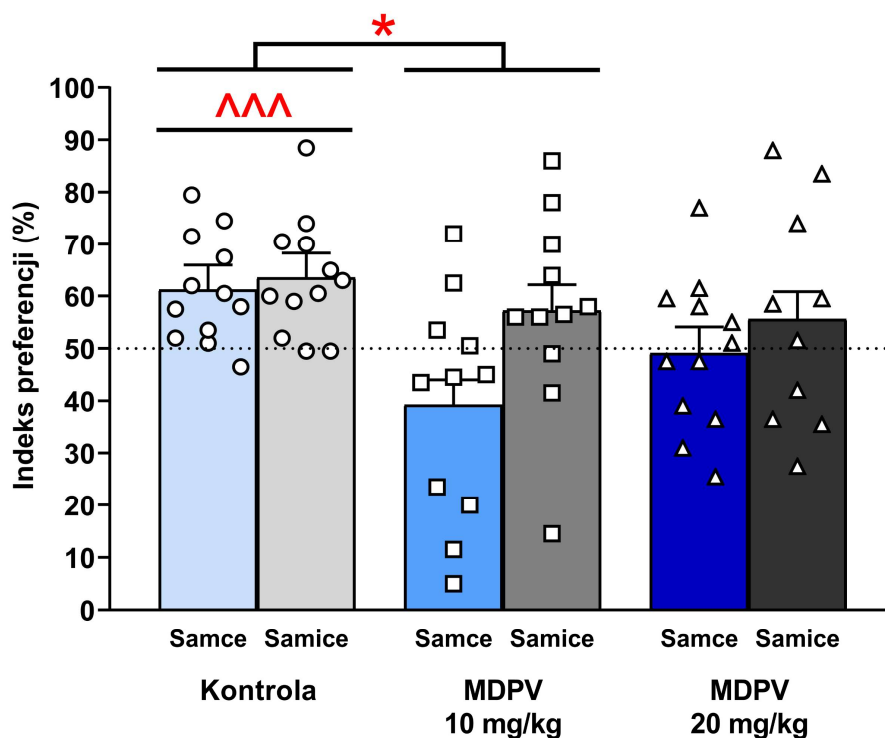
## 4.4. Wpływ MDPV na zdolność rozpoznawania obiektów

### 4.4.1. Retencja 3-godzinna

Dwuczynnikowa analiza wariancji wyników uzyskanych dla myszy, którym podawano MDPV w dawkach 10 i 20 mg/kg oraz grupy kontrolnej wykazała istotny wpływ MDPV [ $F(2, 62) = 4,487$ ;  $p = 0,015$ ] i płci [ $F(1, 62) = 4,749$ ;  $p = 0,033$ ] na odsetek czasu spędzonego na eksploracji nowego obiektu po okresie 3-godzinnej retencji. Jednak nie wykazano istotnej interakcji MDPV i płci [ $F(2, 62) = 1,362$ ;  $p = 0,264$ ].

MDPV w dawce 10 mg/kg upośledzał zdolność myszy do rozpoznawania nowego obiektu po 3-godzinnej retencji. Średni indeks preferencji myszy w grupie otrzymującej MDPV w dawce 10 mg/kg wyniósł 48,2% (samce: 39,2%, samice: 57,2%), w porównaniu do 62,3% (samce: 61,2%, samice: 63,5%) w grupie kontrolnej. Natomiast MDPV w dawce 20 mg/kg nie zaburzał zdolności poznawczych myszy w odniesieniu do kontroli [Ryc. 8].

Test t-Studenta dla jednej próby, wykazał, iż wartość indeksu preferencji myszy z grupy kontrolnej była znamienne wyższa od 50% [ $t(23) = 5,703$ ;  $p < 0,001$ ]. Natomiast dla myszy traktowanych MDPV w dawce 10 mg/kg [ $t(21) = 0,381$ ;  $p = 0,707$ ] i 20 mg/kg [ $t(21) = 0,552$ ;  $p = 0,587$ ] nie różniła się istotnie statystycznie od 50%. Dowodzi to losowości wyboru eksplorowanego obiektu i może świadczyć o tym, że myszy z obu grup otrzymujących MDPV nie zapamiętały uprzednio poznanego obiektu [Ryc. 8].



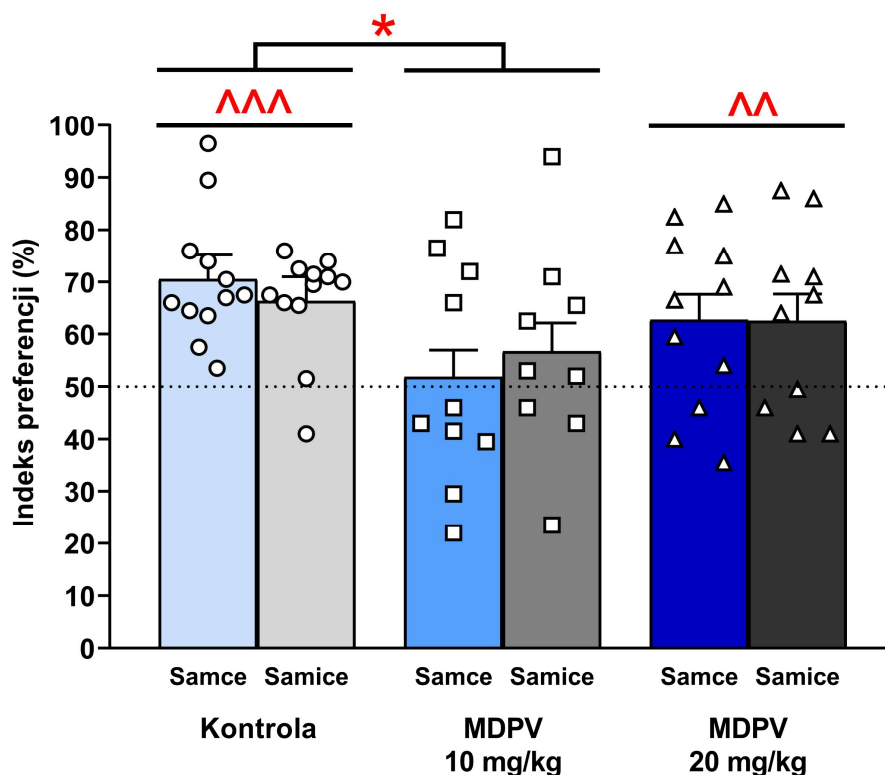
Ryc. 8. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na zdolność rozpoznawania nowego obiektu przez myszy po 3 h retencji. Wyniki przedstawiono jako indywidualne wartości oraz jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 10-12$ ). \* $p < 0,05$  względem kontroli.  $^^^p < 0,001$  w porównaniu poziomu losowego w teście t-Studenta jednej próby.

#### 4.4.2. Retencja 24-godzinna

Dwuczynnikowa analiza wariancji wyników uzyskanych dla myszy, którym podawano MDPV w dawkach 10 i 20 mg/kg oraz grupy kontrolnej wykazała istotny wpływ MDPV [ $F(2, 58) = 4,065$ ;  $p = 0,022$ ] na odsetek czasu spędzonego na eksploracji nowego obiektu przez myszy po 24-godzinnej retencji. Płeć nie miała wpływu na odsetek czasu spędzonego na eksploracji nowego obiektu [ $F(1, 58) = 0,002$ ;  $p = 0,965$ ], podobnie jak nie wystąpiła istotna interakcja pomiędzy MDPV a płcią [ $F(2, 58) = 0,410$ ;  $p = 0,666$ ].

MDPV w dawce 10 mg/kg upośledzał zdolność samców do rozpoznawania nowego obiektu po 24-godzinnej retencji. Indeks preferencji myszy traktowanych MDPV w dawce 10 mg/kg wyniósł 54,3% – 51,8% u samców i 56,7% u samic, w porównaniu do średniej 68,4% uzyskanej w grupie kontrolnej – 70,5% dla samców i 66,3% dla samic. Natomiast MDPV w dawce 20 mg/kg nie zaburzał zdolności poznawczych myszy w porównaniu do grupy kontrolnej [Ryc. 9].

Test t-Studenta dla jednej próby, wykazał, iż wartość indeksu preferencji myszy z grupy kontrolnej [ $t(23) = 8,043$ ;  $p < 0,001$ ] i traktowanych MDPV w dawce 20 mg/kg [ $t(20) = 3,437$ ;  $p = 0,003$ ] była znamienne wyższa od 50%. Natomiast dla myszy otrzymujących MDPV w dawce 10 mg/kg nie różniła się istotnie statystycznie od 50% [ $t(20) = 0,643$ ;  $p = 0,528$ ] [Ryc. 9], wskazując na upośledzenie pamięci rozpoznawczej w tej grupie.

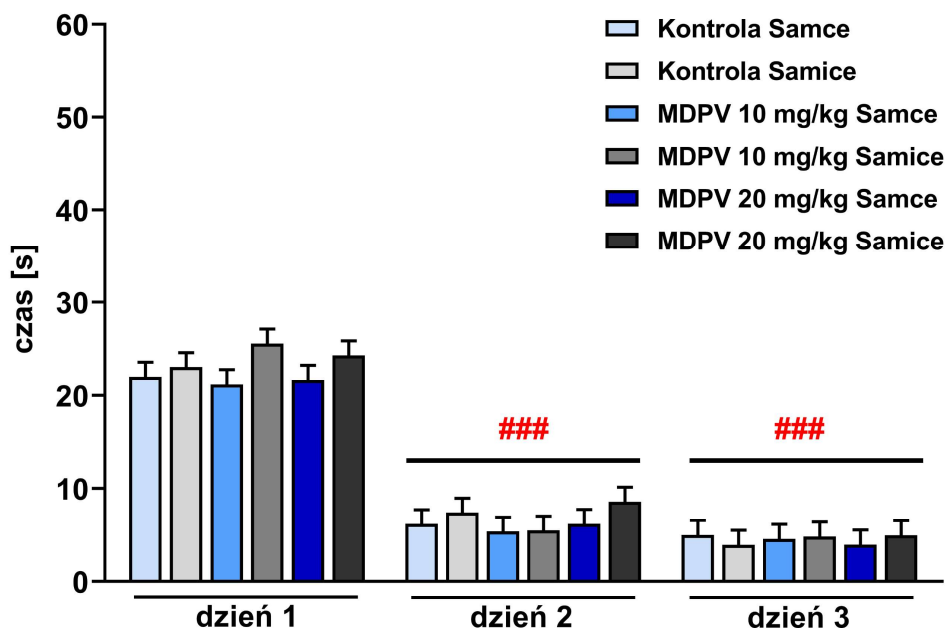


Ryc. 9. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na zdolność rozpoznawania nowego obiektu przez myszy po 24 h retencji. Wyniki przedstawiono jako indywidualne wartości oraz jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 9-12$ ). \* $p < 0,05$  względem kontroli. ^^ $p < 0,01$ ; ^^ $p < 0,001$  w porównaniu do poziomu losowego w teście t-Studenta jednej próby.

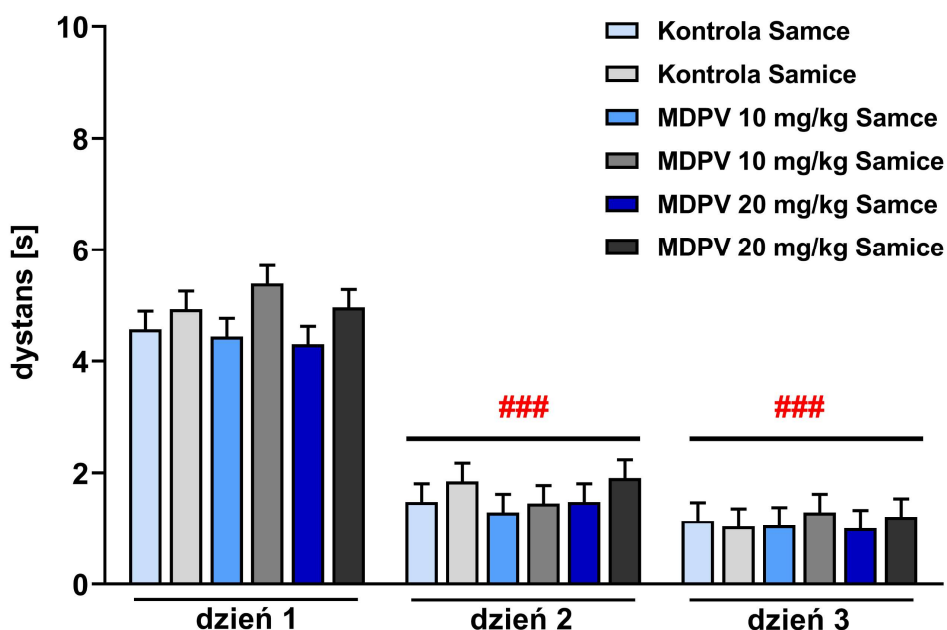
## 4.5. Wpływ MDPV na pamięć przestrzenną w teście labiryntu wodnego Morrisa

### 4.5.1. Trening z widoczną platformą

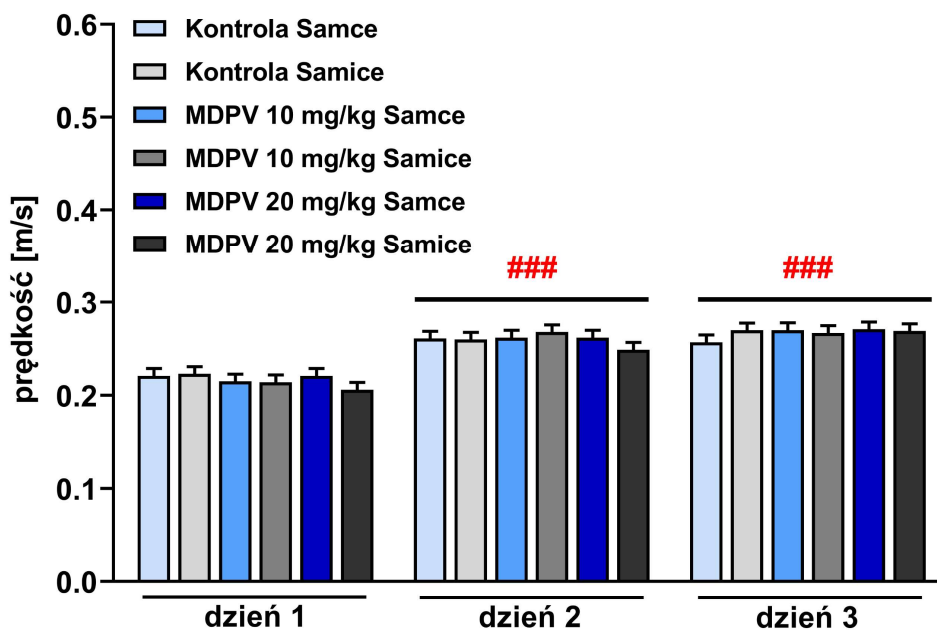
Dwuczynnikowa analiza wariancji dla powtórzonych pomiarów wyników uzyskanych dla myszy, którym podawano MDPV w dawkach 10 i 20 mg/kg oraz grupy kontrolnej nie wykazała istotnego wpływu MDPV na czas wpłynięcia na platformę [ $F(2, 56) = 0,069$ ;  $p = 0,933$ ] [Ryc. 10], pokonany dystans [ $F(2, 198) = 0,008$ ;  $p = 0,992$ ] [Ryc. 11], czy osiąganą prędkość [ $F(2, 58) = 0,164$ ;  $p = 0,849$ ] [Ryc. 12]. Wykazano istotny wpływ płci na długość przebytego dystansu [ $F(2, 198) = 5,515$ ;  $p = 0,020$ ], ale nie na czas wpłynięcia na platformę [ $F(1, 64) = 3,159$ ;  $p = 0,080$ ] i osiąganą prędkość [ $F(1, 64) = 0,101$ ;  $p = 0,752$ ]. Nie wykazano istotnej statystycznie interakcji MDPV i płci w przypadku czasu wpłynięcia na platformę [ $F(2, 55) = 0,517$ ;  $p = 0,599$ ], pokonanego dystansu [ $F(2, 198) = 0,260$ ;  $p = 0,771$ ] i osiąganego prędkości [ $F(2, 57) = 1,074$ ;  $p = 0,348$ ]. Natomiast wykazano, istotny wpływ dnia treningu na czas wpłynięcia na platformę [ $F(2, 132) = 277,543$ ;  $p < 0,001$ ], pokonany dystans [ $F(2, 198) = 222,996$ ;  $p < 0,001$ ] i osiąganą prędkość [ $F(2, 132) = 126,942$ ;  $p < 0,001$ ]. Czas wpłynięcia na platformę [Ryc. 10] i pokonany dystans [Ryc. 11] skrócił się, a osiągnięta prędkość [Ryc. 12] wzrosła w drugim i trzecim dniu w porównaniu do dnia pierwszego, co świadczy o efektywnym treningu i braku zaburzeń motorycznych u zwierząt.



Ryc. 10. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na czas wpłynięcia myszy na platformę podczas fazy treningu z widoczną platformą. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ) z czterech sesji każdego dnia treningu. ### $p < 0,001$  względem dnia pierwszego.



Ryc. 11. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na dystans przebyty przez myszy podczas fazy treningu z widoczną platformą. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ) z czterech sesji każdego dnia treningu. ### $p < 0,001$  względem dnia pierwszego.

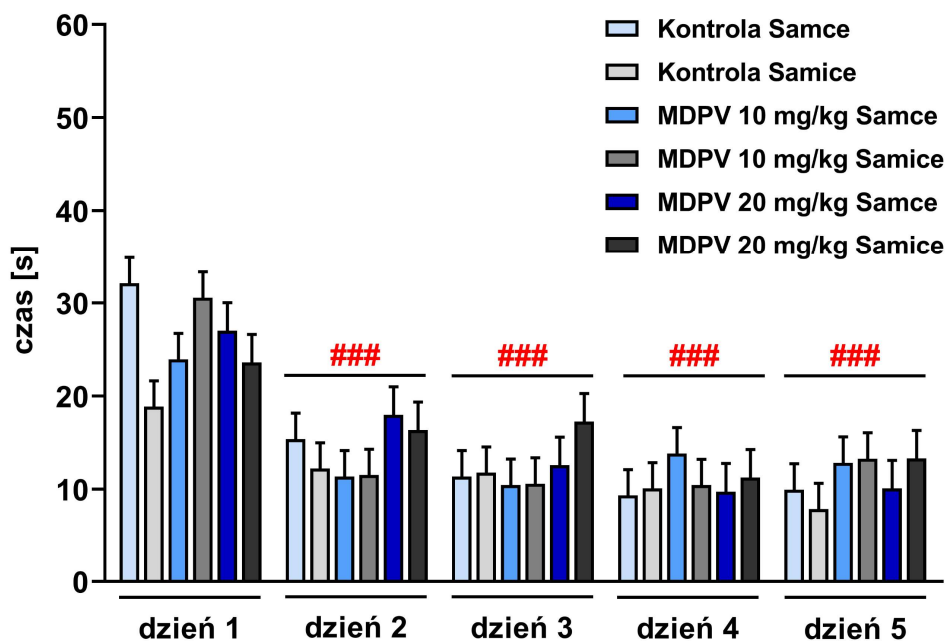


Ryc. 12. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na prędkość osiąganą przez myszy podczas fazy treningu z widoczną platformą. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ) z czterech sesji każdego dnia treningu. ### $p < 0,001$  względem dnia pierwszego.

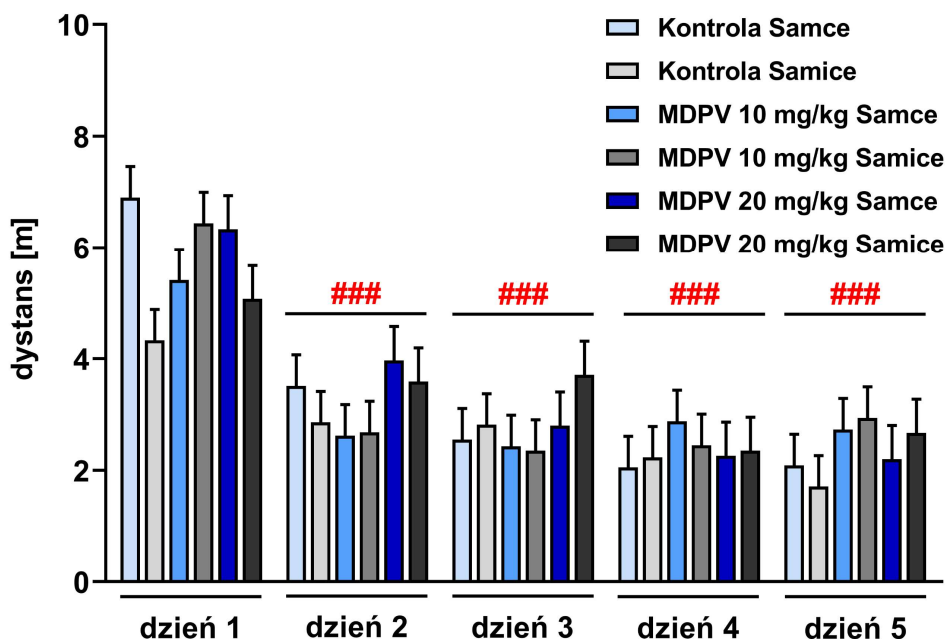
#### 4.5.2. Nauka przestrzenna lokalizacji platformy

Dwuczynnikowa analiza wariancji dla powtórzonych pomiarów wyników uzyskanych dla myszy otrzymujących MDPV w dawkach 10 i 20 mg/kg oraz grupy kontrolnej nie wykazała istotnego wpływu MDPV na czas wplynięcia na platformę [F (2, 54) = 0,941;  $p = 0,396$ ] [Ryc. 13], długość pokonanego dystansu [F (2, 54) = 0,891;  $p = 0,416$ ] [Ryc. 14], odsetek czasu spędzonego w strefie z platformą [F (2, 55) = 1,650;  $p = 0,202$ ] [Ryc. 15] i na odsetek dystansu przebytego w strefie z platformą [F (2, 54) = 0,512;  $p = 0,602$ ] [Ryc. 16]. Wykazano brak wpływu płci na czas wplynięcia na platformę [F (1,60) = 0,228;  $p = 0,635$ ], długość przebytego dystansu [F (4, 248) = 43,924;  $p < 0,001$ ], odsetek czasu spędzonego w strefie z platformą [F (1, 61) = 0,028;  $p = 0,868$ ] i na odsetek dystansu przebytego w strefie z platformą [F (1, 61) = 0,259;  $p = 0,613$ ]. Nie wykazano istotnej statystycznie interakcji MDPV i płci w przypadku czasu wplynięcia na platformę [F (2, 52) = 1,572;  $p = 0,217$ ], długości przebytego dystansu [F (2, 53) = 1,104;  $p = 0,339$ ], odsetka czasu spędzonego w strefie z platformą [F (2, 53) = 1,407;  $p = 0,254$ ] i odsetka dystansu przebytego w strefie z platformą [F (2, 52) = 1,254;  $p = 0,294$ ]. Wykazano istotny wpływ dnia nauki przestrzennej na czas wplynięcia na platformę [F (4, 248) = 35,801;  $p < 0,001$ ], długość pokonanego dystansu [F (4, 248) = 43,924;  $p < 0,001$ ], odsetek czasu spędzonego w strefie z platformą [F (4, 248) = 57,380;  $p < 0,001$ ] i odsetek dystansu przebytego w strefie z platformą [F (4, 248) = 54,255;  $p < 0,001$ ]. W dniach od drugiego do piątego w porównaniu do dnia pierwszego, czas wplynięcia na platformę [Ryc. 13] i długość przebytego dystansu [Ryc. 14] uległy znamiennej skróceniu, natomiast odsetek czasu spędzonego w strefie z platformą [Ryc. 15] i odsetek dystansu przebytego w strefie z platformą [Ryc. 16] uległ istotnemu wydłużeniu, co wskazuje, że myszy ze wszystkich grup nauczyły się wplywać na platformę zanurzoną pod powierzchnią wody.

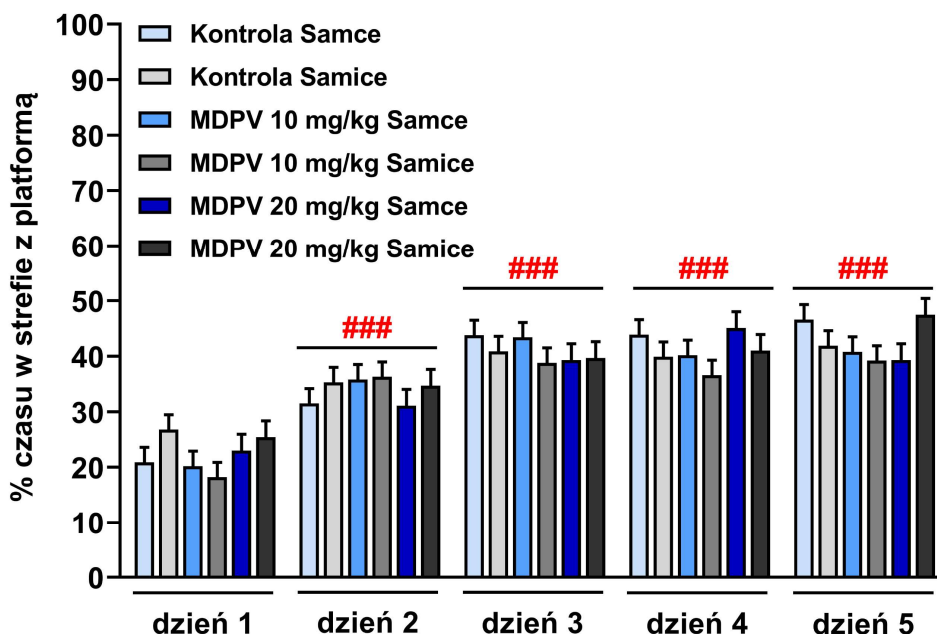




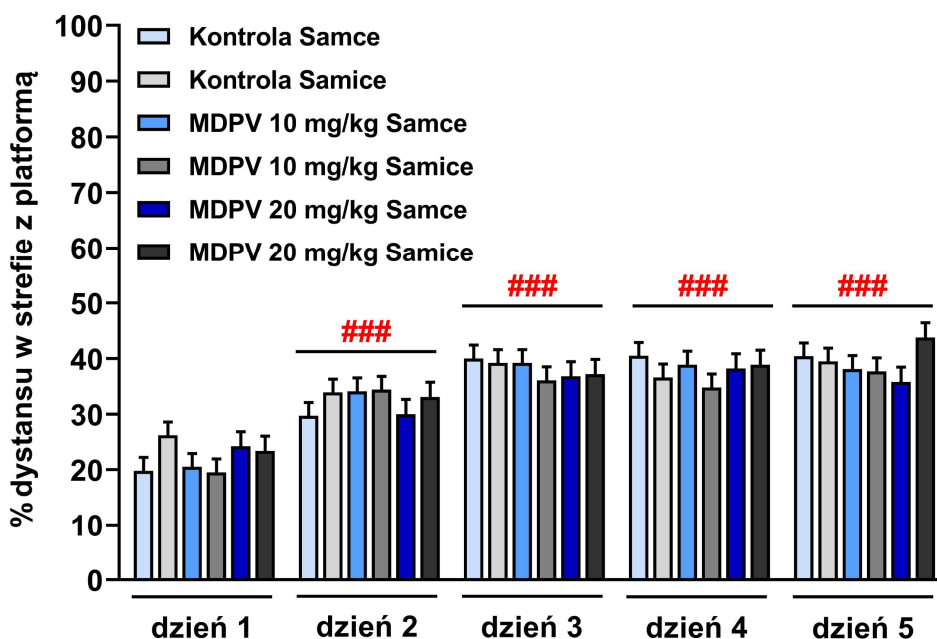
Ryc. 13. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na czas wpłynięcia myszy na platformę podczas fazy nauki przestrzennej lokalizacji platformy. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 10-12$ ) z czterech sesji każdego dnia nauki przestrzennej. ### $p < 0,001$  względem dnia pierwszego.



