

# Farmakodynamiske effekter, farmakokinetikk og virkningsmekanisme til to nye syntetiske katinoner på rusmiddelmarkedet

*In vivo- og in vitro-studier i mus*

Anne Marte Baarset



Masteroppgave i Farmasi  
45 studiepoeng

Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2023



# Farmakodynamiske effekter, farmakokinetikk og virkningsmekanisme til to nye syntetiske katinoner på rusmiddelmarkedet

*In vivo- og in vitro-studier i mus*

Anne Marte Baarset



Masteroppgave i Farmasi  
45 studiepoeng

Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2023

Veiledere:

Førsteamanuensis og seniorforsker Inger Lise Bogen  
Førsteamanuensis og seniorforsker Jannike Mørch Andersen  
Spesialingeniør Synne Steinsland

© Anne Marte Baarset

Mai 2023

Farmakodynamiske effekter, farmakokinetikk og virkningsmekanisme til to nye syntetiske katinoner på rusmiddelmarkedet

*In vivo- og in vitro-studier i mus*

Anne Marte Baarset

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

# Sammendrag

Økningen av nye rusmidler på det globale rusmiddelmarkedet siden 2010 har blitt drevet av økt tilgjengelighet via internett. Slike nye psykoaktive stoffer (NPS) er definert som nye stoffer som ikke er kontrollert av FNs narkotikakonvensjoner. Nye psykoaktive stoffer, også kjent som "designerdop", "legal highs", "spice" eller "badesalt", etterligner effekten av tradisjonelle rusmidler. Noen av disse nye rusmidlene er svært potente og kan medføre alvorlige psykiske og fysiske reaksjoner.

I 2021 var syntetiske katinoner den nest største klassen nye psykoaktive stoffer som ble overvåket av EUs narkotikaovervåkningsorgan. Syntetiske katinoner er sentralstimulerende stoffer og blir solgt som alternativer til kokain, amfetamin eller MDMA. Det finnes begrenset kunnskap om disse nye stoffene, og det er derfor utfordrende for helsevesenet å kunne behandle potensielle forgiftninger. Målet med denne masteroppgaven var å studere farmakologiske egenskaper til to nye syntetiske katinoner tilgjengelige på det norske og europeiske rusmiddelmarkedet. Farmakodynamiske og farmakokinetiske egenskaper av 3-metyletkatinon (3-MEC) og  $\alpha$ -pyrrolidinoisoheksanofenon ( $\alpha$ -PiHP) ble sammenlignet med henholdsvis metkatinon og  $\alpha$ -pyrrolidinovalerofenon ( $\alpha$ -PVP), som ble benyttet som referansestoffer gjennom hele studien i mus som modelldyr.

Det ble utført *in vitro*-forsøk i nerveterminaler isolert fra musecerebrum for å undersøke virkningsmekanisme og potens av rusmidlene. Videre ble det utført *in vivo*-forsøk i mus for å undersøke akutt ruseffekt, stereotypisk adferd og endringer i kroppstemperatur etter eksponering for ulike doser av rusmidlene. Effekten av rusmidlene i *in vivo*-forsøkene ble sammenlignet med kontrolldyr for å undersøke om det var en signifikant forskjell. Blod og hjjernevev fra mus ble analysert for rusmiddelkonsentrasjon for å undersøke stoffenes farmakokinetikk.

Hovedfunnene fra studien er at 3-MEC ga mindre ruseffekt og endring i kroppstemperatur, sammenlignet med referansestoffet metkatinon. Farmakokinetisk profil var nokså lik for de to stoffene, mens 3-MEC viste noe kortere halveringstid sammenlignet med metkatinon. 3-MEC er en potent hemmer av monoaminopptak, men var 2,5–3,5 ganger mindre potent hemmer av noradrenalin- og dopamin-opptaket, og 13,6 ganger mer potent hemmer av serotonin-opptaket sammenlignet med metkatinon.

$\alpha$ -PiHP ga mindre ruseffekt og endring i kroppstemperatur sammenlignet med referankestoffet  $\alpha$ -PVP. Begge stoffer ga stereotypisk atferd etter injeksjon av doser på eller høyere enn henholdsvis 7,5 mg/kg  $\alpha$ -PiHP eller 3,75 mg/kg  $\alpha$ -PVP. Farmakokinetisk profil var nokså lik for  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP, men  $\alpha$ -PiHP distribueres mer til hjernen sammenlignet med  $\alpha$ -PVP. Videre var  $\alpha$ -PiHP en like potent og litt mindre potent hemmer av henholdsvis dopamin- og noradrenalin-opptaket, og noe mer potent hemmer av serotonin-opptaket sammenlignet med  $\alpha$ -PVP. Både *in vitro*- og *in vivo*-studiene indikerer at 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP er mindre potente enn de respektive referankestoffene.

# Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Seksjon for Rusmiddelforskning, Avdeling for rettsmedisinske fag, Oslo Universitetssykehus (OUS) i perioden august 2022 til mai 2023.