Ryc. 14. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na dystans pokonany przez myszy podczas fazy nauki przestrzennej lokalizacji platformy. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 10-12$ ) z czterech sesji każdego dnia nauki przestrzennej. ### $p < 0,001$  względem dnia pierwszego.



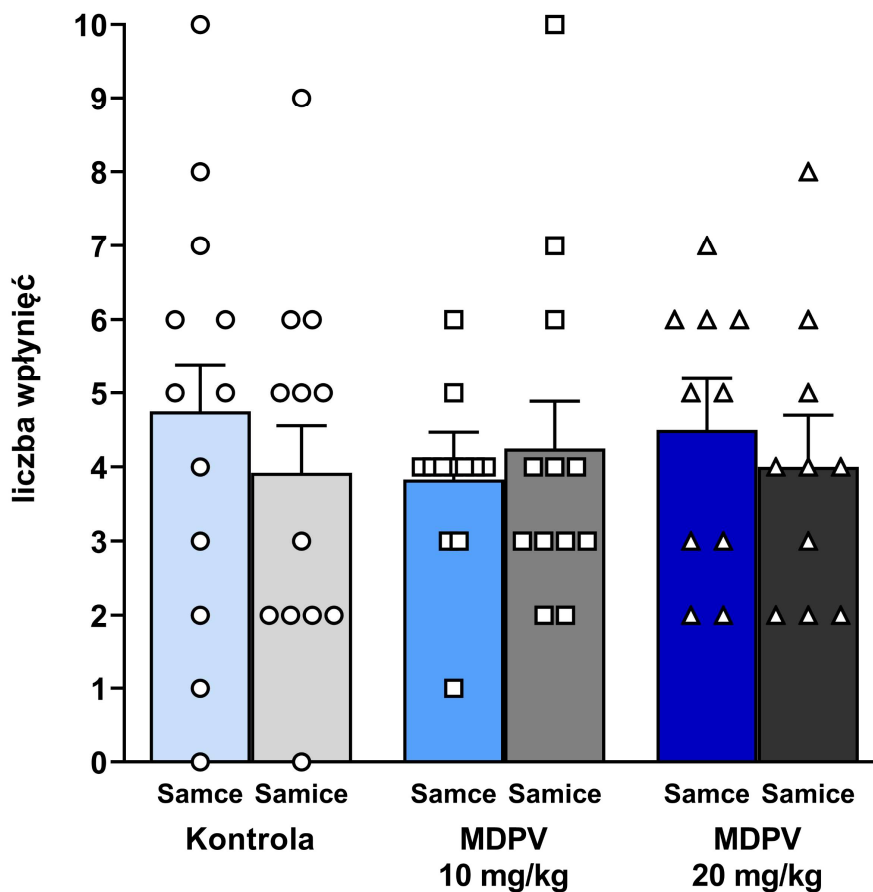
Ryc. 15. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek czasu spędzonego przez myszy w strefie z platformą podczas fazy nauki przestrzennej lokalizacji platformy. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 10-12$ ) z czterech sesji każdego dnia nauki przestrzennej. ### $p < 0,001$  względem dnia pierwszego.



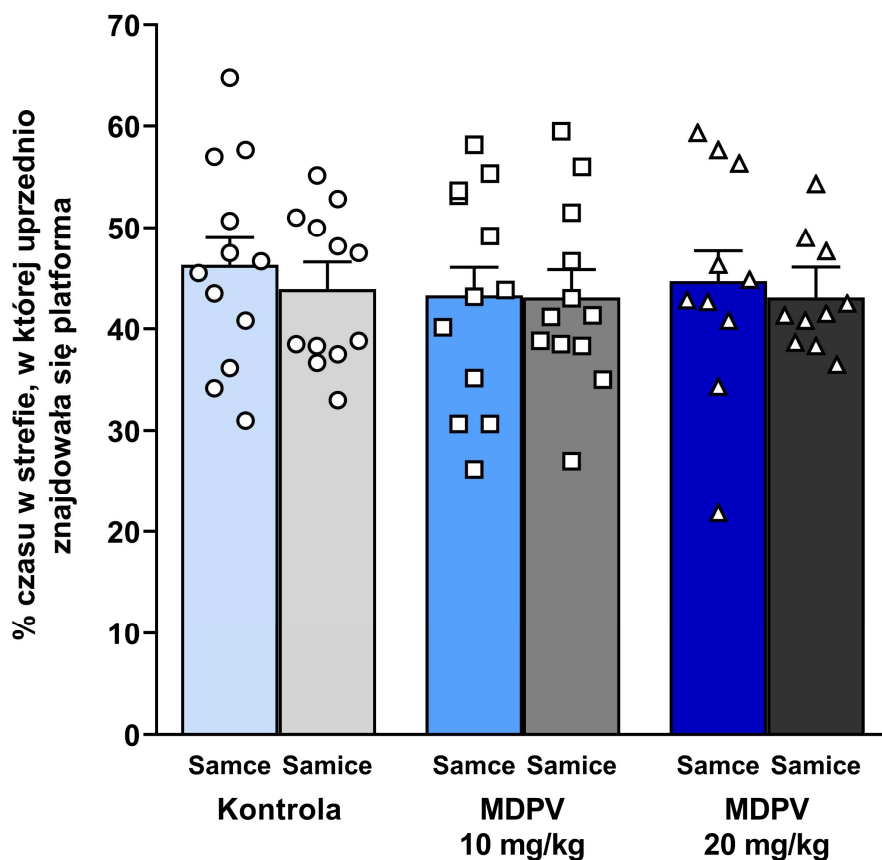
Ryc. 16. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek dystansu przebytego przez myszy w strefie z platformą podczas fazy nauki przestrzennej lokalizacji platformy. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 10-12$ ) z czterech sesji każdego dnia nauki przestrzennej. ### $p < 0,001$  względem dnia pierwszego.

#### 4.5.3. Próba pamięci przestrzennej lokalizacji platformy

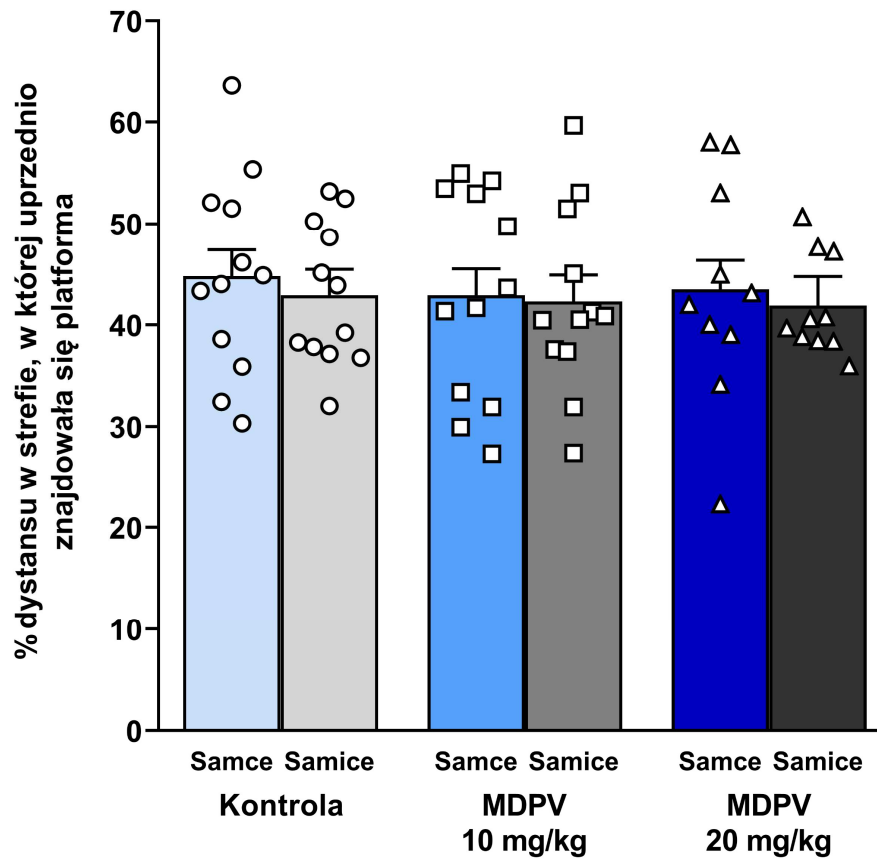
Dwuczynnikowa analiza wariancji wyników uzyskanych dla myszy, którym podawano MDPV w dawkach 10 i 20 mg/kg oraz grupy kontrolnej nie wykazała istotnego wpływu MDPV na liczbę wpłynięć na miejsce, w którym uprzednio znajdowała się platforma [ $F(2, 62) = 0,110$ ;  $p = 0,896$ ] [Ryc. 17], odsetek czasu spędzonego w strefie, w której uprzednio znajdowała się platforma [ $F(2, 60) = 0,262$ ;  $p = 0,770$ ] [Ryc. 18] i odsetek dystansu przebytego w strefie, w której uprzednio znajdowała się platforma [ $F(2, 60) = 0,152$ ;  $p = 0,859$ ] [Ryc. 19]. Wykazano brak wpływu płci na liczbę wpłynięć na miejsce, w którym uprzednio znajdowała się platforma [ $F(1, 62) = 0,300$ ;  $p = 0,586$ ], odsetek czasu spędzonego w strefie, w której uprzednio znajdowała się platforma [ $F(1, 62) = 0,367$ ;  $p = 0,547$ ] i odsetek dystansu przebytego w strefie, w której uprzednio znajdowała się platforma [ $F(1, 62) = 0,418$ ;  $p = 0,521$ ]. Nie wykazano istotnej statystycznie interakcji MDPV i płci w przypadku liczby wpłynięć na miejsce, w którym uprzednio znajdowała się platforma [ $F(2, 62) = 0,509$ ;  $p = 0,603$ ], odsetek czasu spędzonego w strefie, w której uprzednio znajdowała się platforma [ $F(2, 57) = 0,083$ ;  $p = 0,921$ ] i odsetek dystansu przebytego w strefie, w której uprzednio znajdowała się platforma [ $F(2, 57) = 0,036$ ;  $p = 0,965$ ].



Ryc. 17. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na liczbę wpłynięć myszy w fazie próby pamięci przestrzennej na miejsce, w którym uprzednio znajdowała się platforma. Wyniki przedstawiono jako indywidualne wartości oraz jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 10-12$ ).



Ryc. 18. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek czasu spędzonego przez myszy w fazie próby pamięci przestrzennej w strefie, w której uprzednio znajdowała się platforma. Wyniki przedstawiono jako indywidualne wartości oraz jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 10-12$ ).

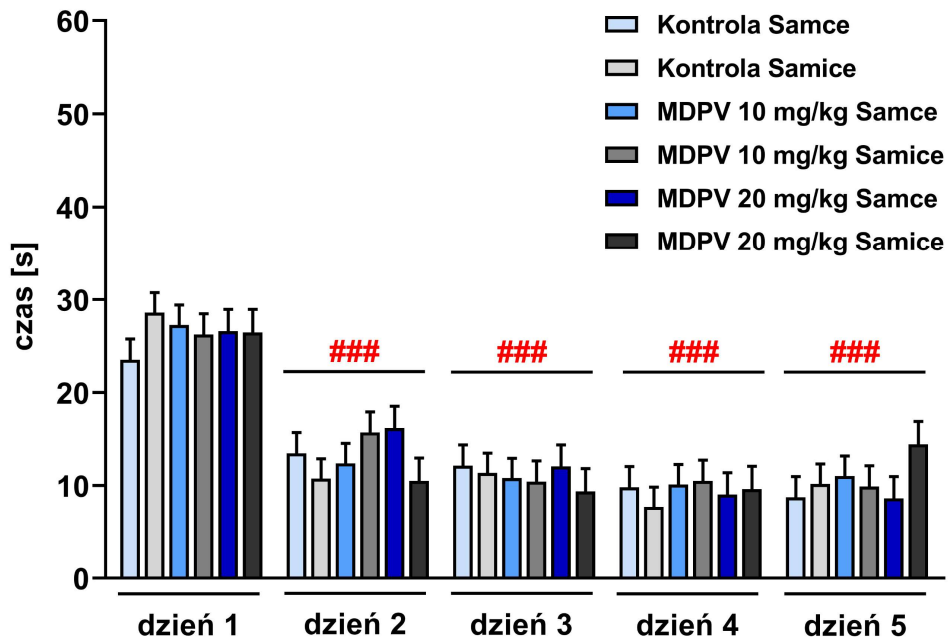


Ryc. 19. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek dystansu przebytego przez myszy w fazie próby pamięci przestrzennej w strefie, w której uprzednio znajdowała się platforma. Wyniki przedstawiono jako indywidualne wartości oraz jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 10-12$ ).

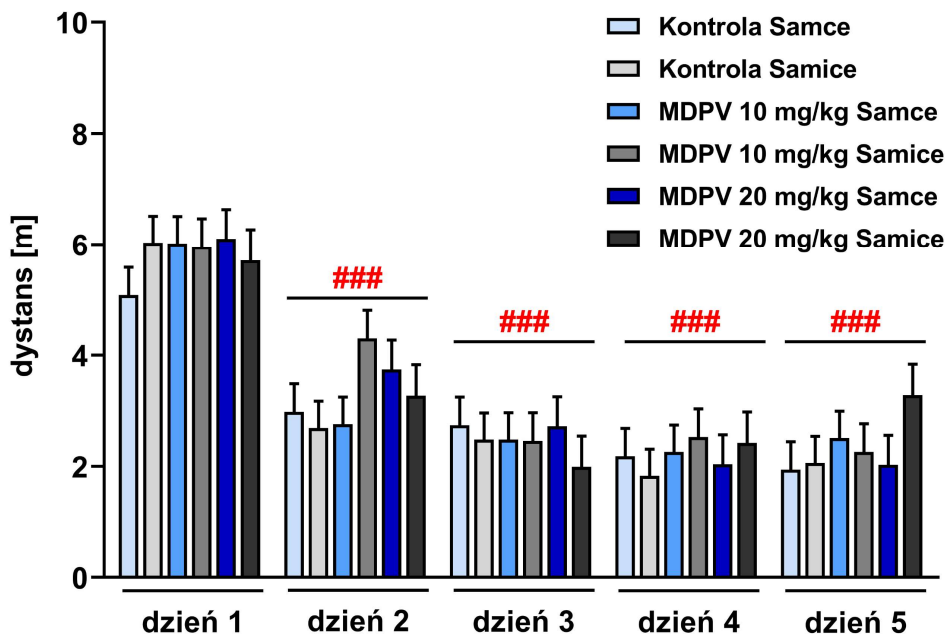
#### 4.5.4. Nauka przestrzenna nowej lokalizacji platformy

Dwuczynnikowa analiza wariancji dla powtórzonych pomiarów wyników uzyskanych dla myszy, którym podawano MDPV w dawkach 10 i 20 mg/kg oraz grupy kontrolnej nie wykazała istotnego wpływu MDPV na czas wpłynięcia na platformę [F (2, 54) = 0,314;  $p = 0,732$ ] [Ryc. 20], długość pokonanego dystansu [F (2, 54) = 1,121;  $p = 0,333$ ] [Ryc. 21], odsetek czasu spędzonego w strefie z platformą [F (2, 52) = 1,658;  $p = 0,201$ ] [Ryc. 22] i odsetek dystansu przebytego w strefie z platformą [F (2, 52) = 2,874;  $p = 0,065$ ] [Ryc. 23]. Wykazano brak wpływu płci na czas wpłynięcia na platformę [F (1, 58) = 0,000;  $p = 0,999$ ], długość przebytego dystansu [F (1, 58) = 0,104;  $p = 0,748$ ], odsetek czasu spędzonego w strefie z platformą [F (1, 57) = 0,000;  $p = 0,996$ ] i odsetek dystansu przebytego w strefie z platformą [F (1, 57) = 0,040;  $p = 0,843$ ]. Nie wykazano istotnej statystycznie interakcji MDPV i płci w przypadku czasu wpłynięcia na platformę [F (2, 51) = 0,050;  $p = 0,951$ ], długości przebytego dystansu [F (2, 51) = 0,057;  $p = 0,944$ ], odsetka czasu spędzonego w strefie z platformą [F (2, 50) = 0,564;  $p = 0,575$ ] i odsetka dystansu przebytego w strefie z platformą [F (2, 50) = 1,674;  $p = 0,198$ ]. Wykazano istotny wpływ dnia nauki przestrzennej na czas wpłynięcia na platformę [F (4, 236) = 63,692;  $p < 0,001$ ], długość pokonanego dystansu [F (4, 236) = 59,440;  $p < 0,001$ ], odsetek czasu spędzonego w strefie z platformą [F (4, 236) = 96,857;  $p < 0,001$ ] i odsetek dystansu przebytego w strefie z platformą [F (4, 236) = 55,852;  $p < 0,001$ ].

W dniach od drugiego do piątego w porównaniu do dnia pierwszego, czas wpłynięcia na platformę [Ryc. 20] i długość przebytego dystansu [Ryc. 21] uległy znamiennej skróceniu, natomiast odsetek czasu spędzonego w strefie z platformą [Ryc. 22] i odsetek dystansu przebytego w strefie z platformą [Ryc. 23] uległ istotnemu wydłużeniu, co wskazuje, że myszy ze wszystkich grup nauczyły się wpływać na platformę zanurzoną pod powierzchnię wody, po przeniesieniu jej do kwadrantu położonego naprzeciwko uprzedniej lokalizacji.

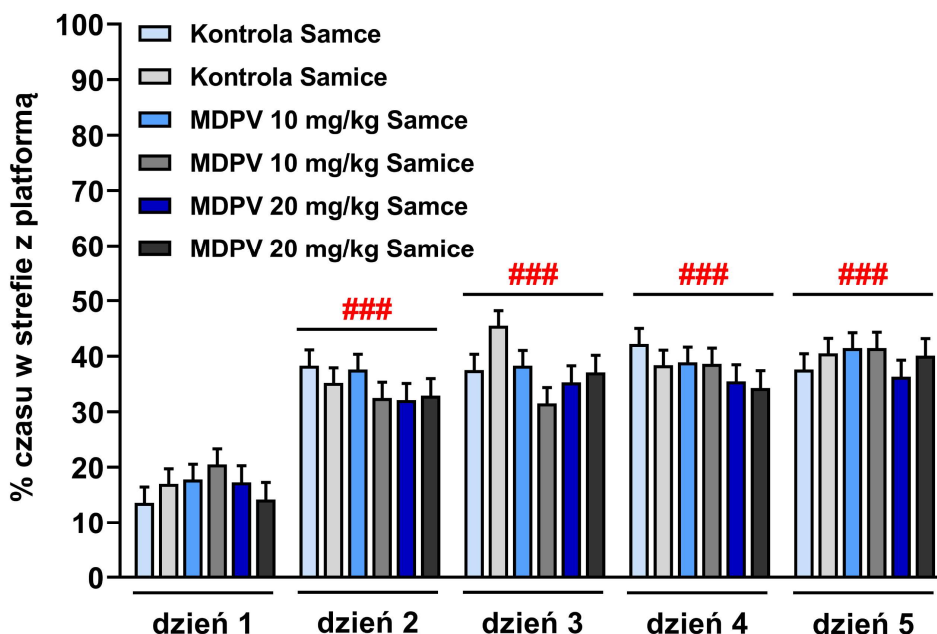


Ryc. 20. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na czas wpłynięcia myszy na platformę podczas fazy nauki przestrzennej nowej lokalizacji platformy. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 9-12$ ) z czterech sesji każdego dnia nauki przestrzennej. ### $p < 0,001$  względem dnia pierwszego.

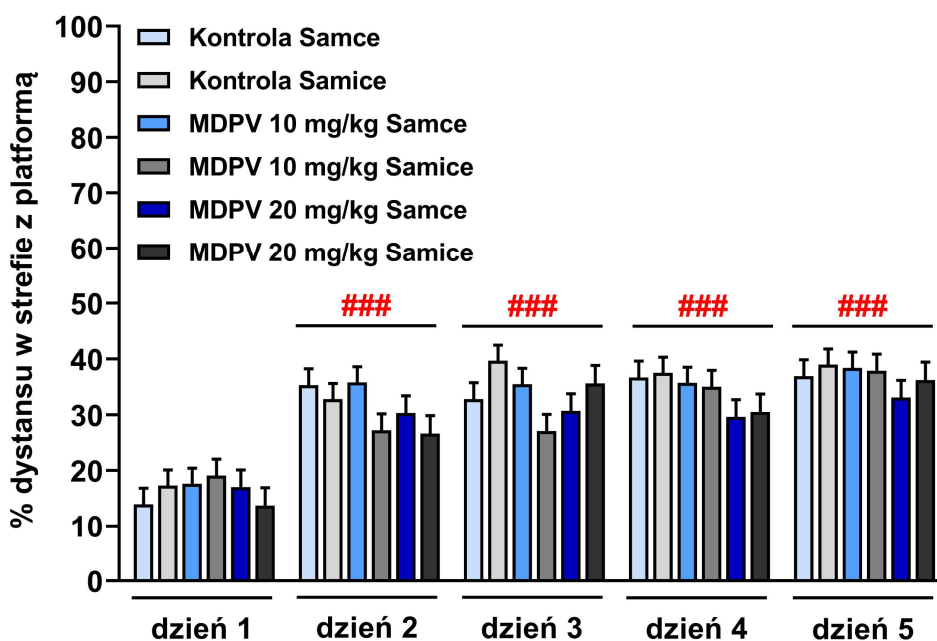


Ryc. 21. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na dystans pokonany przez myszy podczas fazy nauki przestrzennej nowej lokalizacji platformy. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 9-12$ ) z czterech sesji każdego dnia nauki przestrzennej. ### $p < 0,001$  względem dnia pierwszego.





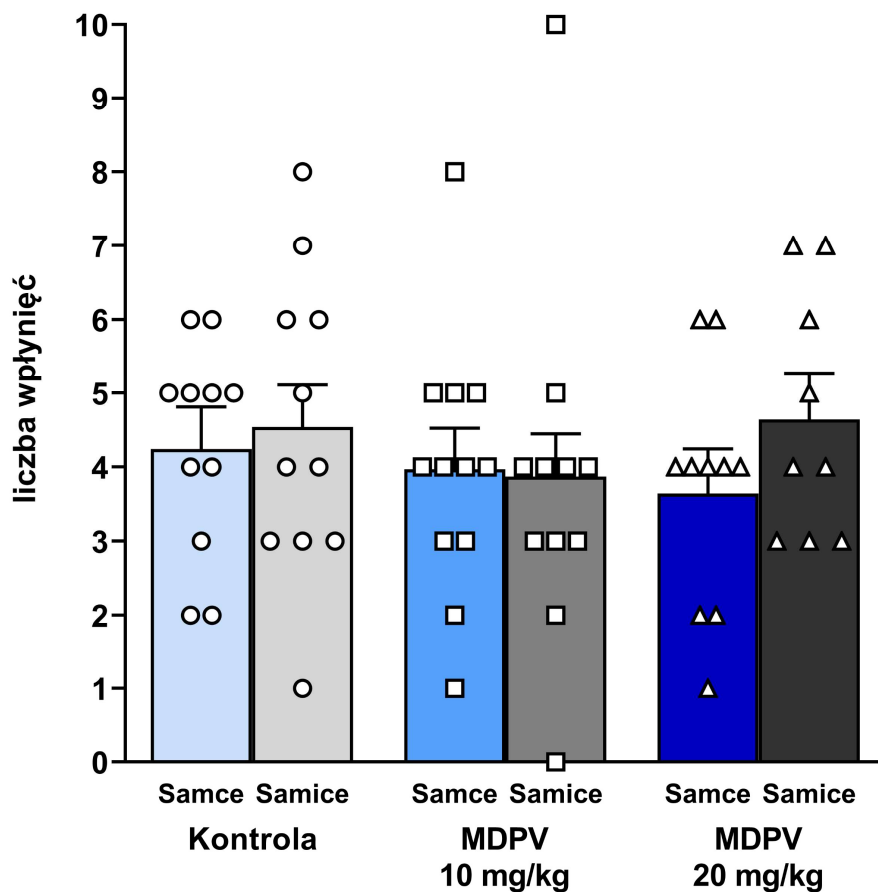
Ryc. 22. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek czasu spędzonego przez myszy w strefie z platformą podczas fazy nauki przestrzennej nowej lokalizacji platformy. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 9-12$ ) z czterech sesji każdego dnia nauki przestrzennej. ### $p < 0,001$  względem dnia pierwszego.