Først og fremst vil jeg takke til mine fantastiske veiledere Inger Lise Bogen, Jannike Mørch Andersen og Synne Steinsland for den enestående oppfølgingen! Deres kunnskap, konstruktive tilbakemeldinger, oppmuntrende ord og støtte har hjulpet meg enormt gjennom utfordrende dager på dyrestallen og i skriveperioden. Takk for at dere alltid har vært tilgjengelige, selv på lange arbeidsdager. Uten deres bidrag hadde ikke dette vært mulig!

En spesiell takk til Synne Steinsland som har vært tålmodig med meg på lab, og for uvurdelig støtte på dyrestallen! Det har vært uhyttdige samtaler og mye latter. Takk for at du fikk meg til å se den positive siden når alt ikke gikk like bra på lab.

Takk til Elisabeth Nerum for all hjelpen på analyse-labben.

En spesiell takk til alle mine studievenner, inkludert Carolyn Sofie Coelho, som har holdt ut med meg gjennom alle disse 5 årene på VB. Det har vært lange dager og sene kvelder gjennom både frustrasjon og glede. Uten dere hadde jeg nok ikke klart å fullføre dette studiet.

Til slutt vil jeg takke venner, familie og kjæreste for at dere alltid har hatt troen på meg og støttet meg gjennom alle disse årene.

Oslo, mai 2023

Anne Marte Baarset

# Forkortelser

$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	Ammoniumkarbonat
$[\text{}^3\text{H}]\text{-5-HT}$	Radioaktivt merket serotonin
$[\text{}^3\text{H}]\text{-DA}$	Radioaktivt merket dopamin
$[\text{}^3\text{H}]\text{-NA}$	Radioaktivt merket noradrenalin
3-MEC	3-metyletkatinon (3-methylethcathinone)
5-HT	5-hydroxytryptamin (serotonin)
ANOVA	Analysis of Variance (variansanalyse)
AUC	Arealet under kurven
BSA	Bovint serumalbumin
$C_0$	Konsentrasjon ved 5 min
$\text{CaCl}_2$	Kalsiumklorid
Ci	Curie
$C_{\text{max}}$	Maksimum konsentrasjon av rusmiddel
cv	Cone-spenning
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransportør
$E_{\text{max}}$	Maksimal lokomotorisk aktivitet
eV	Elektronvolt
FOTS	Forsøksdyrforvaltningens tilsyns- og søknadssystem



HCl	Hydroklorid
HNO <sub>3</sub>	Salpetersyre
IC <sub>50</sub>	Konsentrasjonen av rusmiddel som gir 50 % hemmende effekt
IS	Internstandard
k	Stigningskonstanten
KCl	Kaliumklorid
m/z	Mass-to-charge (masse til ladning)
MDMA	3,4-metylendioksymetamfetamin
MDPV	3,4-metylendioksiyrovaleron
MeOH	Metanol
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumklorid
MK	Metkatinon
MRM	Multipel reaksjonsmonitoreringsanalyse
NA	Noradrenalin
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenfosfat
NaCl	Natriumklorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogenkarbonat
NAT	Noradrenalintransportør
NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub>	Ammoniumformat
NPS	Nye psykoaktive stoffer

O <sub>2</sub>	Oksygen
PMMA	Parametoksymetamfetamin
PMSK	Person med særskilt kontrollansvar
RPM	Revolutions per minute (omdreininger per min)
UHPLC/MS-MS	Ultraeffektiv væskekromatografi tandem massespektrometri
S.c.	Subkutan
SEM	Standardfeil
SERT	Serotonintransportør
T <sub>1/2</sub>	Halveringstid
T <sub>max</sub>	Tiden som gir maksimal effekt eller konsentrasjon
V	Volt
$\alpha$ -PiHP	$\alpha$ -Pyrrolidinoisohexanofenon
$\alpha$ -PVP	$\alpha$ -pyrrolidinovarlerofenon eller $\alpha$ -pyrrolidinopentiofenon

# Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon .....	1
1.1	Nye psykoaktive stoffer .....	1
1.1.1	Et rusmiddelmarked i endring .....	1
1.2	Katinoner .....	3
1.2.1	Khat-planten .....	4
1.2.2	Endogene katekolaminer og sympatomimetika .....	5
1.2.3	Terapeutisk bruk av syntetiske katinoner .....	6
1.3	Farmakologiske effekter av syntetiske katinoner .....	7
1.3.1	Noradrenerg, dopaminerg og serotonerg stimulering .....	7
1.3.2	Akutte uønskede effekter og dødsfall .....	8
1.4	Virkningsmekanisme av syntetiske katinoner .....	8
1.4.1	Monoaminsignalering i sentralnervesystemet .....	8
1.4.2	Hemmere eller substrater for monoamintransportører .....	10
1.5	Inndeling av syntetiske katinoner .....	11
1.6	Hensikt med studien .....	13
2	Materialer og metoder .....	14
2.1	Kjemikalier og laboratorieutstyr .....	14
2.2	Forsøksdyr .....	17
2.3	Forsøksoppsett til <i>in vivo</i> -studier .....	18
2.3.1	Rusmidler og rusmiddeløsninger .....	19
2.4	Lokomotorisk aktivitet .....	20
2.5	Stereotypisk adferd .....	21
2.6	Temperaturmålinger .....	22
2.6.1	Implantering av temperatursensor .....	22
2.6.2	Avlesing av kroppstemperatur .....	23
2.7	Farmakokinetikkstudie .....	24
2.7.1	Uttak av blod og hjerne .....	24
2.7.2	Homogenisering av hjerne .....	25
2.7.3	Prøveopparbeidelse før UHPLC-MS/MS .....	25
2.7.4	Konsentrasjonsbestemmelse med UHPLC-MS/MS .....	27
2.8	Nevrotransmitteropptak i synaptosomer <i>in vitro</i> .....	29