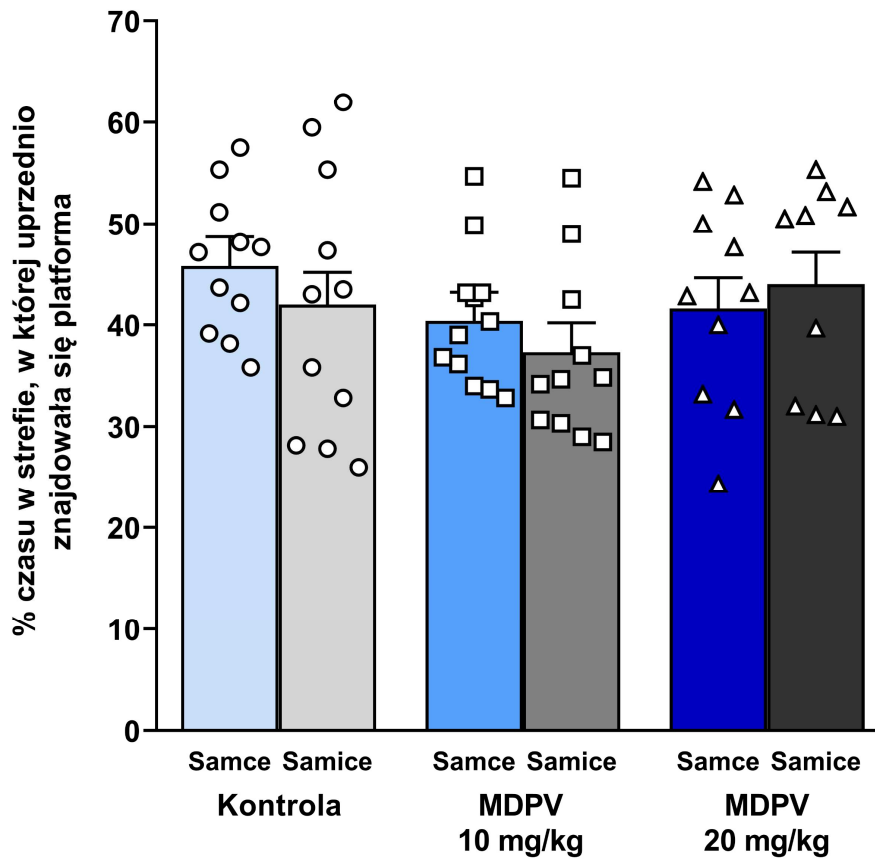
Ryc. 23. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek dystansu przebytego przez myszy w strefie z platformą podczas fazy nauki przestrzennej nowej lokalizacji platformy. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 9-12$ ) z czterech sesji każdego dnia nauki przestrzennej. ### $p < 0,001$  względem dnia pierwszego.

#### 4.5.5. Próba pamięci przestrzennej nowej lokalizacji platformy

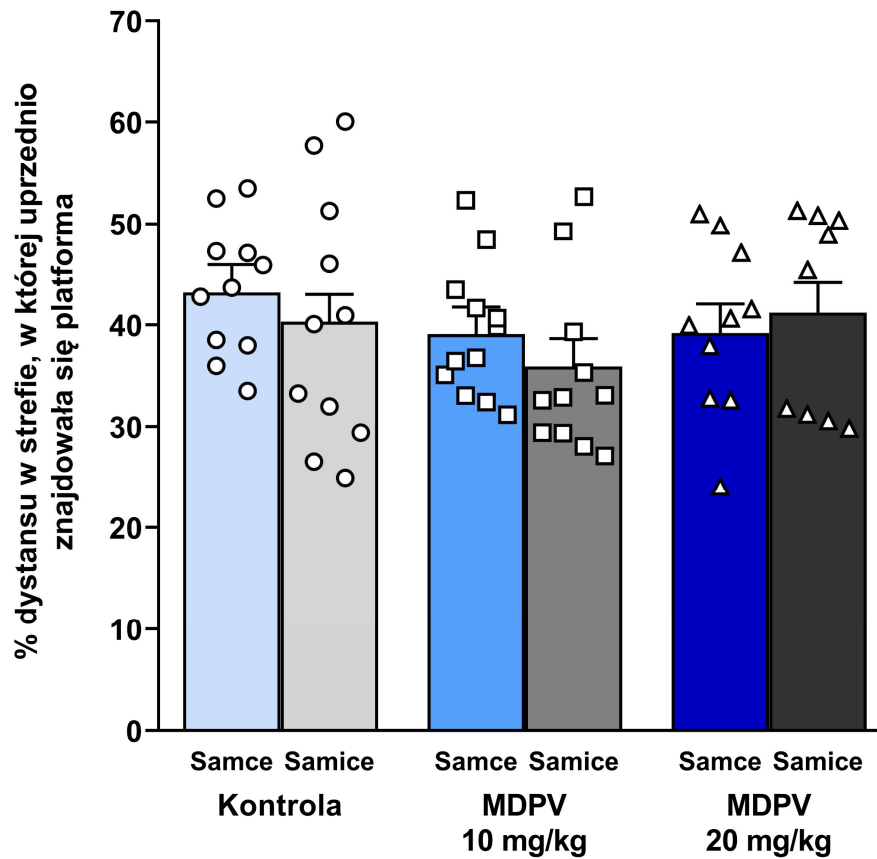
Dwuczynnikowa analiza wariancji wyników uzyskanych dla myszy, którym podawano MDPV w dawkach 10 i 20 mg/kg oraz grupy kontrolnej nie wykazała istotnego wpływu MDPV na liczbę wpłynięć na miejsce, w którym uprzednio znajdowała się platforma [ $F(2, 55) = 0,372; p = 0,691$ ] [Ryc. 24], odsetek czasu spędzonego w strefie, w której uprzednio znajdowała się platforma [ $F(2, 54) = 1,936; p = 0,154$ ] [Ryc. 25] i odsetek dystansu przebytego w strefie, w której uprzednio znajdowała się platforma [ $F(2, 53) = 0,1478; p = 0,237$ ] [Ryc. 26]. Wykazano brak wpływu płci na liczbę wpłynięć na miejsce, w którym uprzednio znajdowała się platforma [ $F(1, 58) = 0,725; p = 0,398$ ], odsetek czasu spędzonego w strefie, w której uprzednio znajdowała się platforma [ $F(1, 58) = 0,433; p = 0,513$ ] i odsetek dystansu przebytego w strefie, w której uprzednio znajdowała się platforma [ $F(1, 57) = 0,410; p = 0,525$ ]. Nie wykazano istotnej statystycznie interakcji MDPV i płci w przypadku liczby wpłynięć na miejsce, w którym uprzednio znajdowała się platforma [ $F(2, 52) = 0,472; p = 0,626$ ], odsetka czasu spędzonego w strefie, w której uprzednio znajdowała się platforma [ $F(2, 51) = 0,720; p = 0,492$ ] i odsetka dystansu przebytego w strefie, w której uprzednio znajdowała się platforma [ $F(2, 52) = 0,606; p = 0,549$ ].



Ryc. 24. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na liczbę wptynięć myszy w fazie próby pamięci przestrzennej nowej lokalizacji platformy w miejsce, w którym uprzednio była platforma. Wyniki przedstawiono jako indywidualne wartości oraz jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 9-12$ ).



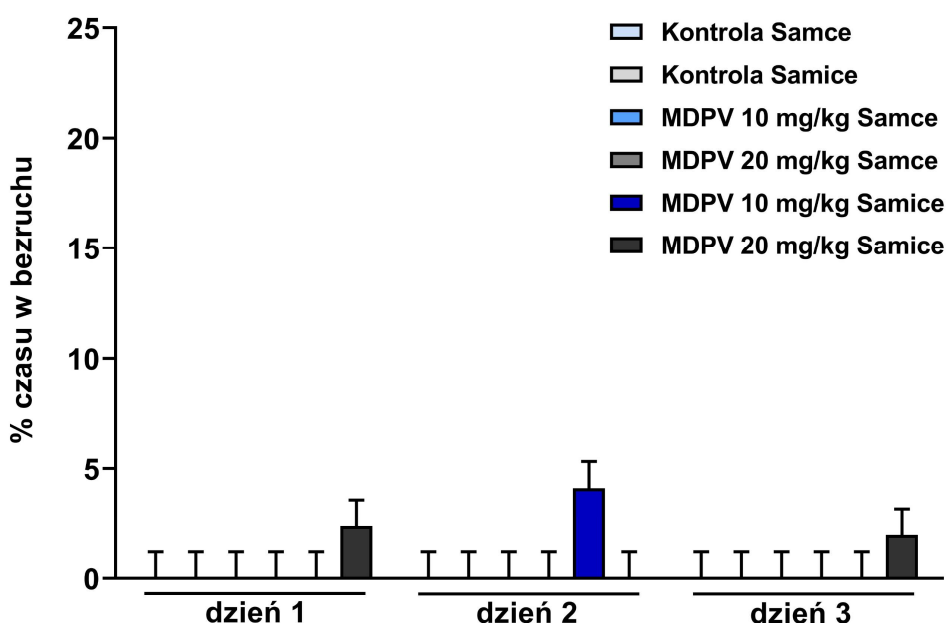
Ryc. 25. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek czasu spędzonego przez myszy w fazie próby pamięci przestrzennej nowej lokalizacji platformy w strefie, w której uprzednio była platforma. Wyniki przedstawiono jako indywidualne wartości oraz jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 9-12$ ).



Ryc. 26. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek dystansu przebytego przez myszy w fazie próby pamięci przestrzennej nowej lokalizacji platformy w strefie, w której uprzednio była platforma. Wyniki przedstawiono jako indywidualne wartości oraz jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 9-12$ ).

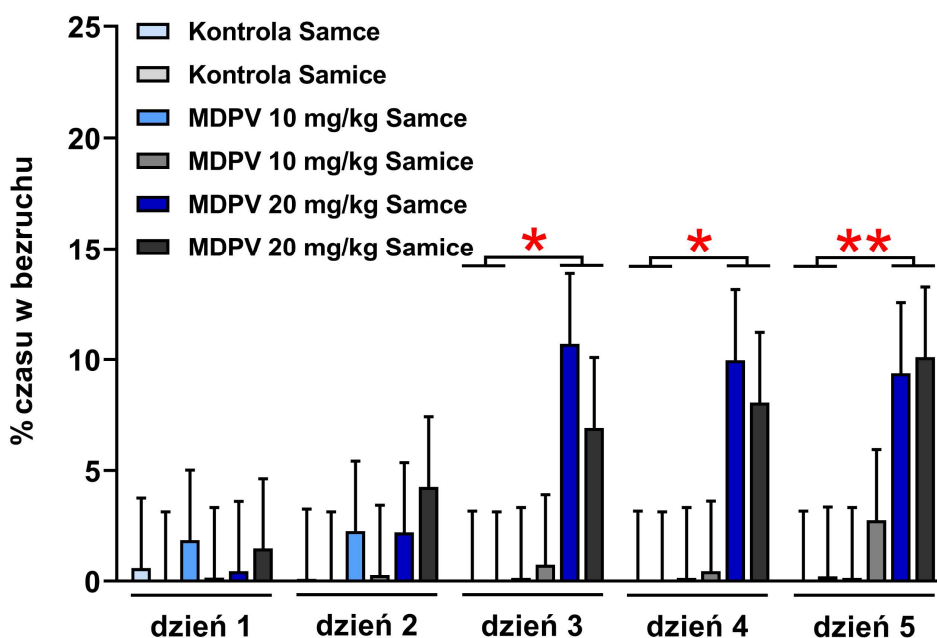
#### 4.5.6. Biernie unoszenie się na powierzchni wody

Podczas wszystkich etapów testu MWM wystąpiły epizody biernego unoszenia się na wodzie tj. stanu, w którym zwierzę nie wykazuje aktywności ruchowej. Wraz z kolejnymi etapami doświadczenia zaobserwowano trend wzrostowy biernego unoszenia się na powierzchni wody spowodowany długim czasem bezruchu u niektórych myszy. Dwuczynnikowa analiza wariancji dla powtórzonych pomiarów wyników uzyskanych dla myszy, którym podawano MDPV w dawkach 10 i 20 mg/kg oraz grupy kontrolnej wykazała, iż podczas treningu MDPV nie wywarł istotnego wpływu na odsetek czasu biernego unoszenia się na powierzchni wody [ $F(2, 210) = 0,684$ ;  $p = 0,505$ ] [Ryc. 27]. Podobnie, nie wykazano istotnego wpływu płci [ $F(1, 210) = 2,732$ ;  $p = 0,100$ ] jak i interakcji MDPV i płci [ $F(2, 210) = 0,684$ ;  $p = 0,505$ ].



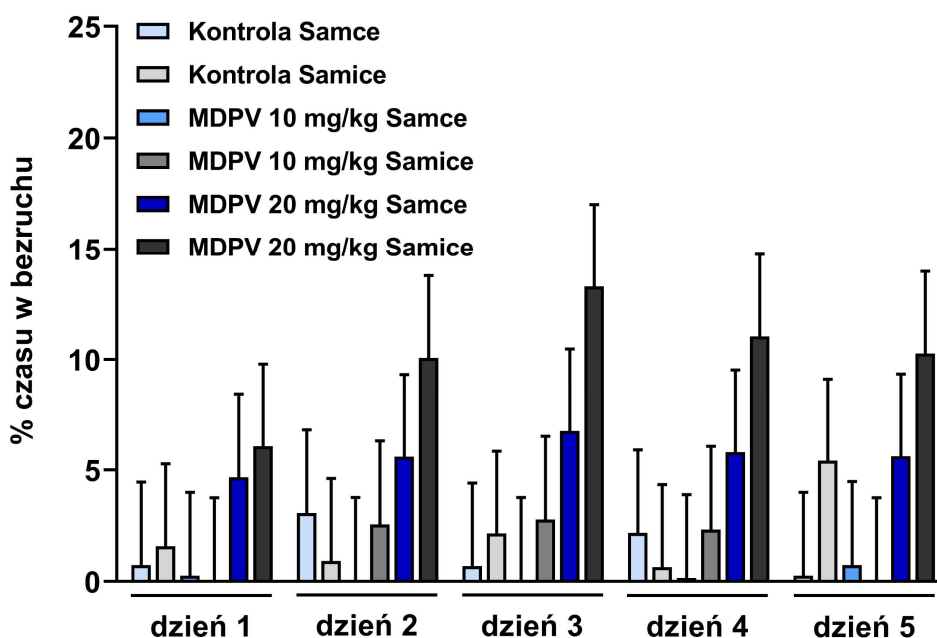
Ryc. 27. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek czasu spędzonego przez myszy w bezruchu podczas fazy treningu z widoczną platformą. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ) z czterech sesji każdego dnia treningu.

Natomiast w trakcie nauki przestrzennej MDPV wywarł istotny wpływ na odsetek czasu biernego unoszenia się na powierzchni wody [F (2, 60) = 3,665;  $p = 0,031$ ] [Ryc. 28]. Nie wykazano wpływu płci [F (1, 66) = 0,010;  $p = 0,992$ ] ani też nie wystąpiła statystycznie istotna interakcja płci i MDPV [F (2, 59) = 0,002;  $p = 0,998$ ]. Na odsetek czasu spędzonego w bezruchu istotnie wpływał dzień nauki przestrzennej [F (4, 264) = 2,451;  $p = 0,046$ ] oraz interakcja dnia i MDPV [F (8, 264) = 2.884;  $p = 0,004$ ]. Analiza *post hoc* uzyskanych wyników wykazała, iż od trzeciego do piątego dnia myszy z grupy otrzymującej MDPV w dawce 20 mg/kg, pozostawały w bezruchu przez istotnie większy odsetek czasu od myszy z grupy kontrolnej [Ryc. 28]



Ryc. 28. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek czasu spędzonego przez myszy w bezruchu podczas fazy nauki przestrzennej lokalizacji platformy. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ) z czterech sesji każdego dnia nauki przestrzennej. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  względem kontroli.

Pomimo, iż MDPV podczas nauki przestrzennej nowej lokalizacji platformy nie zwiększył w istotny sposób odsetka czasu biernego unoszenia się na powierzchni wody [F (2,61) = 2,374;  $p = 0,102$ ] [Ryc. 29], myszy otrzymujące MDPV w dawce 20 mg/kg wykazały tendencję do dłuższego pozostawiania w bezruchu w porównaniu do grupy kontrolnej. Wykazano, iż płeć nie miała istotnego wpływu na odsetek czasu biernego unoszenia się na powierzchni wody [F (1, 66) = 0,572;  $p = 0,452$ ], nie wystąpiła też interakcja płci i MDPV [F (2, 59) = 0,162;  $p = 0,851$ ]. Ponadto, nie wykazano istotnego wpływu dnia [F (4, 264) = 2,356;  $p = 0,054$ ], czy też interakcji dnia i MDPV [F (8, 264) = 1,204;  $p = 0,296$ ].



Ryc. 29. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek czasu spędzonego przez myszy w bezruchu podczas fazy nauki przestrzennej nowej lokalizacji platformy. Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ) z czterech sesji każdego dnia nauki przestrzennej.

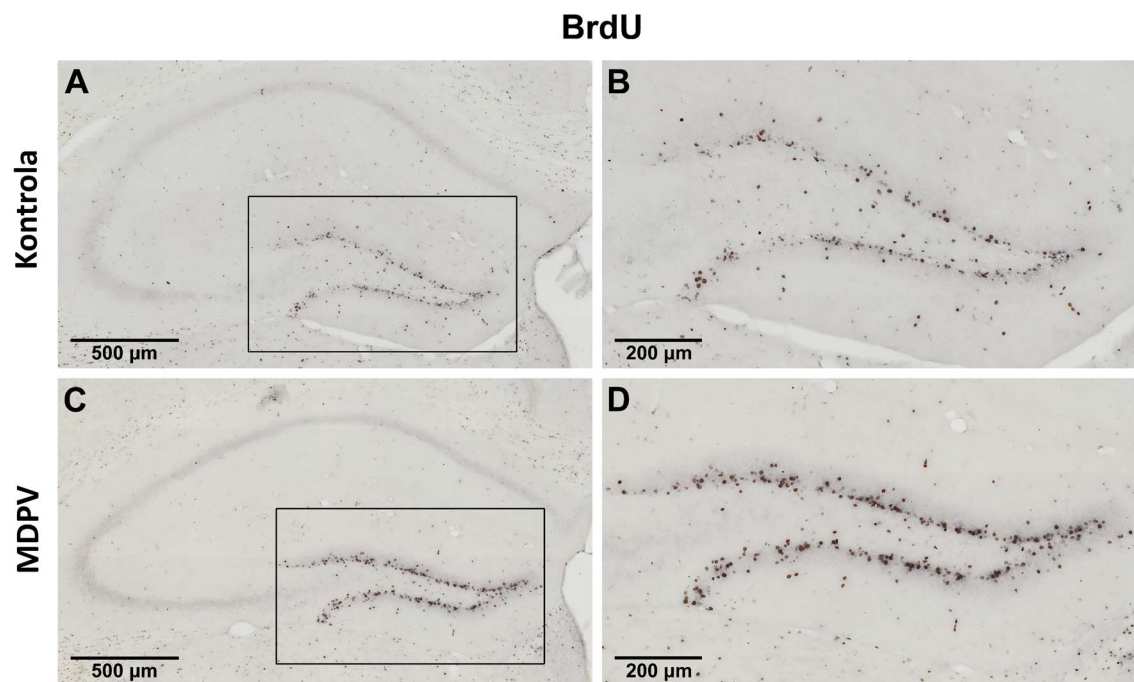
Podsumowując, w trakcie kolejnych etapów doświadczenia, pojawił się trend wydłużonego odsetka czasu, w którym myszy biernie unosiły się na powierzchni wody. Dlatego począwszy do fazy nauki przestrzennej lokalizacji platformy, myszy odznaczające się wysokim odsetkiem czasu spędzonego w bezruchu, zostały usunięte z analizy statystycznej, aby nie generować wyników stanowiących potencjalne artefakty.



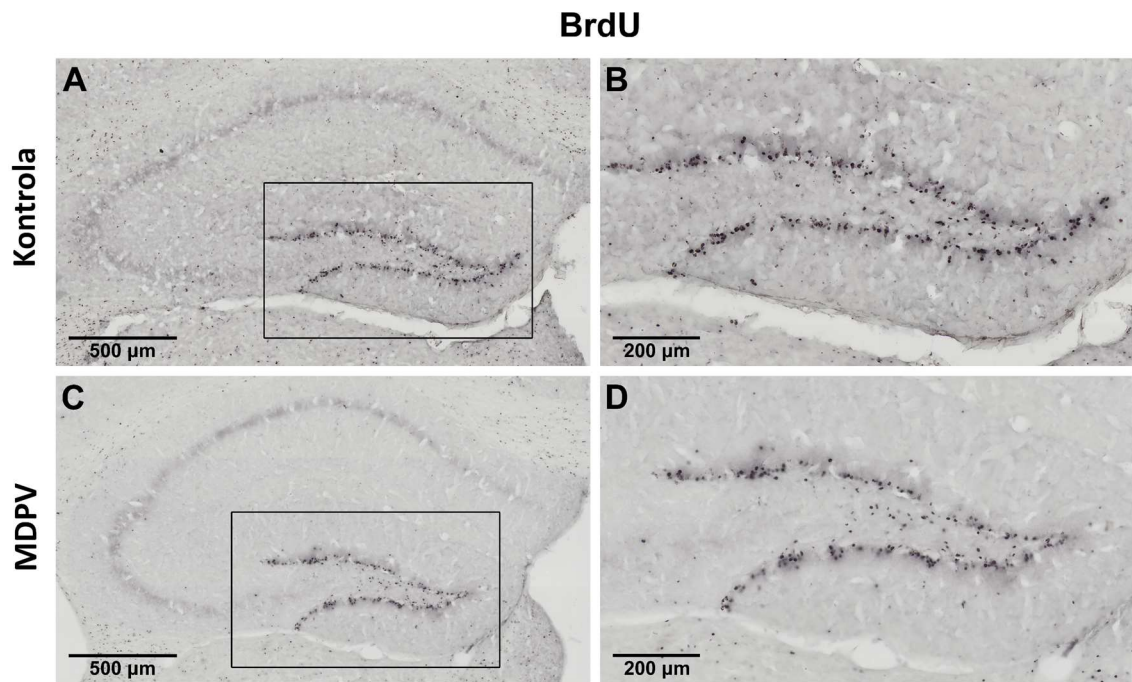
## 4.6. Wpływ MDPV na neurogenezę w zakręcie zębatym

### 4.6.1. Proliferacja komórek w zakręcie zębatym

BrdU, stanowiąca marker fazy S cyklu komórkowego, została wykorzystana do oszacowania proliferacji komórek zachodzącej w DG. Iniekcje BrdU wykonywano myszom w okresie rozwoju hipokampa pomiędzy 11. a 20. dniem po narodzinach. Zwierzęta w wieku 16 tygodni poddano eutanazji i dokonano izolacji mózgów w celu określenia proliferacji komórek zachodzącej podczas podawania MDPV. Komórki zawierające BrdU policzono oddzielnie w czterech reprezentatywnych skrawkach DG z każdej myszy w obrębie grupy [Ryc. 30, Ryc. 31] i wyrażono jako średnią liczbę komórek na skrawek [Ryc. 32].

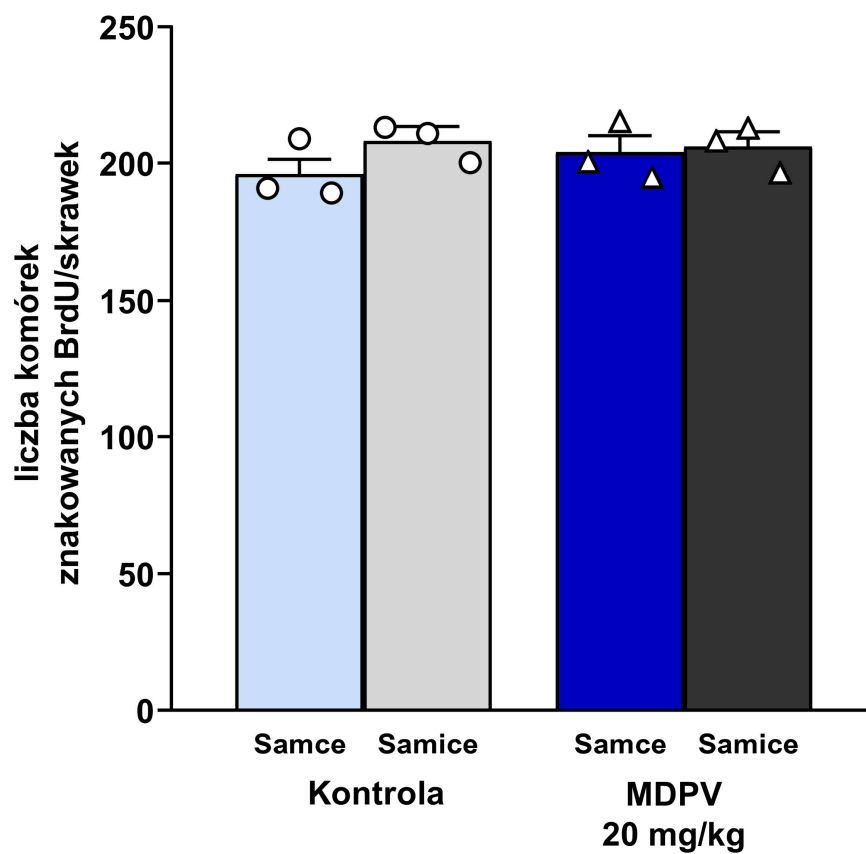


Ryc. 30. Przykładowe zdjęcia mikroskopowe przedstawiające komórki zawierające BrdU w DG samca myszy z grupy kontrolnej (A, B) oraz w DG samca myszy z grupy otrzymującej MDPV w dawce 20 mg/kg (C, D). Zdjęcia wykonano mikroskopem z obiektywem o 20-krotnym powiększeniu.



Ryc. 31. Przykładowe zdjęcie mikroskopowe przedstawiające komórki zawierające BrdU w DG samicy myszy z grupy kontrolnej (A, B) oraz w DG samicy myszy z grupy otrzymującej MDPV w dawce 20 mg/kg (C, D). Zdjęcia wykonano mikroskopem z obiektywem o 20-krotnym powiększeniu.

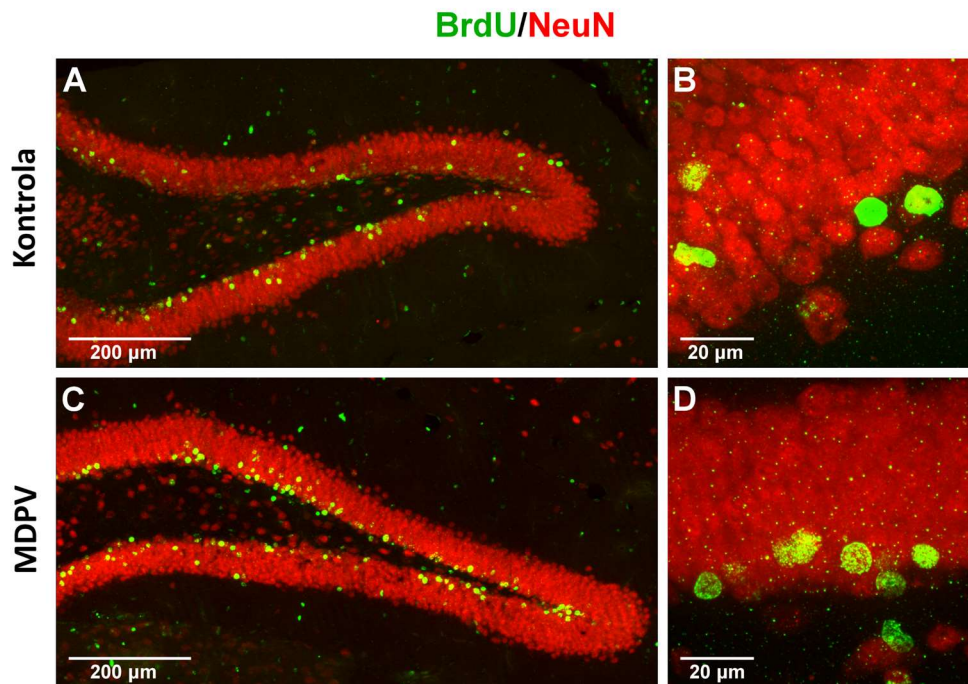
Dwuczynnikowa analiza wariancji wyników uzyskanych dla myszy, które otrzymały MDPV w dawce 20 mg/kg oraz grupy kontrolnej nie wykazała istotnego wpływu MDPV [ $F(1,6) = 0,300$ ;  $p = 0,602$ ] [Ryc. 32] na powstawanie nowych komórek w DG. Nie wykazano również istotnego wpływu płci [ $F(1,6) = 2,298$ ;  $p = 0,178$ ] ani nie wystąpiła interakcja płci i MDPV [ $F(1,6) = 1,098$ ;  $p = 0,333$ ]. Biorąc pod uwagę, iż MDPV w dawce 20 mg/kg nie zaburzał proliferacji komórek w DG, odstąpiono od znakowania immunohistochemicznego u myszy, którym podawano MDPV w niższej dawce.



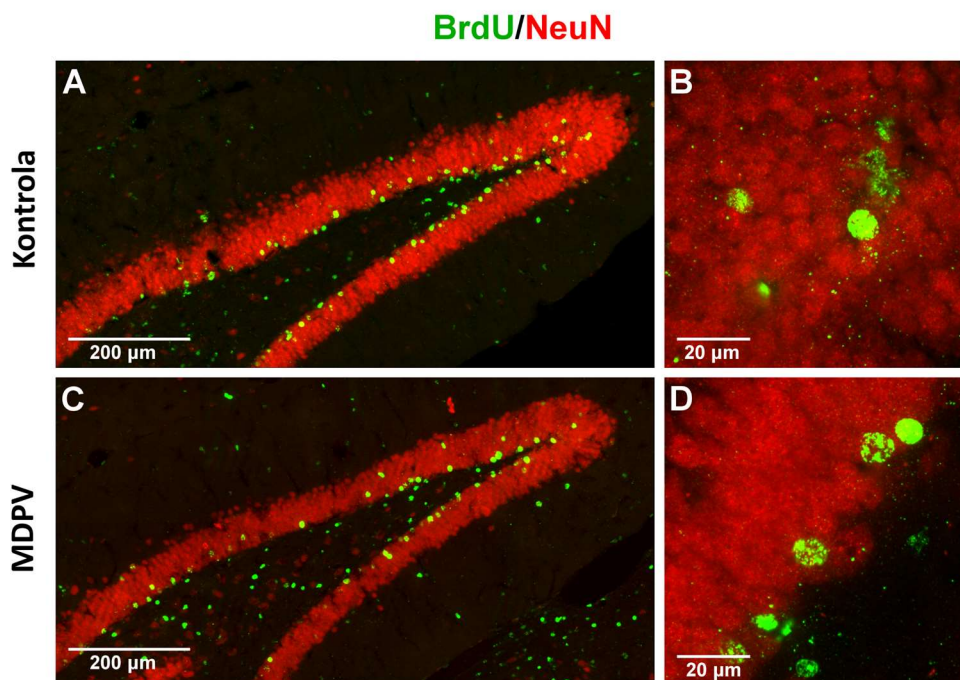
Ryc. 32. Wpływ MDPV w dawce 20 mg/kg na liczbę komórek znakowanych BrdU w DG myszy. Wyniki przedstawiono jako indywidualne wartości oraz jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

#### 4.6.2. Identyfikacja komórek w zakręcie zębatym

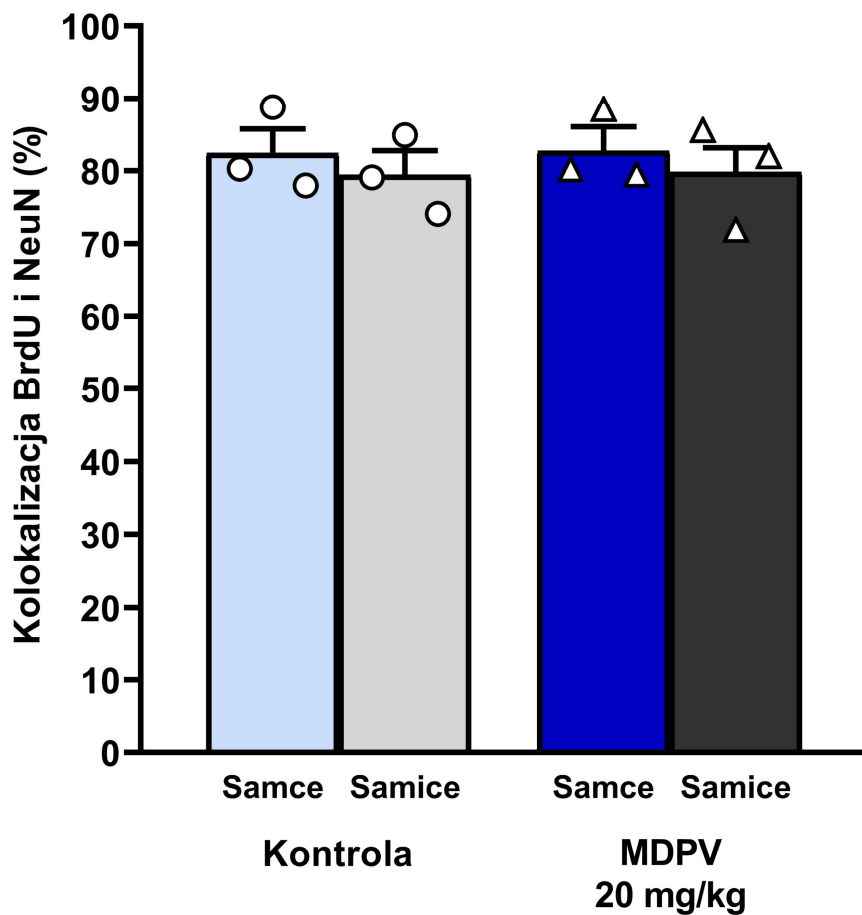
W celu identyfikacji komórek zawierających BrdU w DG, wykonano podwójne barwienie wykrywające BrdU i marker neuronalny – NeuN [Ryc. 33, Ryc. 34] lub BrdU i marker dla astrocytów – GFAP [Ryc. 36, Ryc. 37]. Większość komórek w DG (około 81%) [Ryc. 35] samców i samic myszy z grup otrzymujących MDPV w dawce 20 mg/kg i z grup kontrolnych, zawierających BrdU, zawierała też NeuN, co świadczy o tym, że komórki te były neuronami. Niewielka liczba komórek DG (prawie 7%) [Ryc. 38] zawierających BrdU zawierała równocześnie GFAP, co wskazuje na to, że komórki te były astrocytami. Dwuczynnikowa analiza wariancji nie wykazała istotnego wpływu MDPV na kolokalizację BrdU z komórkami NeuN-pozytywnymi [ $F(1, 8) = 0,015$ ;  $p = 0,905$ ] [Ryc. 35] ani z GFAP-pozytywnymi [ $F(1, 8) = 0,074$ ;  $p = 0,793$ ] [Ryc. 38]. Nie wykazano wpływu płci na kolokalizację BrdU z komórkami NeuN-pozytywnymi [ $F(1, 8) = 0,762$ ;  $p = 408$ ], nie wystąpiła też interakcja płci i MDPV [ $F(1, 8) = 0,000$ ;  $p = 0,989$ ]. Podobnie, w przypadku kolokalizacji BrdU z komórkami GFAP-pozytywnymi nie wykazano istotnego wpływu płci [ $F(1, 8) = 0,017$ ;  $p = 0,903$ ] ani wystąpienia interakcji płci i MDPV [ $F(1, 8) = 0,149$ ;  $p = 0,710$ ].



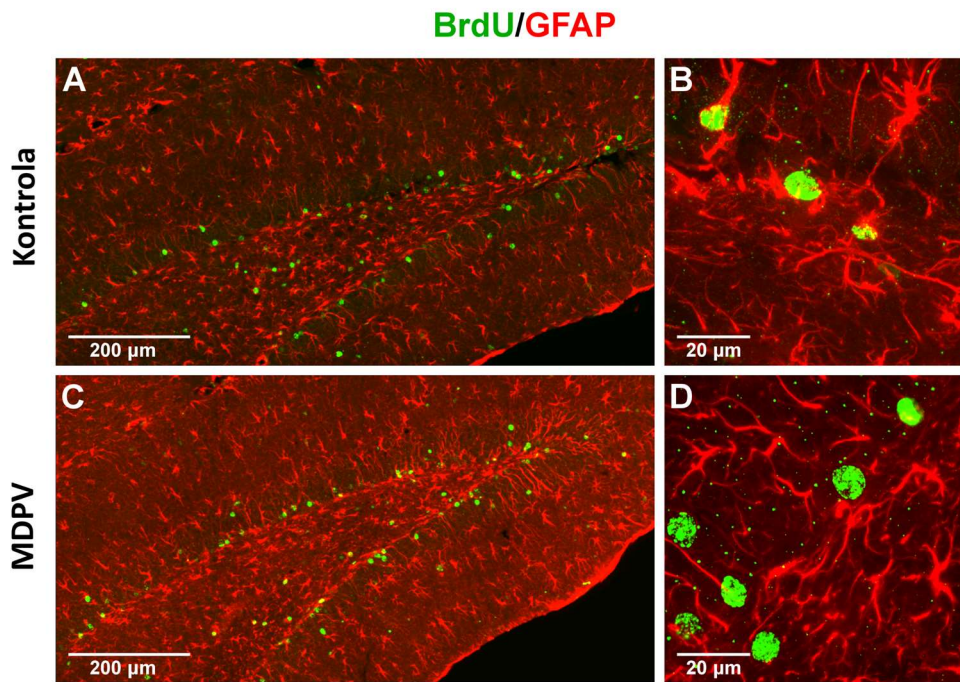
Ryc. 33. Przykładowe zdjęcie mikroskopowe przedstawiające komórki zawierające BrdU (zielone) i NeuN (czerwone) w DG samca myszy z grupy kontrolnej (A, B) oraz w DG samca myszy z grupy otrzymującej MDPV w dawce 20 mg/kg (C, D). Zdjęcie wykonano mikroskopem konfokalnym z obiektywem o 20-krotnym (A, C) lub 63-krotnym (B, D) powiększeniu.



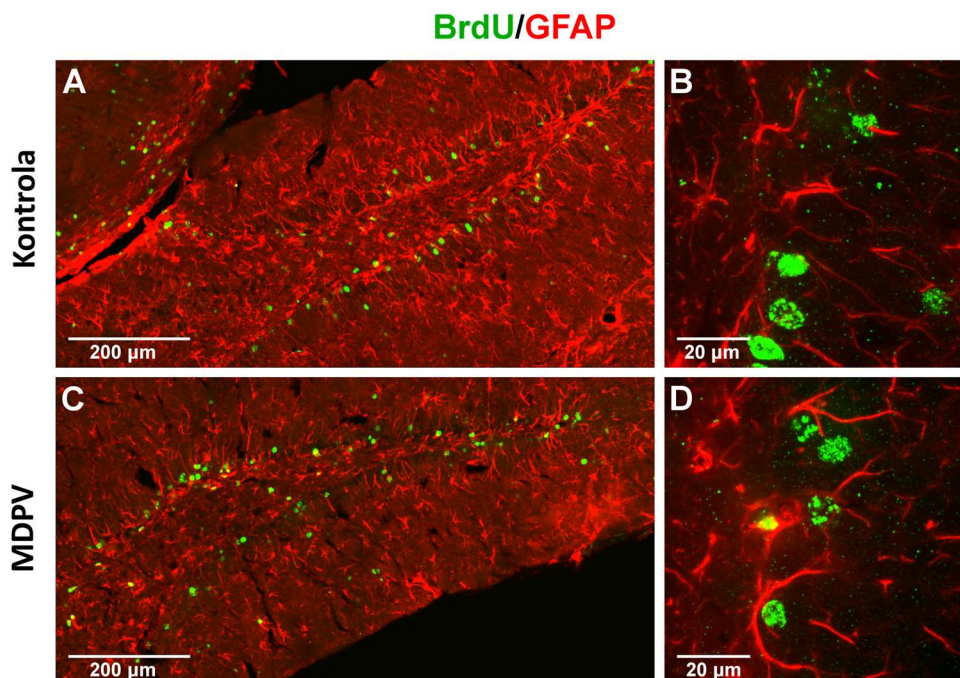
Ryc. 34. Przykładowe zdjęcie mikroskopowe przedstawiające komórki zawierające BrdU (zielone) i NeuN (czerwone) w DG samicy myszy z grupy kontrolnej (A, B) oraz w DG samicy myszy z grupy otrzymującej MDPV w dawce 20 mg/kg (C, D). Zdjęcie wykonano mikroskopem konfokalnym z obiektywem o 20-krotnym (A, C) lub 63-krotnym (B, D) powiększeniu.



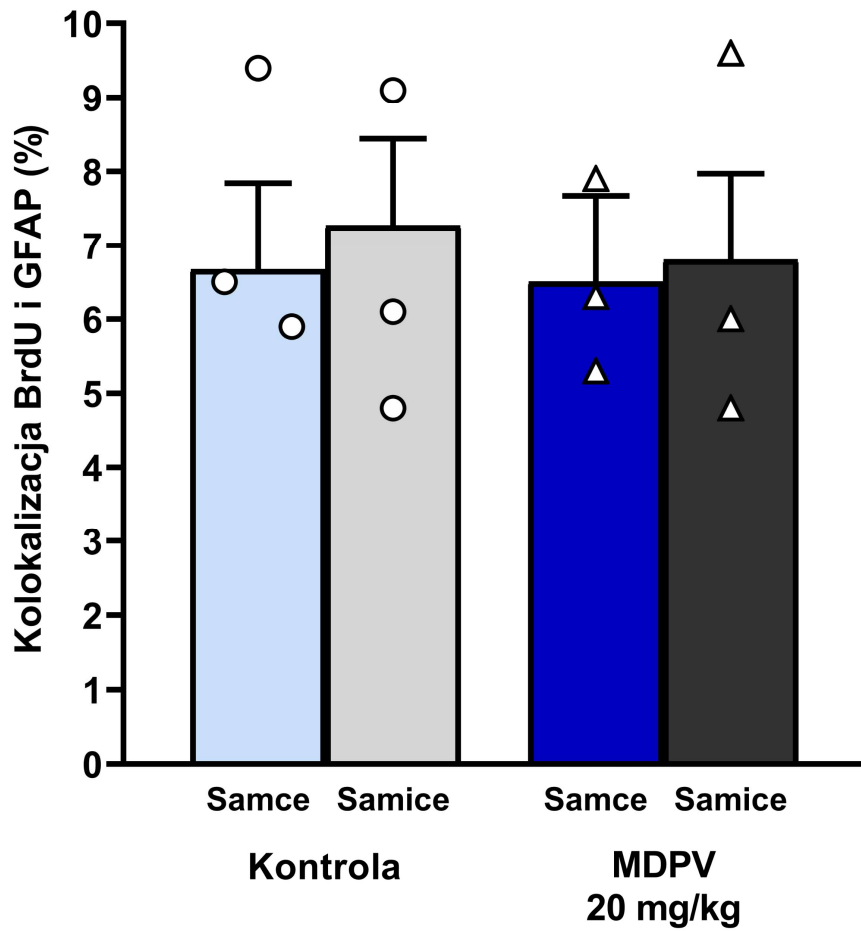
Ryc. 35. Wpływ MDPV w dawce 20 mg/kg na kolokalizację BrdU i NeuN w komórkach DG myszy. Wyniki przedstawiono jako indywidualne wartości oraz jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).



Ryc. 36. Przykładowe zdjęcie mikroskopowe przedstawiające komórki zawierające BrdU (zielone) i GFAP (czerwone) w DG samca myszy z grupy kontrolnej (A, B) oraz w DG samca myszy z grupy otrzymującej MDPV w dawce 20 mg/kg (C, D). Zdjęcie wykonano mikroskopem konfokalnym z obiektywem o 20-krotnym (A, C) lub 63-krotnym (B, D) powiększeniu.



Ryc. 37. Przykładowe zdjęcie mikroskopowe przedstawiające komórki zawierające BrdU (zielone) i GFAP (czerwone) w DG samicy myszy z grupy kontrolnej (A, B) oraz w DG samicy myszy z grupy otrzymującej MDPV w dawce 20 mg/kg (C, D). Zdjęcie wykonano mikroskopem konfokalnym z obiektywem o 20-krotnym (A, C) lub 63-krotnym (B, D) powiększeniu.



Ryc. 38. Wpływ MDPV w dawce 20 mg/kg na kolokalizację BrdU i GFAP w komórkach DG myszy. Wyniki przedstawiono jako indywidualne wartości oraz jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

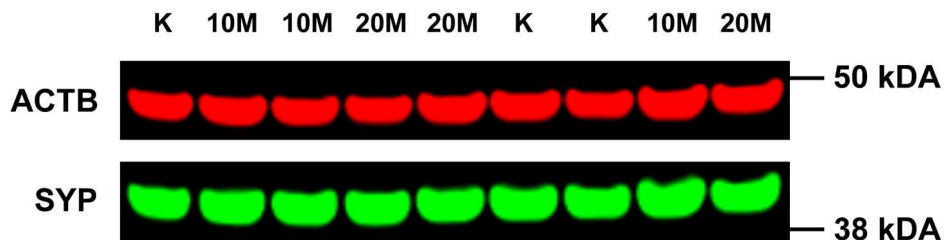


## 4.7. Wpływ MDPV na poziom ekspresji białek związanych z plastycznością synaptyczną

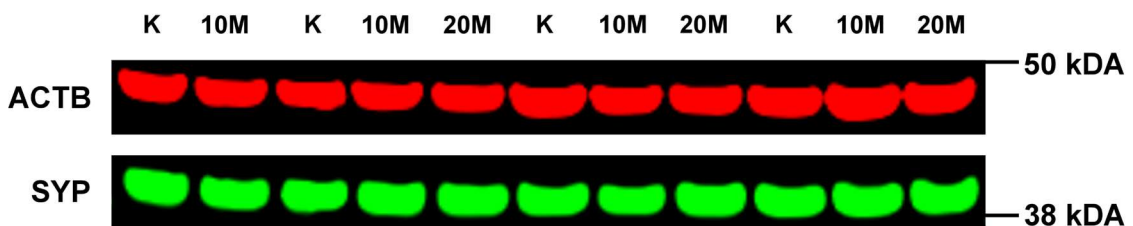
W celu dokonania oceny neuroplastyczności w obrębie hipokampa, określono ekspresję podstawowych białek zaangażowanych w funkcjonowanie synaps, tj. SYP i PSD95. SYP jest białkiem presynaptycznym odpowiedzialnym za regulację uwalniania neuroprzekaźników do szczeliny synaptycznej, natomiast PSD95 – postsynaptycznym umożliwiającym wykrycie synaps pobudzających.

### 4.7.1. Ekspresja synaptofizyny

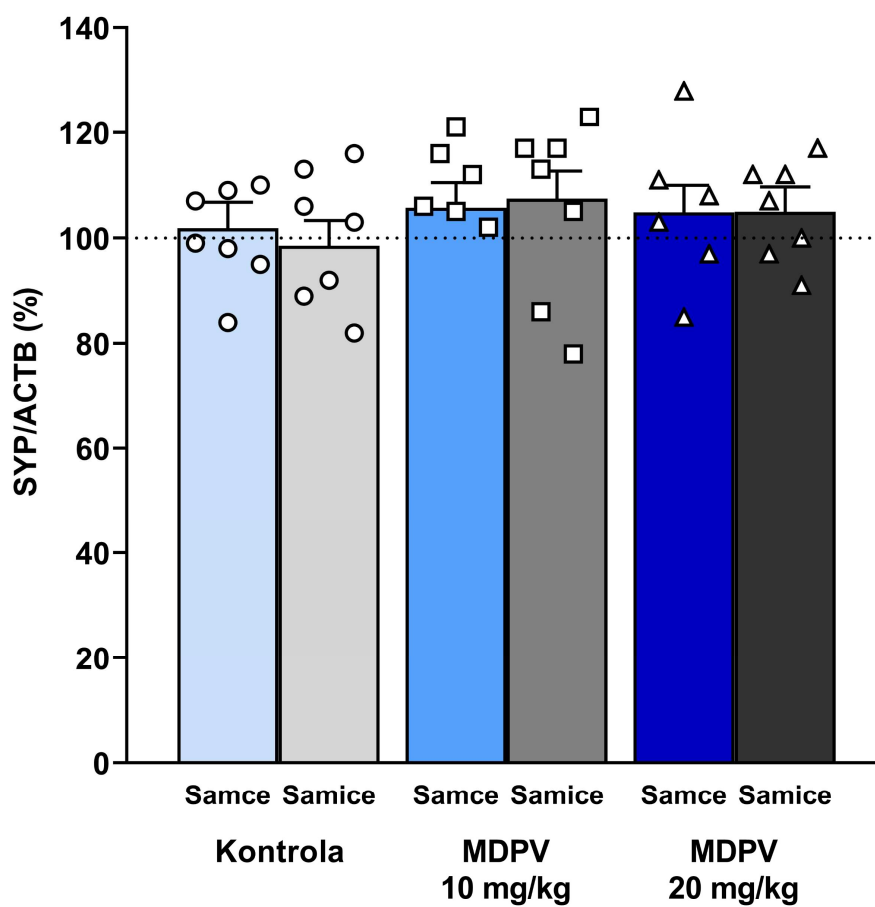
Dwuczynnikowa analiza wariancji wyników uzyskanych dla myszy, które otrzymały MDPV w dawkach 10 i 20 mg/kg oraz grupy kontrolnej nie wykazała istotnego wpływu MDPV [ $F(2, 28) = 1,271$ ;  $p = 0,296$ ] [Ryc. 41] na poziom ekspresji SYP w hipokampach myszy [Ryc. 39, Ryc. 40]. Nie wykazano wpływu płci [ $F(1, 34) = 0,177$ ;  $p = 0,677$ ] ani interakcji płci i MDPV [ $F(2, 29) = 0,077$ ;  $p = 0,926$ ].



Ryc. 39. Przykładowy wynik oznaczenia ekspresji SYP znormalizowanej względem ACTB w hipokampach samców myszy przy użyciu metody Western blot. K – kontrola, 10M – MDPV 10 mg/kg, 20M – MDPV 20 mg/kg.



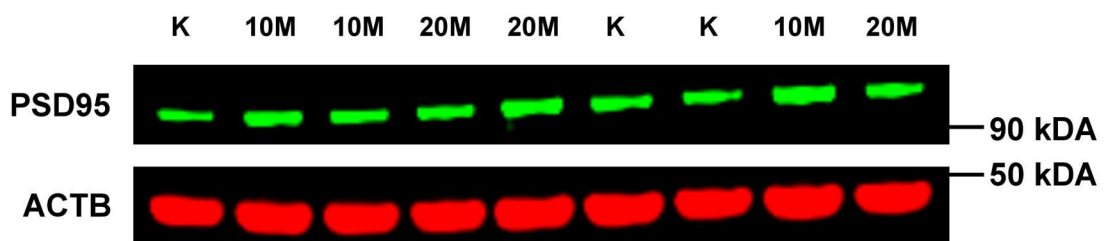
Ryc. 40. Przykładowy wynik oznaczenia ekspresji SYP znormalizowanej względem ACTB w hipokampach samic myszy przy użyciu metody Western blot. K – kontrola, 10M – MDPV 10 mg/kg, 20M – MDPV 20 mg/kg.



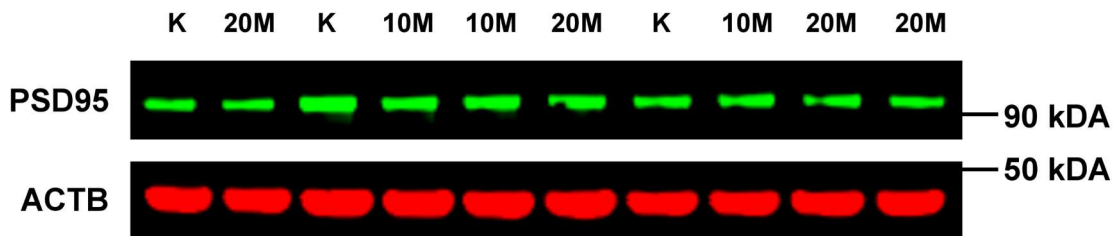
Ryc. 41. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na poziom ekspresji SYP w hipokampach myszy. Wyniki przedstawiono jako indywidualne wartości oraz jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 6-7$ ).