2.8.1	Isolering av synaptosomer fra musehjerne.....	29
2.8.2	Monoaminopptak <i>in vitro</i> .....	32
2.9	Statistikk og dataanalyse .....	33
3	Resultater.....	34
3.1	Lokomotorisk aktivitet .....	34
3.1.1	Effekt av 3-MEC og metkatinon .....	34
3.1.2	Effekt av $\alpha$ -PiHP og $\alpha$ -PVP .....	37
3.2	Stereotypisk adferd.....	40
3.3	Kroppstemperatur etter eksponering .....	41
3.3.1	Effekt av 3-MEC og metkatinon .....	41
3.3.2	Effekt av $\alpha$ -PiHP og $\alpha$ -PVP .....	42
3.4	Farmakokinetikk i blod og hjernevev.....	44
3.4.1	Konsentrasjonskurver for 3-MEC og metkatinon .....	44
3.4.2	Konsentrasjonskurver for $\alpha$ -PiHP og $\alpha$ -PVP .....	46
3.5	Monoaminopptak .....	48
3.5.1	Effekt av 3-MEC og metkatinon .....	48
3.5.2	Effekt av $\alpha$ -PiHP og $\alpha$ -PVP .....	50
4	Diskusjon.....	52
4.1	Farmakodynamiske og farmakokinetiske egenskaper av 3-MEC og metkatinon....	52
4.1.1	3-MEC er en mer potent hemmer av SERT .....	52
4.1.2	Akutt ruseffekt og stereotypisk aktivitet av 3-MEC .....	53
4.1.3	3-MECs farmakokinetikk.....	55
4.1.4	3-MEC induserer hypertermi .....	56
4.2	Farmakodynamiske og farmakokinetiske effekter $\alpha$ -PiHP og $\alpha$ -PVP.....	57
4.2.1	$\alpha$ -PiHP er en mer potent hemmer av SERT.....	57
4.2.2	Akutt ruseffekt og stereotypisk aktivitet av $\alpha$ -PiHP .....	58
4.2.3	$\alpha$ -PiHPs farmakokinetikk .....	60
4.2.4	$\alpha$ -PiHP induserer hypertermi .....	60
4.3	Sammenligning av de syntetiske katinonene .....	61
4.3.1	Kliniske vurderinger og potens av 3-MEC og $\alpha$ -PiHP .....	61
4.3.2	Pyrrolidinkatinoner krysser blod-hjernebarrieren i større grad.....	62
4.3.3	Mindre fare for hypertermi etter 3-MEC og $\alpha$ -PiHP .....	62
4.4	Overførbarhet fra mus til mennesker .....	63

4.5	Videre studier .....	63
5	Konklusjon .....	64
	Litteraturliste .....	65
	Vedlegg A – Skåringskjema for evaluering av smerte og humane endepunkter .....	72
	Vedlegg B – UHPLC-MS/MS.....	74
	Vedlegg C – Linearitet mellom vevskonsentrasjon og opptak .....	75
	Vedlegg D – Observert stereotypisk adferd .....	79