#### 4.7.2. Ekspresja białka gęstości postsynaptycznej 95

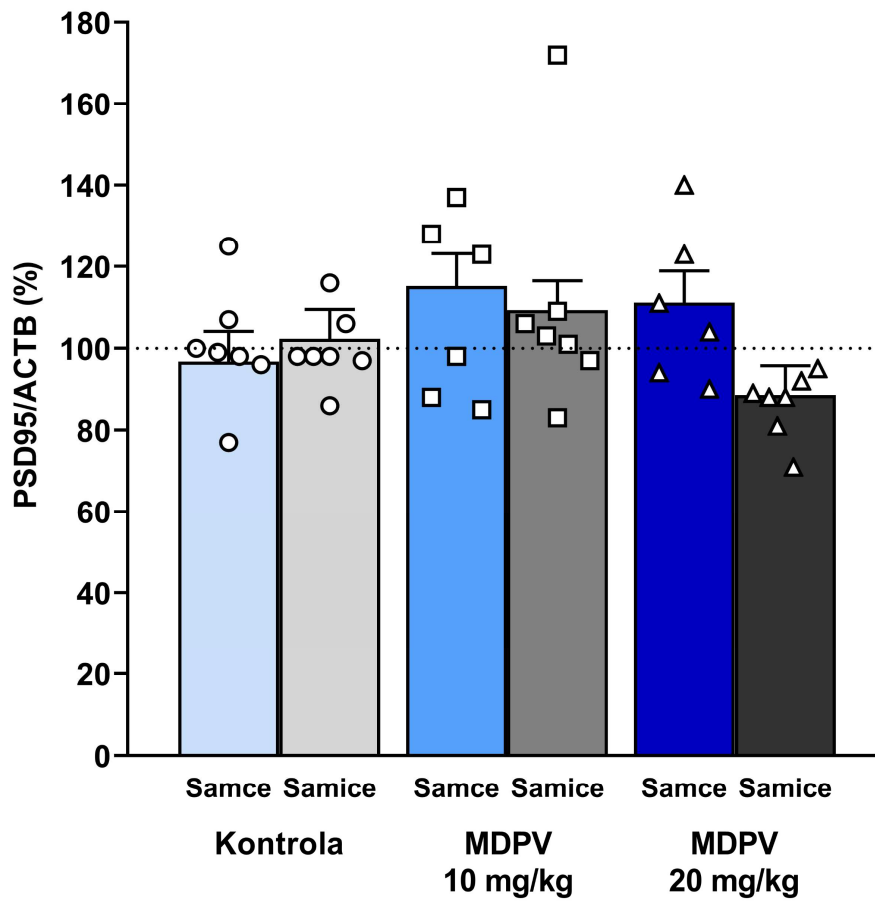
Dwuczynnikowa analiza wariancji wyników uzyskanych dla myszy, które otrzymały MDPV w dawkach 10 i 20 mg/kg oraz grupy kontrolnej nie wykazała istotnego wpływu MDPV [ $F(2, 28) = 2,970$ ;  $p = 0,068$ ] [Ryc. 44] na poziom ekspresji PSD95 w hipokampach myszy [Ryc. 42, Ryc. 43]. Nie wykazano wpływu płci [ $F(1, 34) = 0,688$ ;  $p = 0,413$ ] ani interakcji płci i MDPV [ $F(2, 29) = 2,714$ ;  $p = 0,083$ ].



Ryc. 42. Przykładowy wynik oznaczenia ekspresji PSD95 znormalizowanego względem ACTB w hipokampach samców myszy przy użyciu metody Western blot. K – kontrola, 10M – MDPV 10 mg/kg, 20M – MDPV 20 mg/kg.



Ryc. 43. Przykładowy wynik oznaczenia ekspresji PSD95 znormalizowanego względem ACTB w hipokampach samic myszy przy użyciu metody Western blot. K – kontrola, 10M – MDPV 10 mg/kg, 20M – MDPV 20 mg/kg.



Ryc. 44. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na poziom ekspresji PSD95 w hipokampach myszy. Wyniki przedstawiono jako indywidualne wartości oraz jako średnie  $\pm$  SEM ( $n = 6-7$ ).

## 5. Dyskusja

Niniejsza praca przedstawia wpływ MDPV, podawanego w trakcie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego myszy, na zdolność do nauki i pamięć tych zwierząt po osiągnięciu dorosłości a także na rozwój ich hipokampa. Wykazałam, iż MDPV podane myszom w krótkim czasie po narodzinach powoduje zaburzenia roboczej pamięci przestrzennej oraz krótko- i długotrwałej pamięci rozpoznawczej u dorosłych zwierząt. W odróżnieniu od wcześniejszych badań dotyczących klasycznych związków psychostymulujących [Acevedo i wsp., 2007; Dong i wsp., 2018; Levin i Seidler, 1993; Melnick i wsp., 2001; Siegel i wsp., 2010], wykazałam, że wrażliwość na szkodliwe działanie MDPV jest niezależna od płci. Ponadto, stwierdzone upośledzenie pamięci nie jest związane z zaburzeniami neuroplastyczności lub synaptogenezy hipokampa.

Spadek masy ciała jest typowym następstwem ekspozycji na klasyczne związki psychostymulujące [Siegel i wsp., 2010; Williams i wsp., 2004] i syntetyczne katynony [López-Arnau i wsp. 2014; López-Arnau i wsp., 2015; Motbey i wsp., 2012; Zawilska i Wojcieszak, 2017]. Szkodliwy wpływ MDPV na rozwój myszy odnotowano już na etapie podawania związku. Spowolnienie przyrostu masy ciała myszy w wieku PD11-20 było zależne od zastosowanej dawki MDPV – w przypadku podawania dawki 20 mg/kg wystąpiło ono wcześniej niż po dawce 10 mg/kg. Natomiast nie było zależne od płci – wystąpiło zarówno u samców jak i u samic po obu badanych dawkach MDPV. Ekspozycja na MDPV we wczesnym okresie postnatalnym nie miała wpływu na masę ciała myszy osiągniętą w dorosłości.

Pierwszym etapem badań behawioralnych było dokonanie oceny roboczej pamięci przestrzennej. Wykonywanie zadań opierających się na intensywnym wykorzystywaniu pamięci roboczej, takich jak spontaniczna alternacja w labiryncie Y, jest związane z aktywnością mPFC połączonej funkcjonalnie z hipokampem. Pozwala ona na przechowywanie informacji o bezpośredniej przeszłości, związku pomiędzy postępowaniem a jego skutkiem, a więc pozwala na przyjęcie optymalnej postawy w danej sytuacji [Lalonde, 2002; Maggi i Humphries, 2022].

Wykazałam, iż MDPV podawany w okresie PD11-20 zaburza roboczą pamięć przestrzenną myszy. Na chwilę obecną nie dysponujemy danymi odnośnie wpływu wczesnej postnatalnej ekspozycji na związki psychostymulujące na spontaniczną alternację. Niemniej badania przeprowadzone na myszach i szczurach oceniające spontaniczną alternację przy użyciu labiryntu w kształcie litery Y bądź T wykazały zaburzenia roboczej pamięci przestrzennej w wyniku ekspozycji w okresie prenatalnym lub w dorosłości na klasyczne związki psychostymulujące [Ladrón de Guevara-Miranda i wsp., 2017; Mañas-Padilla i wsp., 2021; Seyedhosseini Tamijani i wsp., 2018], na ekstrakt z kory i świeżych liści khatu [Murithi i wsp., 2020], a także na syntetyczne katynony, takie jak mefedron [den Hollander i wsp., 2013], czy  $\alpha$ -pirolidynopropiofenon ( $\alpha$ -PPP) [Ray i wsp., 2019].

Następnie oceniłam pamięć rozpoznawczą zależną od PER, która jest funkcjonalnie powiązana z hipokampem [Jo i Lee wsp., 2010] i pełni kluczową rolę w percepcji obiektów a także w odróżnianiu nowych obiektów od tych wcześniej poznanych [Antunes i Białą, 2012].

Wykazałam, iż MDPV powoduje zaburzenia krótko- i długotrwałej pamięci rozpoznawczej. Zaburzenia te były wyraźne u myszy otrzymujących MDPV w dawce 10 mg/kg. Brak jednoznacznego efektu dla wyższej z dawek może wynikać z większej wariacji wyników wśród myszy otrzymujących MDPV. Mimo braku różnicy w porównaniu do grupy kontrolnej, myszy traktowane MDPV w dawce 20 mg/kg przejawiały brak preferencji względem nowego obiektu po 3-godzinnej retencji, wykazany testem t-Studenta dla jednej próby, co może wskazywać na wystąpienie zaburzeń krótkotrwałej pamięci rozpoznawczej. Upośledzenie pamięci rozpoznawczej, będące skutkiem ekspozycji na MDPV, jest zgodne z wcześniejszymi badaniami dotyczącymi klasycznych związków psychostymulujących [Acevedo i wsp., 2007; Dong i wsp., 2018] i syntetycznych katynonów [Bernstein i wsp., 2020; Daniel i Hughes, 2016; Motbey i wsp., 2012; Sewalia i wsp., 2018]. Długotrwałe podawanie wysokich dawek mefedronu szczurom w okresie adolescencji skutkowało wystąpieniem zaburzeń w teście NOR przeprowadzonym po pięciu tygodniach od zakończenia podawania związku [Motbey i wsp. 2012]. Również Sewalia i wsp. (2018) wykazali, iż powtarzalne samopodawanie MDPV u dorosłych szczurów doprowadziło

do osłabienia długotrwałej pamięci rozpoznawczej testowanej po 3-tygodniowym okresie retencji. Autorzy wiążą wystąpienie zaburzeń pamięci rozpoznawczej z procesami neurodegeneracyjnymi wykrytymi w PER i EC, podczas gdy w hipokampie nie zaobserwowano zmian. Dodatkowo, nie wykryto zaburzeń w teście rozpoznawania lokalizacji obiektów (ang. *spatial object recognition*, SOR), co również sugeruje brak zmian w funkcjonowaniu hipokampa [Sewalia i wsp., 2018]. Ponadto, Bernstein i wsp. (2020) wykazali, iż chroniczne podawanie MDPV szczurom powoduje zaburzenia krótkotrwałej pamięci rozpoznawczej testowanej krótko po wykonaniu ostatniej iniekcji. MDPV powodował też zaburzenia przekaźnictwa dopaminergicznego w układzie mezokortykalnym, przejawiające się wzrostem wrażliwości na dopaminę w VTA oraz PFC [Bernstein i wsp., 2020], do której docierają projekcje z PER, EC i hipokampa [Hoover i Vertes, 2007].

Ostatnim etapem badań behawioralnych był test MWM, który miał za zadanie wykryć u myszy zaburzenia długotrwałej pamięci przestrzennej, pamięci referencyjnej i elastyczności kognitywnej, zależnych od hipokampa. Proces uczenia się opiera się na motywacji, powiązanej z instynktem przetrwania, oraz na przetwarzaniu informacji, na co składa się ich przyswojenie, konsolidacja i odzyskiwanie w celu przyjęcia adekwatnej postawy w danej sytuacji. Procesy te są warunkowane neuro- i synaptogenezą zachodzącą w hipokampie [Lubbers i wsp., 2007; Vorhees i Williams, 2006].

MDPV nie powoduje zaburzeń w teście MWM u myszy, co wskazuje, iż MDPV nie osłabia zdolności do nauki i pamięci przestrzennej. Co ciekawe, podczas testu MWM niektóre myszy biernie unosiły się na powierzchni wody. W trakcie oceny zdolności pływania z wykorzystaniem oznakowanej, wynurzonej nad powierzchnię wody platformy myszy wykazywały odpowiedni poziom motywacji, aby wykonać poprawnie to nieskomplikowane zadanie. Jednak wraz z kolejnymi etapami testu MWM, gdy zadanie wymagało zaangażowania różnych typów pamięci, wykazania się elastycznością kognitywną, a tym samym stawało się coraz trudniejsze do wykonania, myszy miały tendencję do pozostawiania w bezruchu w basenie. Warto podkreślić, iż bierne unoszenie się na powierzchni wody, a w efekcie brak zaangażowania w poszukiwanie platformy, jest uznawane za zachowanie niezależne od funkcji kognitywnych, lecz oparte na motywacji

i związane z odczuwaniem stresu oraz będące oznaką bezradności [Castillo-Mariqueo i Giménez-Llort, 2020]. Myszy są zwierzętami zamieszkującymi względnie suche tereny, dlatego wykazują wrodzony lęk wobec wody, a pływanie stanowi dla nich stresującą czynność, co potwierdza podwyższony poziom kortykosteronu stwierdzony u myszy poddanych testowi MWM [Castillo-Mariqueo i Giménez-Llort, 2020; Harrison i wsp., 2009; Othman i wsp., 2022]. Na podstawie powyższych obserwacji można postawić hipotezę, iż w moim eksperymencie wydłużony czas biernego unoszenia się na powierzchni wody przez myszy otrzymujące MDPV w dawce 20 mg/kg jest spowodowany zmniejszoną tolerancją na przewlekły stres odczuwany podczas doświadczenia, która przejawiała się postępującym spadkiem motywacji, definiowanej jako bierność i brak dążenia do celu [Philips i wsp., 2018]. Potwierdzenie powyższej hipotezy i określenie wpływu MDPV na stres i motywację zwierząt wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

Po ukończeniu zaplanowanych badań behawioralnych myszy poddałam eutanazji, aby przeprowadzić analizy biochemiczne dotyczące budowy i funkcjonowania hipokampa w ramach realizacji głównego celu niniejszej pracy. Z tego względu nie było możliwości przeprowadzenia badań behawioralnych oceniających oznaki depresji m.in. bezradność, które byłby odpowiednie do weryfikacji hipotezy o spadku motywacji wywołanym przez MDPV. Przykładami takich testów mogłyby być: test wymuszonego pływania Porsolta czy test zawieszenia za ogon [Wojcieszak i wsp., 2021] lub testy z wykorzystaniem labiryntu w kształcie litery Y umożliwiające zwierzęciu dokonanie wyboru pomiędzy wykonaniem pracy w celu uzyskania bardziej wartościowej nagrody a zadowoleniem się mniej atrakcyjną, ale łatwo dostępną nagrodą [Hart i Izquierdo, 2019; Philips i wsp., 2018].

Obserwacja, iż postnatalna ekspozycja na MDPV nie zaburza pamięci przestrzennej myszy po osiągnięciu wieku dorosłego nie jest zgodna z niektórymi publikacjami opisującymi wpływ podawania gryzoniom metamfetaminy lub MDMA w okresie prenatalnym bądź we wczesnym okresie po narodzeniu [Acevedo i wsp., 2007; Petrikova-Hrebickova i wsp., 2021; Skelton i wsp., 2008; Williams i wsp. 2004]. Jednakże istnieją również doniesienia, wskazujące, iż prenatalna ekspozycja na metamfetaminę nie wywołuje zaburzeń pamięci



przestrzennej i referencyjnej [Schutová i wsp., 2008]. Liczba badań dotyczących wpływu syntetycznych katynonów jest niewielka. Wykazano, że ekspozycja ciężarnych myszy na mefedron w sposób powtarzalny (3 razy dziennie podczas 6 wybranych dni z okresami abstynencji) lub ciągły (raz dziennie przez 14 kolejnych dni), skutkuje zaburzeniami nauki przestrzennej i pamięci referencyjnej testowanej u potomstwa w wieku 60 dni. Powtarzalny sposób podawania, odzwierciedlający rekreacyjne stosowanie dopalaczy, wydaje się powodować silniejsze następstwa u potomstwa. Myszy, których matki otrzymywały wysoką dawkę mefedronu w sposób powtarzalny wykazywały zaburzenia nauki przestrzennej, przejawiające się istotnie wydłużonym czasem potrzebnym do wpłynięcia na platformę i przebyciem dłuższego dystansu w jej poszukiwaniu. Natomiast zarówno myszy pochodzące z miotów ciężarnych samic traktowanych mefedronem w sposób powtarzalny, jak i ciągły, podczas próby pamięci przestrzennej spędzały znacząco krótszy czas w kwadrancie, w którym uprzednio znajdowała się platforma. Istotne zmiany morfologiczne w hipokampie zaobserwowano w wyniku powtarzalnej ekspozycji w okresie prenatalnym. Autorzy wiążą zaburzenia pamięci ze zmniejszoną proliferacją i zwiększoną apoptozą komórek w DG oraz w regionach CA1, CA2 i CA3 hipokampa oraz zwiększoną ekspresją genów proapoptotycznych, natomiast zmniejszoną antyapoptotycznych [Naseri i wsp., 2018]. Podobnie, mefedron podany myszom w okresie adolescencji powodował po tygodniu od zaprzestania podawania pogorszenie nauki przestrzennej, istotnie wydłużając czas wpłynięcia na platformę, i osłabienie pamięci referencyjnej, zmniejszając odsetek czasu spędzonego w kwadrancie z platformą. Autorzy zaobserwowali też istotny spadek proliferacji zachodzącej w DG, mierząc liczbę BrdU-pozytywnych komórek [Ciudad-Roberts i wsp., 2016]. Wyniki badań przeprowadzonych przez López-Arnau i wsp. (2014, 2015) są częściowo zgodne z rezultatami testu MWM uzyskanymi w niniejszej pracy. Wykazały one, że mefedron i metylon podawany samcom szczurów w okresie adolescencji nie powoduje zaburzeń nauki przestrzennej. Aczkolwiek powoduje zaburzenia pamięci referencyjnej. Podczas próby pamięci przestrzennej odsetek czasu spędzony w kwadrancie, w którym uprzednio znajdowała się platforma, w porównaniu do odsetka czasu spędzonego w kwadrancie znajdującym się naprzeciwko niego, nie różnił się istotnie u myszy traktowanych mefedronem lub metylonem. Podczas gdy myszy

z grupy kontrolnej preferowały kwadrant, w którym uprzednio znajdowała się platforma [López-Arnau i wsp. 2014; López-Arnau i wsp. 2015]. Podobnie jak w moim eksperymencie, den Hollander i wsp. (2013) nie wykazali zaburzeń na etapie nauki przestrzennej i próbie pamięci przestrzennej po upływie 8 tygodni od długotrwałego podawania mefedronu i metylonu myszom. Natomiast podczas próby pamięci nowej lokalizacji platformy zwierzęta traktowane metylonem lub mefedronem w porównaniu do myszy z grupy kontrolnej spędzały istotnie krótszy czas w kwadrancie, w którym znajdowała się platforma przed zamianą jej lokalizacji. Ponadto myszy, które otrzymywały metylon, spędzały znamienne dłuższy czas w kwadrancie docelowym niż myszy z grupy kontrolnej. Autorzy sugerują, że przyczyną uzyskania lepszych rezultatów przez myszy, otrzymujące mefedron lub metylon od myszy z grupy kontrolnej podczas próby pamięci nowej lokalizacji platformy, niekoniecznie jest zwiększenie zdolności do nauki, lecz możliwe jest szybsze zapominanie poprzedniej lokalizacji platformy [den Hollander i wsp., 2013].

Ponieważ liczne badania wskazują, że tworzenie nowych neuronów w hipokampie jest kluczowe dla procesów uczenia się i pamięci przestrzennej [Vorhees i Williams 2006], oceniłam proliferację komórek zachodzącą w DG podczas podawania MDPV. Szacuje się, że 85% komórek w warstwie ziarnistej, która jest dominującą warstwą DG, powstaje po narodzinach [Bond i wsp., 2020]. W niniejszej pracy wykazałam, że podawanie MDPV nie zaburza procesów neurogenezy w DG myszy podczas wczesnego okresu postnatalnego (PD11-20), ponieważ pomiędzy grupami traktowanymi MDPV a kontrolnymi nie wystąpiły różnice w liczbie komórek znakowanych BrdU, a także tych posiadających zarówno BrdU jak i NeuN.

Rozwój pamięci jest kontrolowany poprzez odpowiednie funkcjonowanie połączeń synaptycznych pomiędzy komórkami hipokampa, warunkowane modulacją aktywności neuronów i syntezą białek synaptycznych [Tsetsenis i wsp., 2023]. Neurony powstające w dorosłości muszą zintegrować się z komórkami formacji hipokampa poprzez tworzenie nowych połączeń synaptycznych, podczas gdy istniejące neurony również tworzą nowe połączenia synaptyczne lub wzmacniają wcześniej utworzone. Liczbę połączeń synaptycznych oszacowałam poprzez pomiar ekspresji białek stanowiących

markery synaptyczne [Mardones i wsp., 2019]. SYP stanowi główne białko występujące w błonie pęcherzyków synaptycznych, znajdujących się w zakończeniach neuronów presynaptycznych w OUN. Odpowiada ona za tworzenie synaps i neuroprzebieżnictwo [García-Mesa i wsp., 2022]. PSD95 jest białkiem postsynaptycznym odpowiedzialnym za morfologiczne dojrzewanie neuronów utworzonych w wieku dorosłym oraz formowaniu kolców dendrytycznych [Mardones i wsp., 2019]. Co istotne, dopamina odgrywa ważną rolę w długofalowej regulacji plastyczności synaptycznej hipokampa, wspomagając procesy uczenia się i pamięci [Tsetsenis i wsp., 2023]. Wykazałam, że postnatalna ekspozycja myszy na MDPV nie zmienia ekspresji SYP ani PSD95 w hipokampie myszy, co sugeruje brak poważnych zaburzeń neuroplastyczności DG.

Biorąc pod uwagę, że hipokamp stanowi główną strukturę mózgu odpowiedzialną za funkcje kognitywne, głównym celem niniejszej pracy było ustalenie, czy MDPV zaburza jego funkcjonowanie. Niektóre badania wskazują, że związki psychostymulujące mogą zaburzać funkcje poznawcze nie tylko zależne od hipokampa, ale też od innych struktur funkcjonalnie powiązanych z hipokampem np. EC zaangażowanej wraz z hipokampem w nawigację allocentryczną [Vorhees i Williams, 2016]. Aby podejść do problemu badawczego kompleksowo zastosowałam uzupełniające się testy behawioralne mające za zadanie wykryć nie tylko zaburzenia pamięci zależne od funkcjonowania hipokampa, ale także od struktur połączonych lub sąsiadujących z nim. Co ciekawe, nie wykryłam osłabienia zdolności do nauki, pamięci przestrzennej i referencyjnej zależnej od hipokampa, a wyniki te znajdują potwierdzenie w przeprowadzonych badaniach molekularnych, które nie wykazały morfologicznych ani funkcjonalnych zaburzeń w rozwoju hipokampa. Zaobserwowane zaburzenia pamięci roboczej mogą świadczyć o zmianach funkcjonowania PFC, a zaburzenia pamięci rozpoznawczej – PER. Jednak, aby zweryfikować te hipotezy konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań.

Wykazałam, że MDPV upośledza pamięć roboczą i rozpoznawczą myszy w sposób niezależny od płci. Większość doświadczeń oceniających efekty działania związków psychostymulujących na pamięć gryzoni było przeprowadzonych jedynie na samcach [Ciudad-Roberts i wsp., 2016;

den Hollander i wsp., 2013; Ladrón de Guevara-Miranda i wsp., 2017; López-Arnau i wsp., 2014; López-Arnau i wsp., 2015; Mañas-Padilla i wsp., 2021; Marszałek-Grabska i wsp., 2022; Motbey i wsp., 2012; Ray i wsp., 2019; Schutová i wsp., 2008; Sewalia i wsp., 2018; Seyedhosseini Tamijani i wsp., 2018]. Doświadczenia przeprowadzone na zwierzętach obojga płci zazwyczaj sugerują większą wrażliwość samic na neurotoksyczne działanie klasycznych narkotyków psychostymulujących [Acevedo i wsp., 2007; Levin i Seidler, 1993; Melnick i wsp., 2001; Siegel i wsp., 2010]. Przykładowo, dorosłe samice szczurów, które były traktowane w okresie prenatalnym kokainą, wykazały zaburzenia zdolności do nauki i pamięci przestrzennej zależnej od hipokampa, ocenionej przy użyciu labiryntu ośmioramiennego, podczas gdy pamięć samców nie uległa pogorszeniu [Levin i Seidler, 1993]. Podobnie, w tym samym teście, samice dorosłych szczurów otrzymujących kokainę w okresie PD11-20 wykazały tendencję do popełniania większej liczby błędów, co może wskazywać na większą podatność samic niż samców na osłabienie pamięci [Melnick i wsp., 2001]. Również jedynie samice otrzymujące metamfetaminę w okresie PD11-20 wykazały zaburzenia zdolności do lokalizacji zanurzonej pod powierzchnią wody platformy w teście MWM [Acevedo i wsp., 2007; Williams i wsp., 2004]. Istnieją jednak doniesienia, że niektóre typy zaburzeń pamięci występują niezależnie od płci. Myszy obojga płci otrzymujące metamfetaminę w okresie rozwoju hipokampa wykazywały upośledzenie zdolności rozpoznawania nowego obiektu w dorosłości [Acevedo i wsp., 2007; Siegel i wsp., 2010] i adolescencji [Siegel i wsp., 2011]. Z drugiej strony są też badania sugerujące wyższą podatność samców na szkodliwe działanie związków psychostymulujących wywierane na pamięć [Dong i wsp., 2018]. Dong i wsp. (2018) zaobserwowali zaburzenia krótkotrwałej pamięci rozpoznawczej i przestrzennej pamięci referencyjnej jedynie u męskiego potomstwa samic, otrzymujących metamfetaminę od okresu adolescencji do dorosłości, włączając w to okres ciąży. Podsumowując, warto zaznaczyć, że badania przedkliniczne charakteryzują się pewnymi ograniczeniami, takimi jak różnice w wykorzystanych protokołach doświadczalnych, zastosowanych modelach statystycznych, czy też wykorzystaniem niewielkich grup badanych zwierząt, co może prowadzić do otrzymania różnych wyników i wyciągnięcia odmiennych wniosków.

W tym miejscu należy więc wymienić pewne ograniczenia niniejszej pracy. Rozbieżność pomiędzy uzyskanymi przez mnie wynikami a publikacjami innych autorów może wynikać z subtelnych różnic w projekcie badań. Różnice w teście MWM są nieuniknione zważywszy na niski stopień standaryzacji protokołów. Zarówno basen jak i platforma mogą mieć różną średnicę nawet jeżeli są używane do prowadzenia doświadczeń z wykorzystaniem tych samych gatunków bądź szczepów gryzoni. Zwierzęta mogą być testowane w różnej kolejności, fazy testowania mogą różnić się liczbą dni, liczbą sesji w ciągu dnia, a przerwy między sesjami lub dniami mogą mieć różną długość. Również wskazówki umożliwiające zwierzętom nawigację i orientację przestrzenną mogą różnić się rozmiarem i rozmieszczeniem np. stanowić wyposażenie pomieszczenia, być zawieszane nad basenem itd. W przypadku niewpłynięcia na platformę w fazie nauki, zwierzęta mogą być na nią prowadzone lub umieszczane na niej przez badacza, a czas, w którym zwierzę może obserwować pomieszczenie znajdując się na platformie również może być różny. Wszystkie wymienione warunki i czynniki mogą wpływać na wyniki końcowe przeprowadzonego doświadczenia. Dodatkowo w cytowanych publikacjach badano różne związki psychostymulujące, w różnych dawkach i schematach dawkowania, podawane zwierzętom w różnym wieku, czy na innym etapie rozwoju. W większości dotychczasowych badań w okresie kluczowym dla rozwoju hipokampa podawano metamfetaminę. Uwzględniając pewne analogie budowy strukturalnej i efektów działania MDPV do metamfetaminy można by przypuszczać, że ich wpływ na pamięć zwierząt będzie również zbliżony. Jednak między MDPV i metamfetaminą istnieją subtelne różnice. MDPV jest inhibitorem białek transportujących neuroprzekaźniki monoaminowe. Cechuje go przede wszystkim wyjątkowa selektywność i siła inhibicji wobec DAT. Silnie hamuje on też NET. W efekcie MDPV hamuje wychwyty zwrotny dopaminy i noradrenaliny ze szczeliny synaptycznej do neuronów presynaptycznych. W odróżnieniu od MDPV metamfetamina jest substratem, zwiększającym uwalnianie dopaminy i noradrenaliny z neuronów presynaptycznych do szczeliny synaptycznej [Eshleman i wsp., 2013]. Chociaż oba związki zwiększają neuroprzekaźnictwo dopaminergiczne i noradrenergiczne, to odmienny mechanizm działania może być przyczyną, dla której myszy traktowane MDPV nie przejawiały zaburzeń pamięci przestrzennej w przeciwieństwie do tych traktowanych metamfetaminą.

Podobnie pewne rozbieżności między wynikami uzyskanymi przez myszy, którym podawano mefedron lub metylon a traktowanymi MDPV, mogą wynikać z różnic w powinowactwie do białek transportujących. Mefedron charakteryzuje się zbliżonym powinowactwem do DAT i SERT, natomiast metylon wykazuje preferencję wobec SERT, podczas gdy MDPV nie wykazuje istotnej aktywności wobec SERT. Co więcej, mefedron i metylon działają zarówno jako inhibitory wychwytu zwrotnego jak i substraty transporterów monoaminowych [Baumann i wsp., 2017; Eshleman i wsp., 2013].

Warto podkreślić, iż dotychczas opublikowano niewiele badań dotyczących wpływu syntetycznych katynonów na rozwijający się mózg. Według mojej najlepszej wiedzy niniejsze badania po raz pierwszy oceniają następstwa ekspozycji myszy w okresie PD11-20 na MDPV odnośnie funkcji kognitywnych myszy w okresie dorosłości. Uzyskane przeze mnie wyniki mogą przyczynić się do określenia mechanizmu szkodliwego działania MDPV na rozwijający się mózg, a także do oszacowania ryzyka związanego z zażywaniem syntetycznych katynonów przez kobiety w ciąży.

## 6. Wnioski

- (1) MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg nie zwiększa w istotny sposób śmiertelności myszy podczas etapu podawania związku. W okresie podawania wystąpiło zależne od dawki, istotne zmniejszenie przyrostu masy ciała. W dorosłości nie występowały różnice w masie ciała myszy.
- (2) MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg powoduje zaburzenia roboczej pamięci przestrzennej wykryte w teście spontanicznej alternacji.
- (3) MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg powoduje pogorszenie krótkotrwałej pamięci rozpoznawczej u myszy, natomiast w dawce 10 mg/kg zaburza również pamięć długotrwałą.
- (4) MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg nie upośledza zależnej od hipokampa nauki i pamięci przestrzennej oraz pamięci referencyjnej ocenionej przy użyciu testu MWM. Ponadto, MDPV nie upośledza elastyczności kognitywnej myszy, co wykazano w teście MWM ze zmienioną lokalizacją platformy.
- (5) MDPV w dawce 20 mg/kg powoduje u myszy epizody biernego unoszenia się na powierzchni wody w trakcie testu MWM, które mogą być związane ze spadkiem motywacji w wyniku pogorszonej tolerancji przewlekłego stresu, jaki odczuwają zwierzęta podczas pływania.
- (6) MDPV w dawce 20 mg/kg nie zaburza neurogenezy w DG myszy zachodzącej w okresie jego rozwoju (PD11-20). Myszy otrzymujące MDPV w dawce 20 mg/kg nie różniły się istotnie od grupy kontrolnej pod względem średniej liczby komórek znakowanych BrdU. Nie wystąpiły istotne różnice między grupami myszy w procentowym udziale neuronów i astrocytów powstałych w trakcie podawania MDPV.
- (7) MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg nie powoduje poważnych zaburzeń plastyczności synaptycznej, ocenionej na podstawie ekspresji białka presynaptycznego SYP i postsynaptycznego PSD95, w hipokampie dorosłych myszy.
- (8) Wszystkie zaobserwowane efekty działania MDPV na pamięć myszy wystąpiły niezależnie od płci zwierząt.

**(9)** Zarówno badania behawioralne, jak i molekularne wskazują na brak wpływu MDPV na funkcjonowanie hipokampa. Zaobserwowane zaburzenia pamięci mogą świadczyć o możliwych zmianach w obrębie innych struktur funkcjonalnie połączonych z hipokampem. Weryfikacja tej hipotezy wymaga przeprowadzenia dalszych badań.



## 7. Streszczenie w języku polskim

Zażywanie substancji psychoaktywnych stanowi poważny problem zdrowotny i społeczny. Nowe substancje psychoaktywne (ang. *novel psychoactive substances*, NPS), w Polsce powszechnie znane jako „dopalacze”, pojawiły się w połowie pierwszej dekady XXI wieku jako tania i legalna alternatywa dla narkotyków objętych międzynarodową kontrolą. Syntetyczne katynony stanowią drugą co do wielkości i rozpowszechnienia grupę NPS. Charakteryzuje je podobieństwo strukturalne do klasycznych związków psychostymulujących, takich jak MDMA („ecstasy”) i metamfetamina, a także ten sam mechanizm działania – nasilenie impulsacji nerwowej w mózgu poprzez podwyższenie poziomu neuroprzekaźników monoaminowych tj. dopaminy, noradrenaliny i serotoniny w szczeliny synaptycznej. 3,4-Metylenodioksympirowaleron (MDPV) należy do syntetycznych katynonów o szczególnie silnym działaniu dopaminergicznym, którego zażywanie często skutkuje wystąpieniem poważnych objawów zatrucia związanych z neurotoksycznością, co może doprowadzić do zgonu.

Negatywny wpływ klasycznych związków psychostymulujących na funkcje poznawcze i pamięć odnotowano u dzieci kobiet zażywających narkotyki w okresie ciąży. Ekspozycja gryzoni w okresie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego na klasyczne narkotyki psychostymulujące prowadzi do wystąpienia zaburzeń pamięci u młodych i dorosłych zwierząt. Wiadomo, iż procesy uczenia się i zapamiętywania są uwarunkowane tworzeniem nowych neuronów i połączeń synaptycznych w obszarze zakrętu zębatego hipokampa (ang. *dentate gyrus*, DG), jednak neurobiologiczne mechanizmy leżące u podstaw odległych skutków ekspozycji na związki psychostymulujące w okresie rozwoju są złożone i nie w pełni poznane. Obecnie, dysponujemy niewielką liczbą danych dotyczących możliwych długotrwałych efektów neurotoksycznych wywieranych przez syntetyczne katynony na rozwijający się mózg.

Celem niniejszej rozprawy jest ocena wpływu MDPV, podawanego myszom od 11 do 20 dnia po narodzinach (PD11-20), na rozwój i funkcje hipokampa oraz na pamięć zwierząt po osiągnięciu dorosłości. Wybrany okres podawania MDPV u myszy odpowiada trzeciemu trymestrowi ciąży u człowieka

pod względem kluczowego czasu rozwoju hipokampa. W doświadczeniach wykorzystano zarówno samce jak i samice myszy, aby określić, czy neurotoksyczność MDPV jest zależna od płci.

Samcom i samicom myszy szczepu C57BL/6J w wieku PD11-20 wykonywano dwie podskórne iniekcje dziennie roztworu MDPV (10 lub 20 mg/kg masy ciała) lub soli fizjologicznej. Dodatkowo myszy otrzymywały raz dziennie podskórnie roztwór bromodeoksyurydyny (BrdU) – markera proliferacji komórkowej. Po osiągnięciu dojrzałości w wieku 12 tygodni, myszy wykorzystano do oceny różnych typów pamięci przy użyciu uzupełniających się testów behawioralnych. Roboczą pamięć przestrzenną oceniono przy pomocy testu spontanicznej alternacji w labiryncie Y, krótko- i długotrwałą pamięć rozpoznawczą w teście rozpoznawania nowego obiektu po 3- i 24-godzinnej retencji, natomiast naukę i pamięć przestrzenną oraz pamięć referencyjną w teście labiryntu wodnego Morrisa (ang. *Morris water maze*, MWM). Po zakończeniu badań behawioralnych wyizolowano mózgi myszy w celu dokonania oceny neurogenezy w DG, wykrywając komórki zawierające BrdU przy użyciu technik immunohistochemicznych, oraz w celu dokonania oceny plastyczności synaptycznej hipokampa poprzez pomiar ekspresji synaptofizyny (ang. *synaptophysin*, SYP) i białka gęstości postsynaptycznej 95 (ang. *postsynaptic density protein 95*, PSD95) przy pomocy metody Western blot.

Wykryto, iż postnatalna ekspozycja na MDPV skutkuje zaburzeniami roboczej pamięci przestrzennej oraz krótko- i długotrwałej pamięci rozpoznawczej. Natomiast MDPV nie zaburza zależnej od hipokampa nauki i pamięci przestrzennej oraz pamięci referencyjnej, co znajduje potwierdzenie w braku wykrytych zaburzeń neurogenezy w DG i plastyczności synaptycznej w hipokampie. Podczas testu MWM zaobserwowano, iż u niektórych myszy otrzymujących MDPV w dawce 20 mg/kg wystąpiły epizody biernego unoszenia się na powierzchni wody, co może być związane ze spadkiem motywacji w wyniku pogorszonej tolerancji przewlekłego stresu jaki odczuwają zwierzęta podczas pływania. Wszystkie zaobserwowane efekty działania MDPV na zachowanie myszy wystąpiły niezależnie od płci zwierząt. Pomimo, iż badania behawioralne i molekularne wskazują na brak zaburzeń rozwoju i funkcjonowania hipokampa w wyniku ekspozycji na MDPV, to zaobserwowane zaburzenia

pamięci roboczej i rozpoznawczej mogą świadczyć o zmianach funkcjonowania struktur mózgowych funkcjonalnie powiązanych z hipokampem. Jednak, aby zweryfikować te hipotezy konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań.

Podsumowując, ekspozycja na MDPV w okresie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego myszy skutkuje występowaniem zaburzeń pamięci w dorosłości. Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy mogą przyczynić się do określenia mechanizmu szkodliwego działania MDPV na rozwijający się mózg oraz mogą posłużyć do oszacowania ryzyka związanego z zażywaniem syntetycznych katynonów przez kobiety w ciąży.

## 8. Streszczenie w języku angielskim

Abuse of psychoactive substances poses a serious threat to public health. Novel psychoactive substances (NPS), generally known as “designer drugs”, appeared around the half of the first decade of the 21<sup>st</sup> century being a cheap and legal alternative to internationally scheduled drugs of abuse. Synthetic cathinones are the second largest and most prevalent group of NPS. They have similar chemical structures to classic psychostimulants, such as MDMA (“ecstasy”) or methamphetamine, as well they display the same mechanism of action – potentiation of brain signaling by elevating levels of monoamine neurotransmitters i.e., dopamine, noradrenaline and serotonin in the synaptic cleft. 3,4-Methylenedioxypyrovalerone (MDPV) is a synthetic cathinone with particularly potent dopaminergic activity, abuse of which frequently results in severe symptoms of intoxication linked to neurotoxicity that can even be lethal.

Negative impact of classical psychostimulants was observed in children of women abusing them during pregnancy. Exposure to classical psychostimulant drugs of abuse during development of the central nervous system induces impairment of memory in young and adult animals. It is known that learning and memory are associated with generation of new neurons and synaptic connections in a specific region of the hippocampus – the dentate gyrus (DG). However, the neurobiological mechanisms underlying distant aftermaths of exposure to psychostimulants during neurodevelopmental stage are complex and not fully resolved. At the moment, the data on long-term consequences of neurodevelopmental exposure to synthetic cathinones is scarce.

This dissertation aims to assess the effects of MDPV, administered to mice on postnatal days 11 to 20 (PD11-20), on development and functioning of the hippocampus as well as on memory of adult animals. The selected period corresponds to the 3<sup>rd</sup> trimester of human pregnancy in terms of the crucial time for hippocampal development. In the experiments mice of both sexes were used, to find out if neurotoxicity of MDPV is sex-dependent.

Male and female C57BL/6J inbred mice at the age of PD11-20 were injected subcutaneously, twice a day, with MDPV (10 or 20 mg/kg of body weight) or saline. Additionally, mice were injected subcutaneously, once a day, with

bromodeoxyuridine (BrdU) – a marker of cell proliferation. After reaching adulthood, at the age of 12 weeks, mice underwent the assessment of various types of memory with complementary behavioral tests. Working spatial memory was measured with Y-maze spontaneous alternation test, short- and long-term recognition memory with novel object recognition test after 3- and 24-h retention time, while spatial learning and memory as well as reference memory with Morris water maze (MWM) paradigm. After completion of behavioral testing, mouse brains were isolated for assessment of neurogenesis in the DG by identification of BrdU-labeled cells, and for assessment of synaptic plasticity of the hippocampus by measurement of synaptophysin (SYP) and postsynaptic density protein (PSD95) expression with Western blot.

It has been revealed that postnatal exposure to MDPV resulted in impairment of working spatial memory as well as short and long-term recognition memory. However, MDPV did not disturb hippocampal-dependent learning, spatial memory and reference memory, what was confirmed by a lack of impairment of neurogenesis in the DG and synaptic plasticity in the hippocampi of animals. During MWM test, in some mice treated with 20 mg/kg MDPV episodes of floating occurred, what might be caused by worsened tolerance to chronic stress experienced by mice while swimming. All observed MDPV effects on mouse behavior were sex-independent. Although behavioral and molecular analysis indicate a lack of developmental and functional impairment of the hippocampus, the observed impairment of working spatial memory and recognition memory might be caused by disturbed functioning of structures functionally connected with the hippocampus. However, further investigation is required to verify these hypotheses.

In conclusion, exposure to MDPV during the development of the central nervous system in mice induces memory impairments in adulthood. The results presented in this dissertation might contribute to determination of the harmful mechanism that MDPV exerts on a developing brain and help to estimate the risk associated with abuse of synthetic cathinones during pregnancy.

## Piśmiennictwo

Aarde SM, Huang PK, Creehan KM, Dickerson TJ, Taffe MA (2013) The novel recreational drug 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) is a potent psychomotor stimulant: self-administration and locomotor activity in rats. *Neuropharmacology*, 71:130-140.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.003>

Acevedo SF, de Esch IJ, Raber J (2007) Sex- and histamine-dependent long-term cognitive effects of methamphetamine exposure. *Neuropsychopharmacology*, 32(3):665–672.

<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301091>

Achat-Mendes C, Lynch LJ, Sullivan KA, Vallender EJ, Miller GM (2012) Augmentation of methamphetamine-induced behaviors in transgenic mice lacking the trace amine-associated receptor 1. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 101(2):201-207. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.10.025>

Adamowicz P, Hydzik P (2019) Fetal death associated with the use of 3,4-MDPHP and  $\alpha$ -PHP. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 57(2):112–116.

<https://doi.org/10.1080/15563650.2018.1502443>

Ádám Á., Gerecsei LI, Lepesi N, Csillag A (2014) Apoptotic effects of the 'designer drug' methylenedioxypyrovalerone (MDPV) on the neonatal mouse brain. *Neurotoxicology*, 44:231-236.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2014.07.004>

Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P (2007) The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*, 163:3-22. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)

Anand KS, Dhikav V (2012) Hippocampus in health and disease: an overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 15(4):239-246.

<https://doi.org/10.4103/0972-2327.104323>

Anizan S, Concheiro M, Lehner KR, Bukhari MO, Suzuki M, Rice KC, Baumann MH, Huestis MA (2016) Linear pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) and its metabolites in the rat: relationship to pharmacodynamic effects. *Addiction Biology*, 21(2):339-347.

<https://doi.org/10.1111/adb.12201>

Antunes M, Biala G (2012) The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2):93-110.

<https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>

Araújo AM, Valente MJ, Carvalho M, Dias da Silva D, Gaspar H, Carvahlo F, Bastos ML, Guedes de Pinho P (2015) Raising awareness of new psychoactive substances: chemical analysis and in vitro toxicity screening of 'legal high' packages containing synthetic cathinones. *Archives of Toxicology*, 89(5):757–771. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1278-7>

- Barha CK, Barker JM, Brummelte S, Epp JR, Galea LAM (2009) Hormone Regulation of Adult Hippocampal Neurogenesis in the Mammalian Brain w: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT (red.) *Hormones, Brain and Behavior*, 4: 2165-2197, wydanie II, San Diego, Academic Press.
- Bartkowska K, Turlejski K, Tepper B, Rychlik L, Vogel P, Djavadian R (2021) Effects of brain size on adult neurogenesis in shrews. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14):7664. <https://doi.org/10.3390/ijms22147664>
- Bartsch T, Wulff P (2015) The hippocampus in aging and disease: from plasticity to vulnerability. *Neuroscience*, 309:1-16. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.084>
- Baumann MH, Bukhari MO, Lehner KR, Anizan S, Rice KC, Concheiro M, Huestis MA (2017) Neuropharmacology of 3,4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV), its metabolites, and related analogs. *Current Topics in Behavioral Neuroscience*, 32:93-117. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2016\\_53](https://doi.org/10.1007/7854_2016_53)
- Baumann MH, Partilla JS, Lehner KR, Thorndike EB, Hoffman AF, Holy M, Rothman RB, Goldberg SR, Lupica CR, Sitte HH, Brandt SD, Tella SR, Cozzi NV, Schindler CW (2013) Powerful cocaine-like actions of 3,4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV), a principal constituent of psychoactive 'bath salts' products. *Neuropsychopharmacology*, 38(4):552-562. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.204>
- Baumann MH, Walters HM, Niello M, Sitte HH (2018) Neuropharmacology of synthetic cathinones w: Maurer H, Brandt S (red.) *New Psychoactive Substances: Handbook of Experimental Pharmacology*, 252:113-142. Springer Cham. [https://doi.org/10.1007/164\\_2018\\_178](https://doi.org/10.1007/164_2018_178)
- Bernstein DL, Nayak SU, Oliver, CF, Rawls SM, Rom S (2020) Methylenedioxypropylvalerone (MDPV) impairs working memory and alters patterns of dopamine signaling in mesocorticolimbic substrates. *Neuroscience Research*, 155:56–62. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2019.07.003>
- Berquist MD 2nd, Traxler HK, Mahler AM, Baker LE (2016) Sensitization to the locomotor stimulant effects of "bath salt" constituents, 4-methylmethcathinone (4-MMC) and 3,4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV), in male Sprague-Dawley rats. *Drug and Alcohol Dependence*, 164:128-134. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.05.001>
- Bond AM, Berg DA, Lee S, Garcia-Epelboim AS, Adusumilli VS, Ming GL, Song H (2020) Differential timing and coordination of neurogenesis and astrogenesis in developing mouse hippocampal subregions. *Brain Sciences*, 10(12):909. <https://doi.org/10.3390/brainsci10120909>
- Borek HA, Holstege CP (2012) Hyperthermia and multiorgan failure after abuse of "bath salts" containing 3,4-methylenedioxypropylvalerone. *Annals of Emergency Medicine*, 60(1):103-105. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2012.01.005>

- Brown MW, Banks PJ (2015) In search of a recognition memory engram. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 50:12-28. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.09.016>
- Calinski DM, Kisor DF, Sprague JE (2019) A review of the influence of functional group modifications to the core scaffold of synthetic cathinones on drug pharmacokinetics. *Psychopharmacology (Berl)*, 236(3):881-890. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-4985-6>
- Cameron K, Kolanos R, Vekariya R, De Felice L, Glennon RA (2013) Mephedrone and methylenedioxypropylvalerone (MDPV), major constituents of bath salts, produce opposite effects at the human dopamine transporter. *Psychopharmacology (Berl.)*, 227(3):493-499. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-2967-2>
- Castillo-Mariqueo L, Giménez-Llort L (2020) Indexes for flotation and circling, two non-search behaviors in the water maze, sensitive to d-galactose-induced accelerated aging and Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 377:112229. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112229>
- Catalani V, Arillotta D, Corkery JM, Guirguis A, Vento A, Schifano F (2021). Identifying new/emerging psychoactive substances at the time of COVID-19; a web-based approach. *Frontiers in Psychiatry*, 11:632405. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.632405>
- Cayuso J, Martí E (2005) Morphogens in motion: growth control of the neural tube. *Journal of Neurobiology*, 64(4): 376-387. <https://doi.org/10.1002/neu.20169>
- Chapy H, Smirnova M, André P, Schlatter J, Chiadmi F, Couraud PO, Scherrmann JM, Declèves X, Cisternino S (2015) Carrier-mediated cocaine transport at the blood-brain barrier as a putative mechanism in addiction liability. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(1):pyu001. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu001>
- Cho KO, Kim SY (2010) Effects of brain insults and pharmacological manipulations on the adult hippocampal neurogenesis. *Archives of Pharmacal Research*, 33(10):1475-1488. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-1002-y>
- Ciudad-Roberts A, Camarasa J, Ciudad CJ, Pubill D, Escubedo E (2015) Alcohol enhances the psychostimulant and conditioning effects of mephedrone in adolescent mice; postulation of unique roles of D3 receptors and BDNF in place preference acquisition. *British Journal of Pharmacology*, 172(20):4970-4984. <https://doi.org/10.1111/bph.13266>
- Ciudad-Roberts A, Duart-Castells L, Camarasa J, Pubill D, Escubedo E (2016) The combination of ethanol with mephedrone increases the signs of neurotoxicity and impairs neurogenesis and learning in adolescent CD-1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 293:10-20. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.019>



- Coccini T, Vecchio S, Crevani M, De Simone U (2019) Cytotoxic effects of 3,4-catechol-PV (one major MDPV metabolite) on human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neurotoxicity Research*, 35(1):49-62. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9924-0>
- Concheiro M, Towler S, Elmore JS, Chojnacki MR, Acosta T, Suzuki M, Rice KC, Baumann MH (2022) Brain Concentrations of MDPV and its Metabolites in Male Rats: Relationship to Pharmacodynamic Effects. *Current Pharmaceutical Design*, 28(32): 2653-2663. <https://doi.org/10.2174/1381612828666220907100036>
- Corkery JM, Guirguis A, Papanti DG, Orsolini L, Schifano F (2018) Synthetic cathinones – prevalence and motivations for use w: Zawilska JB (red.) *Synthetic cathinones*. *Current Topics in Neurotoxicity*, 12:153–189. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-78707-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-78707-7_9)
- Daniel JJ, Hughes RN (2016) Increased anxiety and impaired spatial memory in young adult rats following adolescent exposure to methylone. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 146-147:44-49. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.05.003>
- D'Ardenne K, Eshel N, Luka J, Lenartowicz A, Nystrom LE, Cohen JD (2012) Role of prefrontal cortex and the midbrain dopamine system in working memory updating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(49):19900-19909. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116727109>
- Daziani G, Lo Faro AF, Montana V, Goteri G, Pesaresi M, Bambagiotti G, Montanari E, Giorgetti R, Montana A (2023) Synthetic cathinones and neurotoxicity risks: a systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7):6230. <https://doi.org/10.3390/ijms24076230>
- De Felice LJ, Glennon RA, Negus SS (2014) Synthetic cathinones: chemical phylogeny, physiology, and neuropharmacology. *Life Sciences*, 97(1):20-26. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.10.029>
- De-Giorgio F, Bilel S, Ossato A, Tirri M, Arfè R, Foti F, Serpelloni G, Frisoni P, Neri M, Marti M (2019) Acute and repeated administration of MDPV increases aggressive behavior in mice: forensic implications. *International Journal of Legal Medicine*, 133(6):1797-1808. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02092-3>
- de Lahunta A, Glass EN, Kent M (2016) Embryonic Development of the Central Nervous System. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 46(2): 193-216. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.10.011>
- den Hollander B, Rozov S, Linden AM, Uusi-Oukari M, Ojanperä I, Korpi ER (2013) Long-term cognitive and neurochemical effects of "bath salt" designer drugs methylone and mephedrone. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 103(3):501–509. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.10.006>
- Denoth-Lippuner A, Jessberger S (2021) Formation and integration of new neurons in the adult hippocampus. *Nature Reviews. Neuroscience*, 22(4):223-236. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00433-z>

Diaz SD, Smith LM, LaGasse LL, Derauf C, Newman E, Shah R, Arria A, Huestis MA, Della Grotta S, Dansereau LM, Neal C, Lester BM (2014) Effects of prenatal methamphetamine exposure on behavioral and cognitive findings at 7.5 years of age. *The Journal of Pediatrics*, 164(6):1333-1338.