# 1 Introduksjon

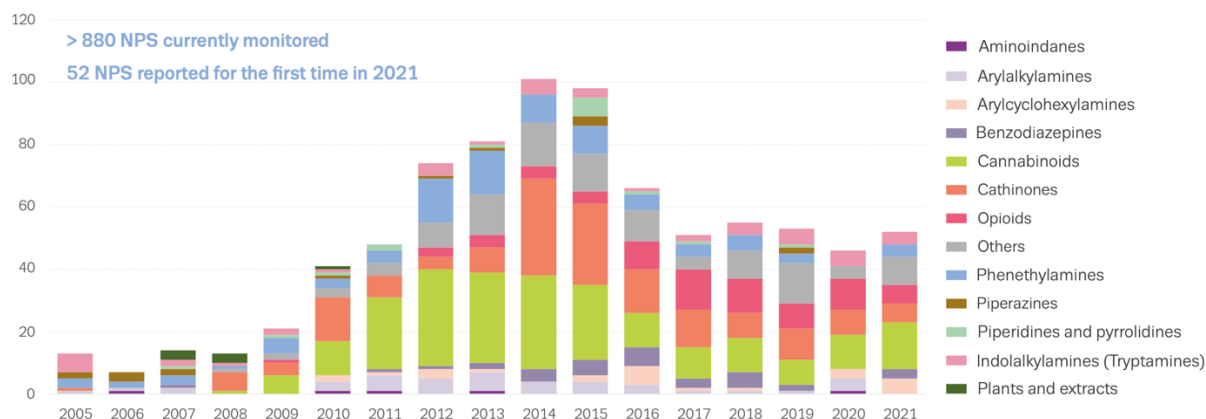
## 1.1 Nye psykoaktive stoffer

Psykoaktive stoffer er kjemiske substanser som påvirker det sentrale nervesystemet, og kan dermed påvirke humør, oppfatninger, bevissthet og adferd (1 s. 629). Nye psykoaktive stoffer (NPS) defineres som psykoaktive stoffer som ikke er internasjonalt kontrollert av FNs narkotikakonvensjoner (2, 3). Disse stoffene blir syntetisert for å etterligne den farmakologiske effekten til tradisjonelle rusmidler eller legemidler (2, 3). NPS er også kjent som «designerdop», «legal highs», «research chemicals», «krydder», eller «badesalt» (2, 3, 4).

Antallet NPS på rusmiddelmarkedet har økt både globalt og i Norge (2, 4, 5, 6). Noen av disse stoffene er svært potente og kan gi alvorlige psykiske reaksjoner og livstruende forgiftninger (6). Den begrensede kunnskapen om virkningen av disse stoffene utgjør en betydelig utfordring for helsevesenet når det gjelder å behandle forgiftninger (6). EUs narkotikaovervåkningsorgan kategoriserer NPS inn i ulike grupper som syntetiske cannabinoider, katinoner, opioider, arylsykloheksylaminer, fenetylaminer, tryptaminer, benzodiazepiner og andre stoffer (7).

### 1.1.1 Et rusmiddelmarked i endring

Rundt 2010 ble det registrert en bemerkelsesverdig økning i antall NPS på markedet (8). I det året ble det registrert 41 NPS for første gang på det norske og europeiske rusmiddelmarkedet (Figur 1.1) (2). I 2014 og 2015 alene ble det registrert omtrent 100 nye NPS (2). Økningen av NPS skyldes i stor grad globalisering, der internett og ny teknologi muliggjorde økt distribusjon av NPS (5). Dette skapte et skifte i produksjonssted fra små illegale laboratorier Europa til storskalaproduksjon hos kjemiske eller farmasøytiske bedrifter primært i Kina, men også i India (2, 5). Som et resultat av denne endringen i produksjonssted kan NPS bli syntetisert med høy renhet og bli solgt rimelig (5).



**Figur 1.1** Nye psykoaktive stoffer (NPS) som ble rapportert for første gang til EUs overvåkingsystem for tidlig varsling fra 2005 t.o.m. 2021 (2). Figuren er gjengitt med tillatelse fra Det europeiske overvåkingscenteret for narkotika og narkotikamisbruk, 2022.

Fra og med 2014 utgjorde flertallet av NPS som ble tilgjengelige på rusmiddelmarkedet to hovedkategorier: syntetiske cannabinoider og syntetiske katinoner (2, 4, 5). Syntetiske cannabinoider, også kjent som «spice» eller «krydder» blir markedsført som «lovlige» alternativer til cannabis (2, 4, 8). Syntetiske katinoner blir solgt under produktnavn som «badesalt» (4, 8, 9) og markedsført som «lovlige» alternativer til sentralstimulerende stoffer som amfetamin, kokain eller MDMA (figur 1.3) (2, 4, 8).

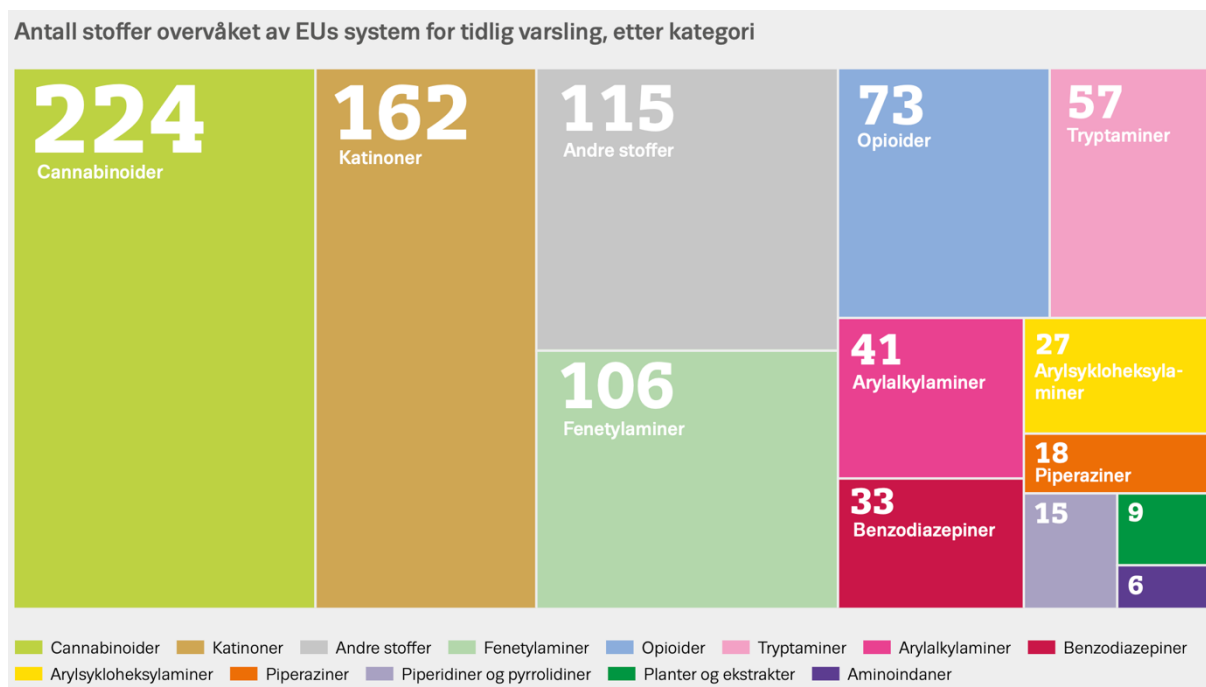
Syntetiske katinoner er tilgjengelige som pulver eller krystaller og kan administreres intranasalt, intravenøst eller oralt (3, 8). Vanlige virkestoffer som har blitt solgt som «badesalt» inkluderer hovedsakelig 4-metylmekatinon (mefedron), 3,4-metylendioksymekatinon (metylon) og 3,4-metylendioksyprovaleron (MDPV) (3, 4, 10). Rundt 2011 ble også  $\alpha$ -pyrrolidinovalerofenon ( $\alpha$ -PVP;  $\alpha$ -pyrrolidinopentiofenon) introdusert på rusmiddelmarkedet og brukt under gatenavnet «flakka» (11).

Fra 2015 til 2022 ble antall nyregistrerte NPS på rusmiddelmarkedet redusert fra omtrent 100 til 50 hvert år, i motsetning til trenden i 2014 og 2015 (2). I løpet av de siste seks årene har det blitt observert en økning i utviklingen av mer potente stoffer innen klassen syntetiske opioider, som fentanylanaloger og nitrazener, som har forårsaket dødsfall (2).

I 2021 ble totalt 884 NPS overvåket på det europeiske rusmiddelmarkedet, hvorav 162 tilhørte klassen syntetiske katinoner (7) (figur 1.2). Dette gjør syntetiske katinoner til den nest største



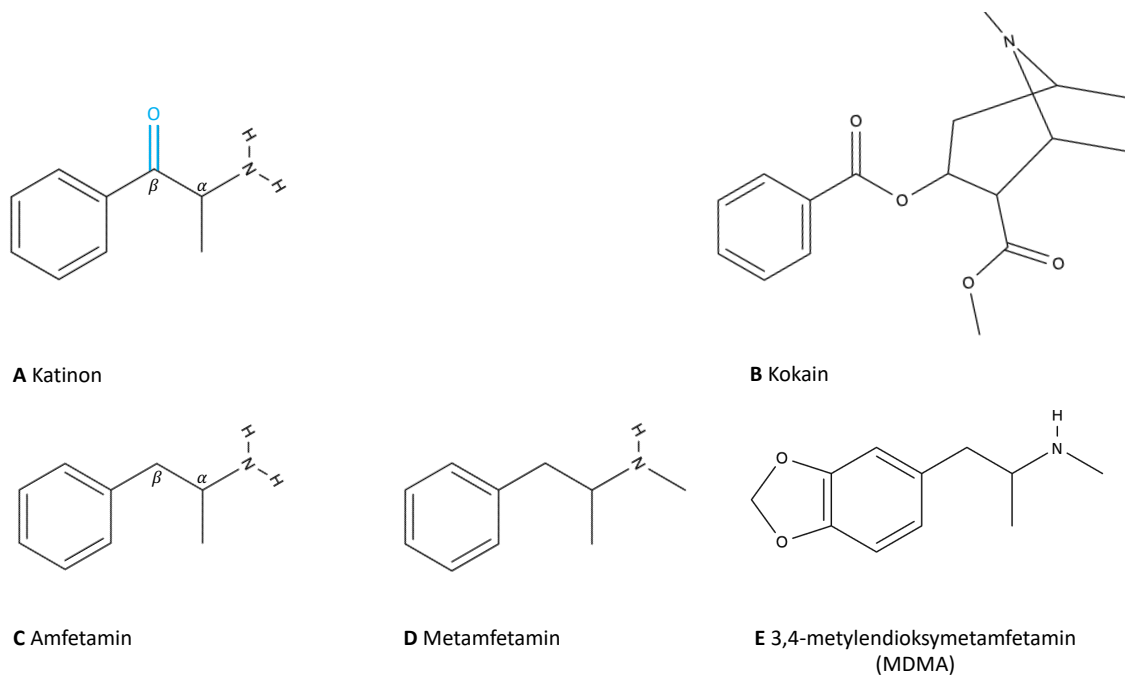
klassen av NPS som blir overvåket etter syntetiske cannabinoider (7). For informasjon om utbredelse av de øvrige klassene NPS, se figur 1.2.