<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.01.053>

Dong N, Zhu J, Han W, Wang S, Yan Z, Ma D, Goh ELK, Chen T (2018) Maternal methamphetamine exposure causes cognitive impairment and alteration of neurodevelopment-related genes in adult offspring mice. *Neuropharmacology*, 140:25-34. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.07.024>

Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej: Dz. U. z 2023 r. poz. 172, Art. 4. 11a) Ustawy z dnia 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii. <https://dziennikustaw.gov.pl/D2023000017201.pdf>; dostęp: 7 kwietnia 2023 r.

Europejska Agencja Leków (2023) Withdrawal of marketing authorizations for amfepramone medicines within the EU, EMA/867253/2022. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/amfepramone-containing-medicinal-products-article-31-referral-withdrawal-marketing-authorisations\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/amfepramone-containing-medicinal-products-article-31-referral-withdrawal-marketing-authorisations_en.pdf); dostęp: 20 lipca 2023 r.

EMCDDA (2012) Synthetic cathinones drug profile.

[https://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cathinones\\_en](https://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cathinones_en); dostęp: 16 sierpnia 2023 r.

EMCDDA (2014) Report on the risk assessment of 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(pyrrolidin-1-yl) pentan-1-one (3,4-methylenedioxypropylone, MDPV) in the framework of the Council Decision on new psychoactive substances. [https://www.emcdda.europa.eu/publications/risk-assessment/MDPV\\_en](https://www.emcdda.europa.eu/publications/risk-assessment/MDPV_en); dostęp: 25 lipca 2023 r.

EMCDDA (2022) European Drug Report. Trends and developments.

[https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/14644/EDR\\_2022\\_18-ONLINE.pdf](https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/14644/EDR_2022_18-ONLINE.pdf); dostęp: 7 kwietnia 2023 r.

EMCDDA (2023) European Drug Report 2023: Trends and developments.

[https://www.emcdda.europa.eu/publications/european-drug-report/2023\\_en](https://www.emcdda.europa.eu/publications/european-drug-report/2023_en); dostęp: 24 czerwca 2023 r.

EMCDDA (2024) European Drug Report 2024: Trends and developments.

[https://www.emcdda.europa.eu/publications/european-drug-report/2024\\_en](https://www.emcdda.europa.eu/publications/european-drug-report/2024_en); dostęp: 14 czerwca 2024 r.

Erowid (2013) [https://www.erowid.org/chemicals/mdpv/mdpv\\_dose.shtml](https://www.erowid.org/chemicals/mdpv/mdpv_dose.shtml);

dostęp: 25 lipca 2023 r.

Eshleman AJ, Wolfrum KM, Hatfield MG, Johnson RA, Murphy KV, Janowsky A (2013) Substituted methcathinones differ in transporter and receptor interactions. *Biochemical Pharmacology*, 85(12):1803-1815.

<https://10.1016/j.bcp.2013.04.004>

Eshleman AJ, Wolfrum KM, Reed JF, Kim SO, Swanson T, Johnson RA, Janowsky A (2017) Structure-activity relationships of substituted cathinones, with transporter binding, uptake, and release. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 360(1):33-47.

<https://doi.org/10.1124/jpet.116.236349>

Eshleman AJ, Nagarajan S, Wolfrum KM, Reed JF, Swanson TL, Nilsen A, Janowsky A (2019) Structure-activity relationships of bath salt components: substituted cathinones and benzofurans at biogenic amine transporters. *Psychopharmacology (Berl.)*, 236:939-952. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5059-5>

Fabregat-Safont D, Barneo-Muñoz M, Carbón X, Hernández F, Martínez-García F, Ventura M, Stove CP, Sancho JV, Ibáñez M (2021) Understanding the pharmacokinetics of synthetic cathinones: evaluation of the blood–brain barrier permeability of 13 related compounds in rats. *Addiction Biology*, 26(3):e12979. <https://doi.org/10.1111/adb.12979>

Fantegrossi WE, Gannon BM, Zimmerman SM, Rice KC (2013) In vivo effects of abused 'bath salt' constituent 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) in mice: drug discrimination, thermoregulation, and locomotor activity. *Neuropsychopharmacology*, 38(4):563-573.

<https://doi.org/10.1038/npp.2012.233>

Fares J, Bou Diab Z, Nabha S, Fares Y (2019) Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles. *International Journal of Neuroscience*, 129(6):598-611. <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1545771>

Feng LY, Battulga A, Han E, Chung H, Li JH (2017) New psychoactive substances of natural origin: a brief review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3):461-471. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.04.001>

Freeman TP, Morgan CJA, Vaughn-Jones J, Hussain N, Karimi K, Curran HV (2012) Cognitive and subjective effects of mephedrone and factors influencing use of a 'new legal high'. *Addiction*, 107(4):792-800.

<https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2011.03719.x>

Froberg BA, Levine M, Beuhler MC, Judge BS, Moore PW, Engebretsen KM, Mckeown NJ, Rosenbaum CD, Young AC, Rusyniak DE; ACMT Toxicology Investigators Consortium (Toxic) (2015) Acute Methylenedioxypyrovalerone Toxicity. *Journal of Medical Toxicology*, 11(2):185-194.

<https://doi.org/10.1007/s13181-014-0446-8>

Fuchs E, Flügge G (2014) Adult neuroplasticity: more than 40 years of research. *Neural Plasticity*, 2014:541870. <https://doi.org/10.1155/2014/541870>

Furtak SC, Wei SM, Agster KL, Burwell RD (2007) Functional neuroanatomy of the parahippocampal region in the rat: the perirhinal and postrhinal cortices. *Hippocampus*, 17(9):709-722. <https://doi.org/10.1002/hipo.20314>

- Gage GJ, Kipke DR, Shain W (2012) Whole animal perfusion fixation for rodents. *Journal of Visual Experiments: JoVE*, 30(65):3564. <https://doi.org/10.3791/3564>
- Galaj E, Xi ZX (2019) Potential of cannabinoid receptor ligands as treatment for substance use disorders. *CNS Drugs*, 33(10):1001-1030. <https://doi.org/10.1007/s40263-019-00664-w>
- Gannon BM, Williamson A, Suzuki M, Rice KC, Fantegrossi WE (2016) Stereoselective effects of abused "bath salt" constituent 3,4-methylenedioxypropylvalerone in mice: drug discrimination, locomotor activity, and thermoregulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 356(3):615-623. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.229500>
- García-Mesa Y, García-Piqueras J, Cuendias P, Cobo R, Martín-Cruces J, Feito J, García-Suarez O, Biedma BM, Vega JA (2022) Synaptophysin is a selective marker for axons in human cutaneous end organ complexes. *Annals of Anatomy – Anatomischer Anzeiger*, 243:151955. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2022.151955>
- Gatch MB, Taylor CM, Forster MJ (2013) Locomotor stimulant and discriminative stimulus effects of 'bath salt' cathinones. *Behavioural Pharmacology*, 24(5-6):437-447. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e328364166d>
- Gerecsei LI, Balázsa T, Echevarría D, Ádám Á, Zachar G, Csillag A (2019) Selective neuronal death following exposure to methylenedioxypropylvalerone is accompanied by an inhibition of NMDA receptor NR2B subunit expression. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 79(1):92-100.
- Gerecsei LI, Csillag A, Zachar G, Gévai L, Simon L, Dobolyi Á, Ádám Á (2018) Gestational exposure to the synthetic cathinone methylenedioxypropylvalerone results in reduced maternal care and behavioral alterations in mouse pups. *Frontiers in neuroscience*, 12:27. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00027>
- Geste JR, Pompilus M, Febo M, Buijnzeel AW (2018) Self-administration of the synthetic cathinone MDPV enhances reward function via a nicotinic receptor dependent mechanism. *Neuropharmacology*, 137:286-296. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.05.008>
- GIS (2019) Lista „Top 10” <https://gis.gov.pl/wp-content/uploads/2019/01/TOP-10-2017-17-01-2019>, dostęp: 7 czerwca 2021 r.
- GIS (2023) Ostrzeżenie publiczne: wzrost liczby zgonów związanych z zażyciem syntetycznych katynonów <https://www.gov.pl/web/gis/ostrezenie-publiczne-wzrost-liczby-zgonow-zwiazanych-z-zazyciem-syntetycznych-katynonow>; dostęp: 30 sierpnia 2023 r.
- Glennon RA (2014) Bath salts, mephedrone, and methylenedioxypropylvalerone as emerging illicit drugs that will need targeted therapeutic intervention. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 69:581-620. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420118-7.00015-9>

- Glennon RA, Dukat M (2017) Structure-activity relationships of synthetic cathinones. *Current Topics in Behavioral Sciences*, 32:19-47.  
[https://doi.org/10.1007/7854\\_2016\\_41](https://doi.org/10.1007/7854_2016_41)
- Gonçalves JL, Alves VL, Aguiar J, Caldeira MJ, Teixeira HM, Câmara JS (2021) Structure assignment of seized products containing cathinone derivatives using high resolution analytical techniques. *Metabolites*, 11(3):144.  
<https://doi.org/10.3390/metabo11030144>
- Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH (2016) Adult neurogenesis in the hippocampus: from stem cells to behavior. *Cell*, 167(4):897-914.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.021>
- Gómez-Ruiz LM, Marchei E, Rotolo MC, Brunetti P, Mannocchi G, Acosta-López A, Ramos-Gutiérrez RY, Varela-Busaka MB, Pichini S, Garcia-Algar O (2022) Prevalence of licit and illicit drugs use during pregnancy in Mexican women. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15(3):382.  
<https://doi.org/10.3390/ph15030382>
- Hambuchen MD, Hendrickson HP, Gunnell MG, McClenahan SJ, Ewing LE, Gibson DM, Berquist MD, Owens SM (2017) The pharmacokinetics of racemic MDPV and its (R) and (S) enantiomers in female and male rats. *Drug and Alcohol Dependence*, 179: 347-354. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.07.011>
- Harrison FE, Hosseini AH, McDonald MP (2009) Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behavioural Brain Research*, 198(1):247-251. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.015>
- Hart EE, Izquierdo A (2019) Quantity versus quality: Convergent findings in effort-based choice tasks. *Behavioural Processes*, 164:178–185.  
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2019.05.009>
- Hildebrandt K, Teuchert-Noodt G, Dawirs RR (1999) A single neonatal dose of methamphetamine suppresses dentate granule cell proliferation in adult gerbils which is restored to control values by acute doses of haloperidol. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*, 106(5-6):549-558.  
<https://doi.org/10.1007/s007020050178>
- Hölter SM, Garrett L, Einicke J, Sperling B, Dirscherl P, Zimprich A, Fuchs H, Gailus-Durner V, Hrabě de Angelis M, Wurst W (2015) Assessing cognition in mice. *Current Protocols in Mouse Biology*, 5(4):331-358.  
<https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo150068>
- Homman L, Seglert J, Morgan MJ (2018) An observational study on the sub-acute effects of mephedrone on mood, cognition, sleep and physical problems in regular mephedrone users. *Psychopharmacology (Berl)*, 235(9): 2609-2618.  
<https://doi.org/10.1007/s00213-018-4953-1>
- Hoover WB, Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Structure and Function*, 212(2):149-179.  
<https://doi.org/10.1007/s00429-007-0150-4>

- Huang PK, Aarde SM, Angrish D, Houseknecht KL, Dickerson TJ, Taffe MA. (2012) Contrasting effects of d-methamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxypyrovalerone, and 4-methylmethcathinone on wheel activity in rats. *Drug and Alcohol Dependence*, 126(1-2):168-175. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.05.011>
- Ismail ZI, Bedi KS (2007) Rats exposed to cocaine during late gestation and early postnatal life show deficits in hippocampal pyramidal and granule cells in later life. *Journal of Anatomy*, 210(6):749-760. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00735.x>
- Jablonski SA, Williams MT, Vorhees CV (2016) Mechanisms involved in the neurotoxic and cognitive effects of developmental methamphetamine exposure. *Birth Defects Research Part C Embryo Today: Reviews*, 108(2):131-141. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21130>
- Jalayeri-Darbandi Z, Rajabzadeh A, Hosseini M, Beheshti F, Ebrahimzadeh-Bideskan A (2018) The effect of methamphetamine exposure during pregnancy and lactation on hippocampal doublecortin expression, learning and memory of rat offspring. *Anatomical Science International*, 93(3):351-363. <https://doi.org/10.1007/s12565-017-0419-5>
- Jayaraman K, Das AK, Luehti D, Szöllösi D, Schütz GJ, Reith MAE, Sitte HH, Stockner T (2021) SLC6 transporter oligomerization. *Journal of Neurochemistry*, 157(4):919-929. <https://doi.org/10.1111/jnc.15145>
- Jitcă G, Ősz BE, Tero-Vescan A, Vari CE (2021) Psychoactive drugs – from chemical structure to oxidative stress related to dopaminergic neurotransmission. A Review. *Antioxidants (Basel)*, 10(3):381. <https://doi.org/10.3390/antiox10030381>
- Jo YS, Lee I (2010) Disconnection of the hippocampal-perirhinal cortical circuits severely disrupts object-place paired associative memory. *The Journal of Neuroscience*, 30(29):9850-9858. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1580-10.2010>
- Kalix P. (1980) A constituent of khat leaves with amphetamine-like releasing properties. *European Journal of Pharmacology*, 68(2):213-215. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(80\)90326-x](https://doi.org/10.1016/0014-2999(80)90326-x)
- Kalix P, Khan I (1984) Khat: an amphetamine-like plant material. *Bulletin of the World Health Organization*, 62(5):681-686.
- Kalix P (1996) Catha edulis, a plant that has amphetamine effects. *Pharmacy World and Science*, 18(2):69-73. <https://doi.org/10.1007/BF00579708>
- Karlsson L, Andersson M, Kronstrand R, Kugelberg FC (2014) Mephedrone, methylone and 3,4- methylenedioxypyrovalerone (MDPV) induce conditioned place preference in mice. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 115(5):411-416. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12253>

- Kolanos R, Partilla JS, Baumann MH, Hutsell BA, Banks ML, Negus SS, Glennon RA (2015) Stereoselective actions of methylenedioxypropylamphetamine (MDPV) to inhibit dopamine and norepinephrine transporters and facilitate intracranial self-stimulation in rats. *ACS Chemical Neuroscience*, 6(5):771-777. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00006>
- Kolanos R, Solis E Jr, Sakloth F, De Felice LJ, Glennon RA (2013) "Deconstruction" of the abused synthetic cathinone methylenedioxypropylamphetamine (MDPV) and an examination of effects at the human dopamine transporter. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(12):1524–1529. <https://doi.org/10.1021/cn4001236>
- Koob GF, Volkow ND (2016) Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry*; 3(8):760-773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Kovalevich J, Langford D (2013) Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in Molecular Biology*, 1078:9-21. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2)
- Kruger NJ (2009) The Bradford Method for Protein Quantification. w: Walker JM (red.) *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks, 17-24. Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4)
- Ladrón de Guevara-Miranda D, Millón C, Rosell-Valle C, Pérez-Fernández M, Missiroli M, Serrano A, Pavón FJ, Rodríguez de Fonseca F, Martínez-Losa M, Álvarez-Dolado M, Santín LJ, Castilla-Ortega E (2017) Long-lasting memory deficits in mice withdrawn from cocaine are concomitant with neuroadaptations in hippocampal basal activity, GABAergic interneurons and adult neurogenesis. *Disease models and mechanisms*,10(3):323–336. <https://doi.org/10.1242/dmm.026682>
- Lalonde R (2002) The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(1):91-104. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00041-0](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00041-0)
- Levin ED, Seidler FJ (1993) Sex-related spatial learning differences after prenatal cocaine exposure in the young adult rat. *Neurotoxicology*, 14(1):23-28.
- Lisman J, Buzsáki G, Eichenbaum H, Nadel L, Ranganath C, Redish AD (2017) Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nature Neuroscience*, 20(11):1434-1447. <https://doi.org/10.1038/nn.4661>
- Liu T, Bai W, Xia M, Tian X (2018) Directional hippocampal-prefrontal interactions during working memory. *Behavioural Brain Research*, 338:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.10.003>
- López-Arnau R, Martínez-Clemente J, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J (2014) Serotonergic impairment and memory deficits in adolescent rats after binge exposure of methylone. *Journal of Psychopharmacology*, 28(11):1053-1063. <https://doi.org/10.1177/0269881114548439>

- López-Arnau R, Martínez-Clemente J, Rodrigo T, Pubill D, Camarasa J, Escubedo E (2015) Neuronal changes and oxidative stress in adolescent rats after repeated exposure to mephedrone. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 286(1):27-35. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.03.015>
- Lubbers ME, van den Bos R, Spruijt BM (2007) Mu opioid receptor knockout mice in the Morris Water Maze: a learning or motivation deficit? *Behavioural Brain Research*, 180(1):107-111. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.02.021>
- Luethi D, Kolaczynska KE, Walter M, Suzuki M, Rice KC, Blough BE, Hoener MC, Baumann MH, Liechti ME (2019) Metabolites of the ring-substituted stimulants MDMA, methylone and MDPV differentially affect human monoaminergic systems. *Journal of Psychopharmacology*, 33(7):831-841. <https://doi.org/10.1177/0269881119844185>
- Luethi D, Liechti ME (2018) Monoamine transporter and receptor interaction profiles in vitro predict reported human doses of novel psychoactive stimulants and psychedelics. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 21(10):926-931. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy047>
- Luethi D, Liechti ME (2020) Designer drugs: mechanism of action and adverse effects. *Archives of Toxicology*, 94(4):1085-1133. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02693-7>
- Maggi S, Humphries MD (2022) Activity subspaces in medial prefrontal cortex distinguish states of the world. *The Journal of Neuroscience*, 42(20):4131-4146. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1412-21.2022>
- Maggi S, Peyrache A, Humphries MD (2018) An ensemble code in medial prefrontal cortex links prior events to outcomes during learning. *Nature Communications*, 9(1): 2204. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04638-2>
- Mahmood T, Yang PC (2012) Western Blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9):429-434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Mañas-Padilla MC, Ávila-Gámiz F, Gil-Rodríguez S, Ladrón de Guevara-Miranda D, Rodríguez de Fonseca F, Santín LJ, Castilla-Ortega E (2021) Persistent changes in exploration and hyperactivity coexist with cognitive impairment in mice withdrawn from chronic cocaine. *Physiology and Behavior*, 240:113542. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113542>
- Mardones MD, Jorquera PV, Herrera-Soto A, Ampuero E, Bustos FJ, van Zundert B, Varela-Nallar L (2019) PSD95 regulates morphological development of adult-born granule neurons in the mouse hippocampus. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 98:117-123. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.04.009>
- Marinetti LJ, Antonides HM (2013) Analysis of synthetic cathinones commonly found in bath salts in human performance and postmortem toxicology: method development, drug distribution and interpretation of results. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(3):135-146. <https://doi.org/10.1093/jat/bks136>



- Marszałek-Grabska M, Zakrocka I, Budzynska B, Marciniak S, Kaszubska K, Lemieszek MK, Winiarczyk S, Kotlinska JH, Rzeski W, Turski WA (2022) Binge-like mephedrone treatment induces memory impairment concomitant with brain kynurenic acid reduction in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 454:116216. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116216>
- Martin RP, Dombrowski SC (2008) Prenatal central nervous system development w: Prenatal Exposures: *Psychological and Educational Consequences for Children*. 15-25. Springer New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74398-1>
- Marusich JA, Grant KR, Blough BE, Wiley JL (2012) Effects of synthetic cathinones contained in "bath salts" on motor behavior and a functional observational battery in mice. *Neurotoxicology*, 33(5):1305-1313. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.08.003>
- Melnick SM, Kubie JL, Laungani R, Dow-Edwards DL (2001) Impairment of spatial learning following preweaning cocaine exposure in the adult rat. *Neurotoxicology and Teratology*, 23(5):445-451. [https://doi.org/10.1016/s0892-0362\(01\)00157-x](https://doi.org/10.1016/s0892-0362(01)00157-x)
- Morford LL, Inman-Wood SL, Gudelsky GA, Williams MT, Vorhees CV (2002) Impaired spatial and sequential learning in rats treated neonatally with D-fenfluramine. *European Journal of Neuroscience*, 16(3):491-500. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02100.x>
- Motbey CP, Karanges E, Li KM, Wilkinson S, Winstock AR, Ramsay J, Hicks C, Kendig MD, Wyatt N, Callaghan PD, McGregor IS (2012) Mephedrone in adolescent rats: residual memory impairment and acute but not lasting 5-HT depletion. *PLoS one*, 7(9):e45473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045473>
- Murithi CK, Kabarur JM, Patel NB (2020) Catha edulis Forsk (khat) reduces spontaneous and rewarded alternation in female mice. *IBRO Reports*, 9:270-275. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2020.10.003>
- Naglich AC, Brown ES, Adinoff B (2019) Systematic review of preclinical, clinical, and post-marketing evidence of bupropion misuse potential. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 45(4):341-354. <https://doi.org/10.1080/00952990.2018.1545023>
- Naseri G, Fazel A, Golalipour MJ, Haghiri H, Sadeghian H, Mojarrad M, Hosseini M, Shahrokhi Sabzevar S, Beheshti F, Ghorbani A (2018) Exposure to mephedrone during gestation increases the risk of stillbirth and induces hippocampal neurotoxicity in mice offspring. *Neurotoxicology and Teratology*, 67:10-17. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.03.001>
- Orsolini L, Ciccarese M, Papanti D, De Berardis D, Guirguis A, Corkery JM, Schifano F (2018) Psychedelic fauna for psychonaut hunters: a mini-review. *Frontiers in Psychiatry*, 9:153. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00153>

- Othman MZ, Hassan Z, Che Has AT (2022) Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory. *Experimental animals*, 71(3):264-280. <https://doi.org/10.1538/expanim.21-0120>
- Paillet-Loilier M, Cesbron A, Le Boisselier R, Bourguine J, Debruyne D (2014) Emerging drugs of abuse: current perspectives on substituted cathinones. *Substance Abuse and Rehabilitation*, 5:37-52. <https://doi.org/10.2147/SAR.S37257>
- Paxinos G, Franklin KBJ (2013) Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Wydanie IV. Amsterdam: Academic Press, an imprint of Elsevier.
- Penders TM, Gestring RE, Vilensky DA (2012) Excited delirium following use of synthetic cathinones (bath salts). *General Hospital Psychiatry*, 34(6):647-650. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsy.2012.06.005>
- Petrikova-Hrebickova I, Sevcikova M, Šlamberová R (2021) The impact of neonatal methamphetamine on spatial learning and memory in adult female rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15:629585. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.629585>
- Philips BU, Lopez-Cruz L, Hailwood J, Heath CJ, Saksida LM, Bussey TJ (2018) Translational approaches to evaluating motivation in laboratory rodents: conventional and touchscreen-based procedures. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 22:21-27. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2017.12.008>
- Pichini S, Rotolo MC, García J, Girona N, Leal L, García-Algar O, Pacifici R (2014) Neonatal withdrawal syndrome after chronic maternal consumption of 4-methylethcathinone. *Forensic Science International*, 245:e33–e35. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.10.027>
- Pramod AB, Foster J, Carvelli L, Henry LK (2013) SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3):197-219. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.002>
- Prosser JM, Nelson LS: (2012) The toxicology of bath salts: a review of synthetic cathinones. *Journal of Medical Toxicology*, 8(1):33-42. <https://doi.org/10.1007/s13181-011-0193-z>
- Rada Unii Europejskiej: DECYZJA RADY 2005/387/WSiSW z dnia 10 maja 2005 r. w sprawie wymiany informacji, oceny ryzyka i kontroli nowych substancji psychoaktywnych. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005D0387>; dostęp: 7 kwietnia 2023 r.
- Ray A, Chitre NM, Daphney CM, Blough BE, Canal CE, Murnane KS (2019) Effects of the second-generation "bath salt" cathinone alpha-pyrrolidinopropiophenone ( $\alpha$ -PPP) on behavior and monoamine neurochemistry in male mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 236(3):1107-1117. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5044-z>

- Reichel CM, Ramsey LA, Schwendt M, McGinty JF, See RE (2012) Methamphetamine-induced changes in the novel object recognition memory circuit. *Neuropharmacology*, 62(2):1119-1126.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.11.003>
- Rice D, Barone S Jr (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives*, 108(Suppl 3):511–533.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3511>
- Rickli A, Hoener MC, Liechti ME (2015) Monoamine transporter and receptor interaction profiles of novel psychoactive substances: para-halogenated amphetamines and pyrovalerone cathinones. *European Neuropsychopharmacology*, 25(3):365–376.  
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.12.012>
- Riley AL, Nelson KH, To P, López-Arnau R, Xu P, Wang D, Wang Y, Shen HW, Kuhn DM, Angoa-Perez M, Anneken JH, Muskiewicz D, Hall FS (2020) Abuse potential and toxicity of the synthetic cathinones (i.e., "Bath salts"). *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 110:150-173.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.07.015>
- Rodier PM (1994) Vulnerable periods and processes during central nervous system development. *Environmental Health Perspectives*, 102 (Suppl 2):121-124.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.94102121>
- Rodriguez JS, Boctor SY, Flores LC, Phelix CF, Martinez JL Jr (2011) Local pretreatment with the cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 attenuates methamphetamine intra-accumbens self-administration. *Neuroscience Letters*, 489(3):187-191. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.12.013>
- Rosas-Hernandez H, Cuevas E, Lantz SM, Imam SZ, Rice KC, Gannon BM, Fategrossi WE, Paule MG, Ali SF (2016) 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) induces cytotoxic effects on human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Journal of Drug and Alcohol Research*, 5:1-6. <https://doi.org/10.4303/jdar/235991>
- Scharfman HE, Myers CE (2013) Hilar mossy cells of the dentate gyrus: a historical perspective. *Frontiers in Neural Circuits*, 6:106.  
<https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00106>
- Schröder H, Moser N, Huggenberger S (2020) The Mouse Hippocampus w: *Neuroanatomy of the Mouse*, 267-288. Springer Cham.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-19898-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-19898-5_11)
- Schutová B, Hrubá L, Pometlová M, Deykun K, Slamberová R (2008) Impact of methamphetamine administered prenatally and in adulthood on cognitive functions of male rats tested in Morris water maze. *Prague Medical Report*, 109(1), 62–70.