**Figur 1.2** Totalt antall nye psykoaktive stoffer (NPS) som overvåkes i EU 2022 (7). Figuren er gjengitt med tillatelse fra Det europeiske overvåkingssenteret for narkotika og narkotikamisbruk, 2022 (7).

## 1.2 Katinoner

Syntetiske katinoner er kjemiske analoger av det naturlige alkaloidet katinon, og har lignende farmakologiske effekter (3). Strukturelt sett er katinon en naturlig analog av amfetamin (12). Den strukturelle forskjellen mellom katinon og amfetamin er at katinon inneholder et keton i  $\beta$ -posisjon fra amingruppen på amfetaminmolekylet (3, 13) (figur 1.3).



**Figur 1.3** Strukturformler av **A)** katinon, **B)** kokain , **C)** amfetamin, **D)** metamfetamin og **E)** 3,4-metylendioksymetamfetamin (MDMA). Katinon skiller seg fra amfetamin ved at katinon inneholder et keton (lys blå) i β-posisjon fra amingruppen på amfetaminmolekylet (3, 13). Figurene er laget i MolView.

## 1.2.1 Khat-planten

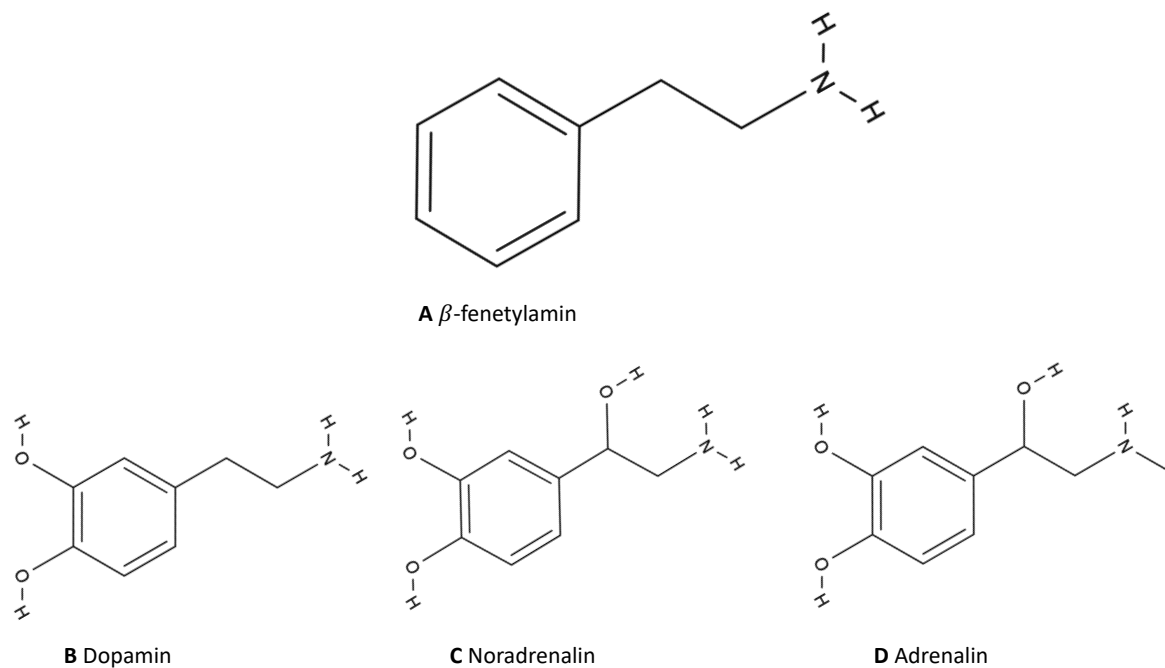
I generasjoner har den stimulerende effekten av Khat-planten, *Catha edulis*, vært kjent i mange land i Øst-Afrika og sør på den arabiske halvøya (3). Den første nedskrevne bruken av Khat var på 1300-tallet (14) og planten har blitt kultivert og brukt i mange land i de overnevnte områdene fram til dags dato (3, 12). Det var først i 1975 at katinon ble isolert fra Khat-planten og identifisert (10, 12, 15). Katinon er et alkaloid som forekommer naturlig i bladene til Khat-planten, og er det mest aktive virkestoffet som forårsaker den sentralstimulerende effekten til Khat (3, 10, 12, 16)(figur 1.3). Katinon er en relativt ustabil forbindelse, og det brytes ned til katin (norpseudoefedrin) og norefedrin (fenylpropanolamin) etter innhøsting og tørking (12, 17). Katin har også psykoaktive egenskaper, men er mindre stimulerende sammenlignet med katinon, mens norefedrin ikke induserer psykoaktive effekter (17). På grunn av nedbrytningsprosesser vil ferske blad fra Khat-planten gi mest ruseffekt (16, 17). Når fersk Khat tygges langsomt blir katinon frigjort fra planten og absorbert fra munnhulen og magesekken (18). Khat kan også inntas ved røyking eller ved å drikke te laget av planten (18).

## 1.2.2 Endogene katekolaminer og sympatomimetika

Katinon er strukturelt lik katekolaminer, som er en klasse endogene signalstoffer i hjernen (1 s. 197, 12). Katekolaminer har et strukturskjelett av  $\beta$ -fenetylamin og to hydroksylgrupper i ringstrukturen, som illustrert i (figur 1.4)(1 s. 197, 12). De endogene katekolaminene dopamin (DA), noradrenalin (NA) og adrenalin er nevrotransmittere som virker på de adrenerge reseptorene i det sympatiske nervesystemet, samt på dopaminerge og adrenerge reseptorer i det sentrale nervesystemet (12). Sympatomimetika er stoffer som etterligner effekten av noradrenalin og adrenalin, og kan øke nevrotransmittertransmisjonen av enten direkte ved å virke som agonister på adrenerge reseptorer, eller indirekte ved å øke mengden av endogene katekolaminer i synapsespalten (se avsnitt 1.4.2)(1 s. 214, 12). Amfetamin og kokain (figur 1.3 B og C) er sympatomimetika som virker indirekte på adrenerge reseptorer (19).

Adrenerge reseptorer deles hovedsakelig inn etter  $\alpha$ - og  $\beta$ -subtyper, spesifikt  $\alpha_1$ - og  $\alpha_2$ - eller  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -, og  $\beta_3$ -reseptorer (1 s. 198). Hovedeffektene ved stimulering av  $\alpha_1$ -reseptorer inkluderer vasokonstriksjon av glatte muskulatur, avslapping av glatte muskelceller i mage-tarmkanalen, økt spyttsekresjon og glykogenolyse (1 s. 198). På den andre siden fører stimulering av  $\alpha_2$ -reseptorer til hemming av nevrotransmitterfrigjøring i noradrenerge nerveceller, aggregering av blodplater, vasokonstriksjon av glatte muskelceller, og hemming av insulinutskillelse (1 s. 198). Når det gjelder  $\beta$ -reseptorer resulterer stimulering av  $\beta_1$ -reseptorer til økt hjertefrekvens og kontraksjonskraft, mens stimulering av  $\beta_2$ -reseptorer dilaterer glatt muskulatur i bronkiene og i indre organer (1 s. 198). Stimulering av  $\beta_3$ -reseptorer fører til lipolyse og termogenese (1 s. 198).

Katinon er et sympatomimetikum (12, 20) med sentralstimulerende effekt som gir blant annet eufori og årvåkenhet. Effekten oppnås en halv time etter tygging av khat og kan vare i opp til 3 timer (12). Akutte uønskede effekter etter inntak er assosiert med aktivering av det sympatiske nervesystemet, og innebærer kardiovaskulære effekter som økt puls og blodtrykk, og hypertermi (12, 16, 18). Etter høydose eller langvarig bruk av Khat har det blitt dokumentert andre uønskede effekter som psykose og psykisk avhengighet (16, 18).

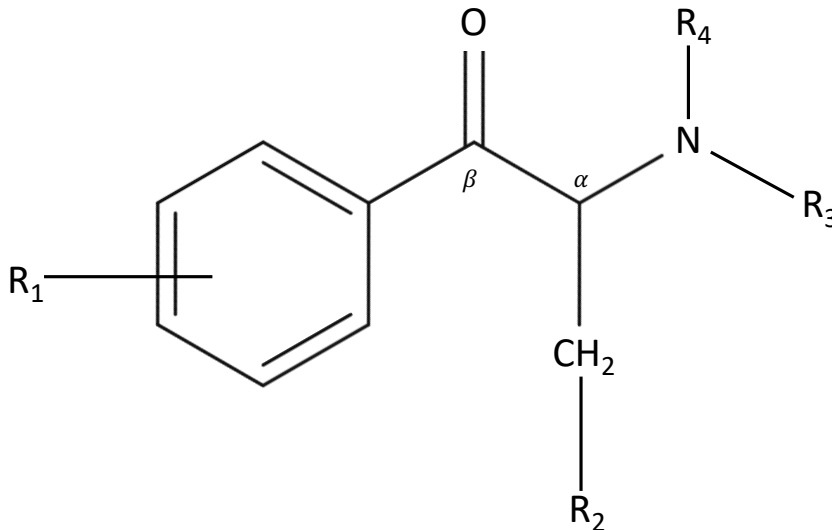


**Figur 1.4** Strukturformler for katekolaminer. Strukturskjelettet til katekolaminer er strukturelle analoger av **A**)  $\beta$ -fenetylamin. **B**) Dopamin, **C**) noradrenalin og **D**) adrenalin er endogene signalstoffer (nevrottransmittere) som kategoriseres som katekolaminer (12). Strukturformlene er laget i MolView.