- Seaman RW, Doyle MR, Sulima A, Rice KC, Collins GT (2021) Discriminative stimulus effects of 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) and structurally related synthetic cathinones. *Behavioural Pharmacology*, 32(5):357-367. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000624>
- Sewalia K, Watterson LR, Hryciw A, Belloc A, Ortiz JB, Olive MF (2018) Neurocognitive dysfunction following repeated binge-like self-administration of the synthetic cathinone 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV). *Neuropharmacology*, 134(PtA):36-45. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.034>
- Seyedhosseini Tamijani SM, Beirami E, Ahmadiani A, Dargahi L (2018) Effect of three different regimens of repeated methamphetamine on rats' cognitive performance. *Cognitive Processing*, 19(1):107-115. <https://doi.org/10.1007/s10339-017-0839-0>
- Seyedhosseini Tamijani SM, Beirami E, Ahmadiani A, Dargahi L (2019) Thyroid hormone treatment alleviates the impairments of neurogenesis, mitochondrial biogenesis and memory performance induced by methamphetamine. *Neurotoxicology*, 74:7-18. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.05.003>
- Shafi A, Berry AJ, Sumnall H, Wood DM, Tracy DK (2020) New psychoactive substances: a review and updates. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 10:2045125320967197. <https://doi.org/10.1177/2045125320967197>
- Siedlecka-Kroplewska K, Szczerba A, Lipinska A, Slebioda T, Kmiec Z (2014) 3-Fluoromethcathinone, a structural analog of mephedrone, inhibits growth and induces cell cycle arrest in HT22 mouse hippocampal cells. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 65(2):241-246.
- Siedlecka-Kroplewska K, Wrońska A, Stasiłojć G, Kmiec Z (2018) The designer drug 3-fluoromethcathinone induces oxidative stress and activates autophagy in HT22 neuronal cells. *Neurotoxicity Research*, 34(3):388-400. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9898-y>
- Siegel JA, Craytor MJ, Raber J (2010) Long-term effects of methamphetamine exposure on cognitive function and muscarinic acetylcholine receptor levels in mice. *Behavioural Pharmacology*, 21(7):602-614. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32833e7e44>
- Siegel JA, Park BS, Raber J (2011) Long-term effects of neonatal methamphetamine exposure on cognitive function in adolescent mice. *Behavioural Brain Research*, 219(1):159-164. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.01.015>
- Silva B, Soares J, Rocha-Pereira C, Mladěnka P, Remião F, On Behalf Of The Oeonom Researchers (2022) Khat, a cultural chewing drug: a toxicokinetic and toxicodynamic summary. *Toxins (Basel)*, 14(2):71. <https://doi.org/10.3390/toxins14020071>

- Simmler LD, Buser TA, Donzelli M, Schramm Y, Dieu LH, Huwyler J, Chaboz S, Hoener MC, Liechti ME (2013) Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *British Journal of Pharmacology*, 168(2):458-470. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02145.x>
- Simmler LD, Rickli A, Hoener MC, Liechti ME (2014) Monoamine transporter and receptor interaction profiles of a new series of designer cathinones. *Neuropharmacology*, 79:152-160. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.11.008>
- Simmons SJ, Leyrer-Jackson JM, Oliver CF, Hicks C, Muschamp JW, Rawls SM, Foster Olive M (2018) DARK classics in chemical neuroscience: cathinone-derived psychostimulants. *ACS Chemical Neuroscience*, 9(10):2379-2394. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.8b00147>
- Singh A, Peyrache A, Humphries MD (2019) Medial prefrontal cortex population activity is plastic irrespective of learning. *The Journal of Neuroscience*, 39(18):3470-3483. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1370-17.2019>
- Skelton MR, Williams MT, Vorhees CV (2008) Developmental effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine: a review. *Behavioural Pharmacology*, 19(2):91-111. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e3282f62c76>
- Squire LR, Dede AJ (2015) Conscious and unconscious memory systems. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(3):a021667. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021667>
- Squire LR, Stark CE, Clark RE (2004) The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience*, 27: 279–306. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130>
- Strange LG, Kochelek K, Keasling R, Brown S D, Pond BB (2017) The pharmacokinetic profile of synthetic cathinones in a pregnancy model. *Neurotoxicology and Teratology*, 63:9–13. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.08.001>
- Strano-Rossi S, Cadwallader AB, de la Torre X, Botrè F (2010) Toxicological determination and in vitro metabolism of the designer drug methylenedioxypropylone (MPDV) by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(18):2706-2714. <https://doi.org/10.1002/rcm.4692>
- Takeuchi A, Ahern TL, Henderson SO (2011) Excited delirium. *Western Journal of Emergency Medicine*, 12(1): 77-83.
- Tao S, Wang Y, Peng J, Zhao Y, He X, Yu X, Liu Q, Jin S, Xu F (2021) Whole-brain mapping the direct inputs of dorsal and ventral CA1 projection neurons. *Frontiers in Neural Circuits*, 15:643230. <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.643230>

Tepper B, Bartkowska K, Okrasa M, Ngati S, Braszak M, Turlejski K, Djavadian R (2020) Downregulation of TrkC Receptors Increases Dendritic Arborization of Purkinje Cells in the Developing Cerebellum of the Opossum, *Monodelphis domestica*. *Frontiers in Neuroanatomy*, 14:56.

<https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00056>

Erratum in: *Frontiers in Neuroanatomy*, 14:614617.

Tsetsenis T, Broussard JI, Dani JA (2023) Dopaminergic regulation of hippocampal plasticity, learning, and memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16:1092420. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1092420>

UNODC (2013) World Drug Report 2013.

[https://www.unodc.org/unodc/secured/wdr/wdr2013/World\\_Drug\\_Report\\_2013.pdf](https://www.unodc.org/unodc/secured/wdr/wdr2013/World_Drug_Report_2013.pdf); dostęp: 7 kwietnia 2023 r.

UNODC (2019) Generic legislation.

<https://syntheticdrugs.unodc.org/syntheticdrugs/en/legal/national/genericcontrols.html>; dostęp: 7 kwietnia 2023 r.

UNODC (2023) World Drug Report 2023. Executive summary.

[https://www.unodc.org/res/WDR-2023/WDR23\\_Exsum\\_fin\\_SP.pdf](https://www.unodc.org/res/WDR-2023/WDR23_Exsum_fin_SP.pdf);  
dostęp: 24 czerwca 2023 r.

Urbán N, Guillemot F (2014) Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 27;8:396.

<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00396> Erratum in: *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2015; 9:160. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00160>

USPO (1969) United States Patent Office 3,478,050 1-(3',4'methylenedioxyphenyl)-2-pyrrolidino-alkanones-(1). US3478050A. Boehringer Ingelheim GmbH

Valente MJ, Amaral C, Correia-da-Silva G, Duarte JA, Bastos ML, Carvalho F, Guedes de Pinho P, Carvalho M (2017a) Methylone and MDPV activate autophagy in human dopaminergic SH-SY5Y cells: a new insight into the context of  $\beta$ -keto amphetamines-related neurotoxicity. *Archives of Toxicology*, 91(11):3663-3676. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1984-z>

Valente MJ, Bastos ML, Fernandes E, Carvalho F, Guedes de Pinho P, Carvalho M (2017b) Neurotoxicity of  $\beta$ -keto amphetamines: deathly mechanisms elicited by methylone and MDPV in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(4):850-859. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00421>

Valente MJ, Guedes de Pinho P, Bastos ML, Carvahlo F, Carvahlo M (2014) Khat and synthetic cathinones: a review. *Archives of Toxicology*, 88(1): 15-45. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1163-9>

Vorhees CV, Herring NR, Schaefer TL, Grace CE, Skelton MR, Johnson H L, Williams MT (2008) Effects of neonatal (+)-methamphetamine on path integration and spatial learning in rats: effects of dose and rearing conditions. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 26(6):599–610.

<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2008.04.002>

- Vorhees CV, Williams MT (2016) Cincinnati water maze: a review of the development, methods, and evidence as a test of egocentric learning and memory. *Neurotoxicology and Teratology*, 57:1-19.  
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.08.002>
- Vorhees CV, Williams MT (2006) Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, 1(2):848-858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
- Williams MT, Moran MS, Vorhees CV (2004) Behavioral and growth effects induced by low dose methamphetamine administration during the neonatal period in rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 22(5-6):273-283.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.04.003>
- Wojcieszak J, Andrzejczak D, Wojtas A, Golembiowska K, Zawilska JB (2020) Comparative neuropharmacological studies on three pyrrolidine-containing synthetic cathinones. *Forensic Toxicology*, 38:378–393.  
<https://doi.org/10.1007/s11419-020-00523-0>
- Wojcieszak J, Andrzejczak D, Woldan-Tambor A, Zawilska JB (2016) Cytotoxic activity of pyrovalerone derivatives, an emerging group of psychostimulant designer cathinones. *Neurotoxicity Research*, 30(2):239-250.  
<https://doi.org/10.1007/s12640-016-9640-6>
- Wojcieszak J, Kuczyńska K, Zawilska JB (2021) Behavioral effects of 4-CMC and 4-MeO-PVP in DBA/2J mice after acute and intermittent administration and following withdrawal from intermittent 14-day treatment. *Neurotoxicity Research*, 39(3):575-587. <https://doi.org/10.1007/s12640-021-00329-x>
- Xie HR, Hu LS, Li GY (2010) SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal (Engl)*, 123(8):1086-1092.
- Zawilska JB, Wojcieszak J (2013) Designer cathinones – an emerging class of novel recreational drugs. *Forensic Science International*, 231(1-3):42-53.  
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.04.015>
- Zawilska JB, Wojcieszak J (2017)  $\alpha$ -Pyrrolidinophenones: a new wave of designer cathinones. *Forensic Toxicology*, 35:201-216.  
<https://doi.org/10.1007/s11419-016-0353-6>
- Zhao Q, Hou J, Chen B, Shao X, Zhu R, Bu Q, Gu H, Li Y, Zhang B, Du C, Fu D, Kong J, Luo L, Long H, Li H, Deng Y, Zhao Y, Cen X (2015) Prenatal cocaine exposure impairs cognitive function of progeny via insulin growth factor II epigenetic regulation. *Neurobiology of Disease*, 82:54-65.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.05.014>

## Wykaz tabel

Tabela I Działania niepożądane syntetycznych katynonów. ....	25
Tabela II Śmiertelność w wieku PD11-20 w zależności od płci i podanego związku .....	63



## Wykaz rycin

Ryc. 1. Ogólny wzór strukturalny pochodnych katynonu z uwzględnieniem możliwej lokalizacji podstawników.....	16
Ryc. 2. Wzory strukturalne neuroprzekaźników monoaminergicznych, klasycznych związków psychostymulujących oraz związków należących do grupy katynonów.....	17
Ryc. 3. Rodzaje pamięci i kontrolujące je struktury mózgowe.....	32
Ryc. 4. Budowa hipokampa myszy .....	35
Ryc. 5. Schemat przedstawiający kolejność przeprowadzonych procedur i doświadczeń na zwierzętach.....	47
Ryc. 6. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na masę ciała myszy w okresie podawania związku .....	64
Ryc. 7. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na roboczą pamięć przestrzenną myszy.....	65
Ryc. 8. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na zdolność rozpoznawania nowego obiektu przez myszy po 3 h retencji.....	67
Ryc. 9. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na zdolność rozpoznawania nowego obiektu przez myszy po 24 h retencji.....	68
Ryc. 10. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na czas wpłynięcia myszy na platformę podczas fazy treningu z widoczną platformą.....	70
Ryc. 11. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na dystans przebyty przez myszy podczas fazy treningu z widoczną platformą.....	70
Ryc. 12. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na prędkość osiąganą przez myszy podczas fazy treningu z widoczną platformą.....	71
Ryc. 13. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na czas wpłynięcia myszy na platformę podczas fazy nauki przestrzennej lokalizacji platformy .....	73
Ryc. 14. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na dystans pokonany przez myszy podczas fazy nauki przestrzennej lokalizacji platformy .....	73

Ryc. 15. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek czasu spędzonego przez myszy w strefie z platformą podczas fazy nauki przestrzennej lokalizacji platformy .....	74
Ryc. 16. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek dystansu przebytego przez myszy w strefie z platformą podczas fazy nauki przestrzennej lokalizacji platformy .....	74
Ryc. 17. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na liczbę wpłynięć myszy w fazie próby pamięci przestrzennej, na miejsce, w którym uprzednio znajdowała się platforma .....	76
Ryc. 18. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek czasu spędzonego przez myszy w fazie próby pamięci przestrzennej w strefie, w której uprzednio znajdowała platforma .....	77
Ryc. 19. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek dystansu przebytego przez myszy w fazie próby pamięci przestrzennej w strefie, w której uprzednio znajdowała się platforma.....	78
Ryc. 20. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na czas wpłynięcia myszy na platformę podczas fazy nauki przestrzennej nowej lokalizacji platformy .....	80
Ryc. 21. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na dystans pokonany przez myszy podczas fazy nauki przestrzennej nowej lokalizacji platformy .....	80
Ryc. 22. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek czasu spędzonego przez myszy w strefie z platformą podczas fazy nauki przestrzennej nowej lokalizacji platformy .....	81
Ryc. 23. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek dystansu przebytego przez myszy w strefie z platformą podczas fazy nauki przestrzennej nowej lokalizacji platformy .....	81
Ryc. 24. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na liczbę wpłynięć myszy w fazie próby pamięci przestrzennej nowej lokalizacji platformy w miejsce, w którym uprzednio była platforma.....	83
Ryc. 25. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek czasu spędzonego przez myszy w fazie próby pamięci przestrzennej nowej lokalizacji platformy w strefie, w której uprzednio była platforma .....	84

Ryc. 26. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek dystansu przebytego przez myszy w fazie próby pamięci przestrzennej nowej lokalizacji platformy w strefie, w której uprzednio była platforma .....	85
Ryc. 27. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek czasu spędzonego przez myszy w bezruchu podczas fazy treningu z widoczną platformą.....	86
Ryc. 28. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek czasu spędzonego przez myszy w bezruchu podczas fazy nauki przestrzennej lokalizacji platformy .....	87
Ryc. 29. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na odsetek czasu spędzonego przez myszy w bezruchu podczas fazy nauki przestrzennej nowej lokalizacji platformy .....	88
Ryc. 30. Przykładowe zdjęcie mikroskopowe przedstawiające komórki zawierające BrdU w DG samca myszy z grupy kontrolnej oraz w DG samca myszy z grupy otrzymującej MDPV w dawce 20 mg/kg .....	89
Ryc. 31. Przykładowe zdjęcie mikroskopowe przedstawiające komórki zawierające BrdU w DG samicy myszy z grupy kontrolnej oraz w DG samicy myszy z grupy otrzymującej MDPV w dawce 20 mg/kg .....	90
Ryc. 32. Wpływ MDPV w dawce 20 mg/kg na liczbę komórek znakowanych BrdU w DG myszy .....	91
Ryc. 33. Przykładowe zdjęcie mikroskopowe przedstawiające komórki zawierające BrdU i NeuN w DG samca myszy z grupy kontrolnej oraz w DG samca myszy z grupy otrzymującej MDPV w dawce 20 mg/kg.....	93
Ryc. 34. Przykładowe zdjęcie mikroskopowe przedstawiające komórki zawierające BrdU i NeuN w DG samicy myszy z grupy kontrolnej oraz w DG samicy myszy z grupy otrzymującej MDPV w dawce 20 mg/kg .....	93
Ryc. 35. Wpływ MDPV w dawce 20 mg/kg na kolokalizację BrdU i NeuN w komórkach DG myszy .....	94
Ryc. 36. Przykładowe zdjęcie mikroskopowe przedstawiające komórki zawierające BrdU i GFAP w DG samca myszy z grupy kontrolnej oraz w DG samca myszy z grupy otrzymującej MDPV w dawce 20 mg/kg.....	95

Ryc. 37. Przykładowe zdjęcie mikroskopowe przedstawiające komórki zawierające BrdU i GFAP w DG samicy myszy z grupy kontrolnej oraz w DG samicy myszy z grupy otrzymującej MDPV w dawce 20 mg/kg .....	95
Ryc. 38. Wpływ MDPV w dawce 20 mg/kg na kolokalizację BrdU i GFAP w komórkach DG myszy .....	96
Ryc. 39. Przykładowy wynik oznaczenia ekspresji SYP znormalizowanej względem ACTB w hipokampach samców myszy przy użyciu metody Western blot .....	97
Ryc. 40. Przykładowy wynik oznaczenia ekspresji SYP znormalizowanej względem ACTB w hipokampach samic myszy przy użyciu metody Western blot .....	97
Ryc. 41. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na poziom ekspresji SYP w hipokampach myszy .....	98
Ryc. 42. Przykładowy wynik oznaczenia ekspresji PSD95 znormalizowanego względem ACTB w hipokampach samców myszy przy użyciu metody Western blot .....	99
Ryc. 43. Przykładowy wynik oznaczenia ekspresji PSD95 znormalizowanego względem ACTB w hipokampach samic myszy przy użyciu metody Western blot .....	99
Ryc. 44. Wpływ MDPV w dawce 10 i 20 mg/kg na poziom ekspresji PSD95 w hipokampach myszy .....	100

## Całkowity dorobek naukowy

Summary IF: 27,16

Łączna punktacja MNiSW: 825

Web of Science: łącznie 211 cytowań (209 bez autocytań); h-indeks = 6

Scopus: łącznie 238 cytowań (236 bez autocytań); h-indeks = 6

**Wyniki zawarte w niniejszej rozprawie doktorskiej uzyskano w Zakładzie Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi we współpracy z Pracownią Białek Wiążących Wapń Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.**

**Część wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej opublikowano w artykule:**

**Kuczyńska K**, Bartkowska K, Djavadian R, Zwierzyńska E, Wojcieszak J. (2024) MDPV (3,4-methylenedioxypropylone) administered to mice during development of the central nervous system produces persistent learning and memory impairments. *Pharmacological Reports*, 76(3):519–534.

<https://doi.org/10.1007/s43440-024-00599-0>

IF = 3,6; MNiSW = 100

**oraz zaprezentowano na konferencjach naukowych:**

**Kuczyńska K**, Bartkowska K, Djavadian R, Zawilska JB, Zwierzyńska E, Wojcieszak J. Treatment with 3,4-methylenedioxypropylone (MDPV) during infancy results in dose and sex-dependent impairment of spatial working memory and novel object recognition in adult mice. 9<sup>th</sup> Conference of the Mediterranean Neuroscience Society. Carthage, Tunezja. 14– 18 października 2023 r.

**Kuczyńska K**, Wojcieszak J, Zawilska JB. Assessment of developmental neurotoxicity in mice after repeated postnatal exposure to MDPV. IX International Conference on Novel Psychoactive Substances. Panama City, Panama. 24– 26 października 2022 r.

**Kuczyńska K**, Wojcieszak J, Zwierzyńska E, Zawilska JB. New biological activities of synthetic cathinones *Addiction* 2022. Enlightening the addicted brain: cells, circuits and therapies. Villasimius, Sardynia, Włochy. 25–28 września 2022 r.

## Pozostały dorobek naukowy

### Publikacje

Zawilska JB, **Kuczyńska K** (2022) Psychiatric and neurological complications of long COVID. *Journal of Psychiatric Research*, 156: 349-360.

<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2022.10.045>

IF = 4,8; MNiSW = 140

Wojcieszak J, **Kuczyńska K**, Zawilska JB (2022) Role of Chemokines in the Development and Progression of Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 72(9): 1929-1951. <https://doi.org/10.1007/s12031-022-02047-1>

IF = 3,1; MNiSW = 70

Zawilska JB, **Kuczyńska K** (2022) Leki stosowane w COVID-19: wczoraj, dziś, jutro [COVID-19 Drugs: past, present, future]. *Wszechświat*, 123(7-9): 199-211.

MNiSW = 5

Wojcieszak J, **Kuczyńska K**, Zawilska JB (2021) Behavioral Effects of 4-CMC and 4-MeO-PVP in DBA/2J Mice After Acute and Intermittent Administration and Following Withdrawal from Intermittent 14-Day Treatment. *Neurotoxicity Research*, 39(3): 575-587. <https://doi.org/10.1007/s12640-021-00329-x>

IF = 3,978; MNiSW = 70

Zawilska JB, **Kuczyńska K**, Kosmal W, Markiewicz K, Adamowicz P (2021) Carfentanil - from an animal anesthetic to a deadly illicit drug. *Forensic Science International*, 320: 110715. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110715>

IF = 2,676; MNiSW = 100

Zawilska JB, **Kuczyńska K**, Gawior M, Kosiorek M, Dąbrowska K, Dominiak Z, Baranowska A, Skorupska G, Sujecka A, Michalak K, Rojek A, Bakowicz A, Kowalczyk W, Wojciechowska A, Bęczkowska W, Maj P (2021) Szczepionki i leki stosowane w terapii COVID-19 [Therapy of COVID-19: vaccines and drugs]. *Farmacja Polska*, 77(3): 178–192. <https://doi.org/10.32383/farmpol/135224>

MNiSW = 70

**Kuczyńska K**, Zawilska JB, Badura J, Strehl B (2021) Wirus SARS-CoV-2: pochodzenie, budowa i cykl replikacyjny [SARS-CoV-2 virus: origin, structure and replication cycle]. *Farmacja Polska*, 77(3): 143–149.

<https://doi.org/10.32383/farmpol/135222>

MNiSW = 70

Wojcieszak J, **Kuczyńska K**, Zawilska JB (2020) Four Synthetic Cathinones: 3-Chloromethcathinone, 4-Chloromethcathinone, 4-Fluoro- $\alpha$ -Pyrrolidinopentiophenone, and 4-Methoxy- $\alpha$ -Pyrrolidinopentiophenone Produce Changes in the Spontaneous Locomotor Activity and Motor Performance in Mice with Varied Profiles. *Neurotoxicity Research*, 38(2): 536-551. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00227-8>

IF = 3,911; MNiSW = 70

**Kuczyńska K**, Boncler M (2020) Emerging Role of Fentanyl in Antiplatelet Therapy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 76(3): 267-275.

<https://doi.org/10.1097/fjc.0000000000000880>

IF = 3,105; MNiSW = 70

**Kuczyńska K**, Grzonkowski P, Kacprzak Ł, Zawilska JB (2018) Abuse of fentanyl: an emerging problem to face. *Forensic Science International*, 289:207-214. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.05.042>

IF = 1,99; MNiSW = 40

### **Rozdział w książce**

Zawilska JB, **Kuczyńska K**, Bratzu J, Fattore L (2021) Neurotoxicity of Exogenous Cannabinoids w: *Handbook of Neurotoxicity*, wydanie drugie (red. Richard M. Kostrzewa), Springer Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-71519-9\\_206-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-71519-9_206-1)

MNiSW = 20

## **Komunikaty zjazdowe**

Wojcieszak J, **Kuczyńska K**, Zawilska JB. Behavioral effects of two new generation synthetic cathinones: 4-MeO-PVP and 4-CMC. 4th Central European Biomedical Congress, Kraków, Polska. 7–9 czerwca 2021 r.

Wojcieszak J, Andrzejczak D, **Kuczyńska K**, Zawilska JB. Evaluation of the impact of six synthetic cathinones on the spontaneous locomotor activity of mice. 3rd Central European Biomedical Congress: News on biomarker discovery and research innovations in medicine and biomedical sciences. Kraków, Polska. 15–18 września 2018 r.

## **Osiągnięcia naukowe**

### **Nagrody naukowe Rektora:**

za rok 2022:

Nagroda naukowa III stopnia za publikację pt.: Role of Chemokines in the Development and Progression of Alzheimer's Disease. IF = 3,1

Nagroda naukowa III stopnia za publikację pt.: Psychiatric and neurological complications of long COVID. IF = 4,8.

za rok 2021:

Nagroda naukowa II stopnia za cykl publikacji dotyczący właściwości farmakologicznych i toksyczności nowych substancji psychoaktywnych. IF = 6,654.

za rok 2020:

Nagroda III stopnia za publikację pt. „Emerging role of fentanyl in antiplatelet therapy”. IF = 3,105.

Nagroda naukowa II stopnia za cykl prac dotyczący właściwości farmakologicznych i toksykologicznych syntetycznych pochodnych  $\beta$ -katynonu. IF = 5,937.



## **Staż naukowy**

Miesięczny staż naukowy w Laboratorium Toksykologii i Medycyny Sądowej, w Zakładzie Medycyny Translacyjnej na Uniwersytecie w Ferrarze we Włoszech, w ramach programu “Young Investigator Training Program - ADDICTION 2022” finansowany przez ACRI (Associazione di Fondazioni e Casse di Risparmio SpA).

# Oświadczenie współautorów publikacji



Katarzyna Alicja Kuczyńska  
(imię i nazwisko Kandydata)

Łódź, 13 czerwca 2024 r.

Przewodnicząca Rady Nauk Farmaceutycznych  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

## OŚWIADCZENIE współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu lub monografii\*

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy\*\*:

Kuczyńska K, Bartkowska K, Djavadian R, Zwierzyńska E, Wojcieszak J. MDPV (3,4-methylenedioxypropylvalerone) administered to mice during development of the central nervous system produces persistent learning and memory impairments. *Pharmacological Reports*. 2024;76(3):519–534. <https://doi.org/10.1007/s43440-024-00599-0>

przedstawia się jak poniżej:

Autor	Udział %	Opis udziału własnego	Podpis
Katarzyna Kuczyńska	65%	planowanie i wykonywanie doświadczeń, analiza nagrań doświadczeń behawioralnych, przeprowadzenie analizy statystycznej wyników, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu i jego ostatecznej wersji po recenzjach, pełnienie funkcji autora korespondencyjnego	
Katarzyna Bartkowska	10%	wykonywanie doświadczeń	
Ruzanna Djavadian	7%	wykonywanie doświadczeń	
Ewa Zwierzyńska	3%	wykonywanie doświadczeń	
Jakub Wojcieszak	15%	opracowanie koncepcji badań, wykonywanie doświadczeń, analiza nagrań doświadczeń behawioralnych, konsultacje analizy statystycznej wyników, merytoryczna korekta manuskryptu	

\* w przypadku gdy, dorobek stanowi autorstwo dwóch lub więcej osób.  
\*\* należy wskazać: autorów, tytuł, czasopismo, rok wydania, tom, strony.