### 1.2.3 Terapeutisk bruk av syntetiske katinoner

Metkatinon regnes som det første syntetiserte katinonet (10), og ble framstilt for første gang i 1928 i håp om at det skulle ha terapeutisk potensiale (21). Metkatinon ble markedsført som et antidepressivum på 1930- og 1940-tallet i det tidligere Sovjetunionen (22). Senere ble flere metkatinon-analoger (figur 1.5) syntetisert som potensielle legemiddelkandidater for behandling av depresjon og overvekt (3, 13). På 1960-tallet ble  $\alpha$ -PVP patentert som et sentralstimulerende og blodtrykk-økende legemiddel av legemiddelfirmaet Boehringer Ingelheim (23).  $\alpha$ -PVP ble imidlertid trukket tilbake fra markedet etter rapportert misbruk av legemiddelet (11). Økende misbruk av metkatinon på 1970-tallet i tidligere Sovjetunionen og i USA på 1900-tallet, førte til bekymringer knyttet til misbruk- og avhengighetspotensialet av syntetiske katinoner (13, 22). På grunn av misbruk- og avhengighetspotensialet, er det bare ett syntetisk katinon som har fått markedsføringstillatelse i Norge i dag (13). Bupropion, som er

virkestoffet i Wellbutrin<sup>®</sup>, er en katinon-analog som ble introdusert på 1980-tallet, og som fortsatt brukes i behandling av depresjon (3, 22).



**Figur 1.5** Generell struktur for analoger av syntetiske katinoner. R-gruppene viser hvor substituenten kan inngå i molekylet for å lage nye analoger av katinon. R<sub>1</sub> viser mulig substitusjon i den aromatiske ringen, R<sub>2</sub> viser mulig substitusjon på α-karbonet i sidekjeden, og R<sub>3</sub> og R<sub>4</sub> viser mulig substitusjon på aminet.

## 1.3 Farmakologiske effekter av syntetiske katinoner

De farmakologiske effektene av syntetiske katinoner er et resultat av noradrenerge, dopaminerge, og serotonerge effekter både sentralt og perifert i nervesystemet (9, 12).

### 1.3.1 Noradrenerg, dopaminerg og serotonerg stimulering

Syntetiske katinoner aktiverer det noradrenerge systemet (9, 24, 25), hvor NA spiller en rolle i regulering av våkenhet, blodtrykk, seksualdrift og humør (1 s. 501). Syntetiske katinoner som stimulerer til noradrenerg aktivitet bidrar til stimulerende effekter som økt energi, bedre humør, økt årvåkenhet og oppmerksomhet (8, 26). Uønskede effekter av syntetiske katinoner er hovedsakelig knyttet til sympatomimetiske effekter med fokus på hjerte- og karsystemet (13, 27). Høye doser og langvarig bruk av katinoner kan føre til aggressiv oppførsel, hypertermi, hypertensjon, takykardi og hjertestans (28, 29, 30).

Dopaminerge hjernebaner regulerer motorisk funksjon som koordinasjon og bevegelse, følelser og belønning (1 s. 504). I lave doser gir syntetiske katinoner en følelse av eufori og nytelse (8) på grunn av stimulering av belønningsområdet i hjernen som ligger i den mesolimbiske nervebanen (31, 32). Syntetiske katinoner har derfor et høyt avhengighetspotensiale (9, 33). Syntetiske katinoner som stimulerer til økt dopaminerg aktivitet kan i tillegg gi hallusinasjoner (4, 34).

De serotonerge nervebanene er assosiert med regulering av søvn, våkenhet, humør, kroppstemperatur, appetitt, og oppfatning av smerte (1 s. 506). I høye doser kan syntetiske katinoner med serotonerg aktivitet forårsake serotonergt syndrom med forvirring, hallusinasjoner og hypertermi (4, 9).

### **1.3.2 Akutte uønskede effekter og dødsfall**

Dødsfall forårsaket av syntetiske katinoner skyldes akutte uønskede effekter som hypertermi, hypertensjon, hjertestans og serotonergt syndrom (13). Det har også vært rapportert 128 dødsfall i Storbritannia knyttet til mefedron i en periode på to år på 2010-tallet, hvorav 26 var direkte knyttet til akutt toksisitet av mefedron (27). Fra 2012 til 2015 var det også rapportert 115 dødsfall knyttet til  $\alpha$ -PVP i Europa, hvorav 23 var direkte knyttet til akutt toksisitet (35). I 2019 ble det første dødsfallet knyttet til  $\alpha$ -PiHP registrert (36), og det har nylig vært et dødsfall som følge av akutt toksisitet av  $\alpha$ -PiHP (37).

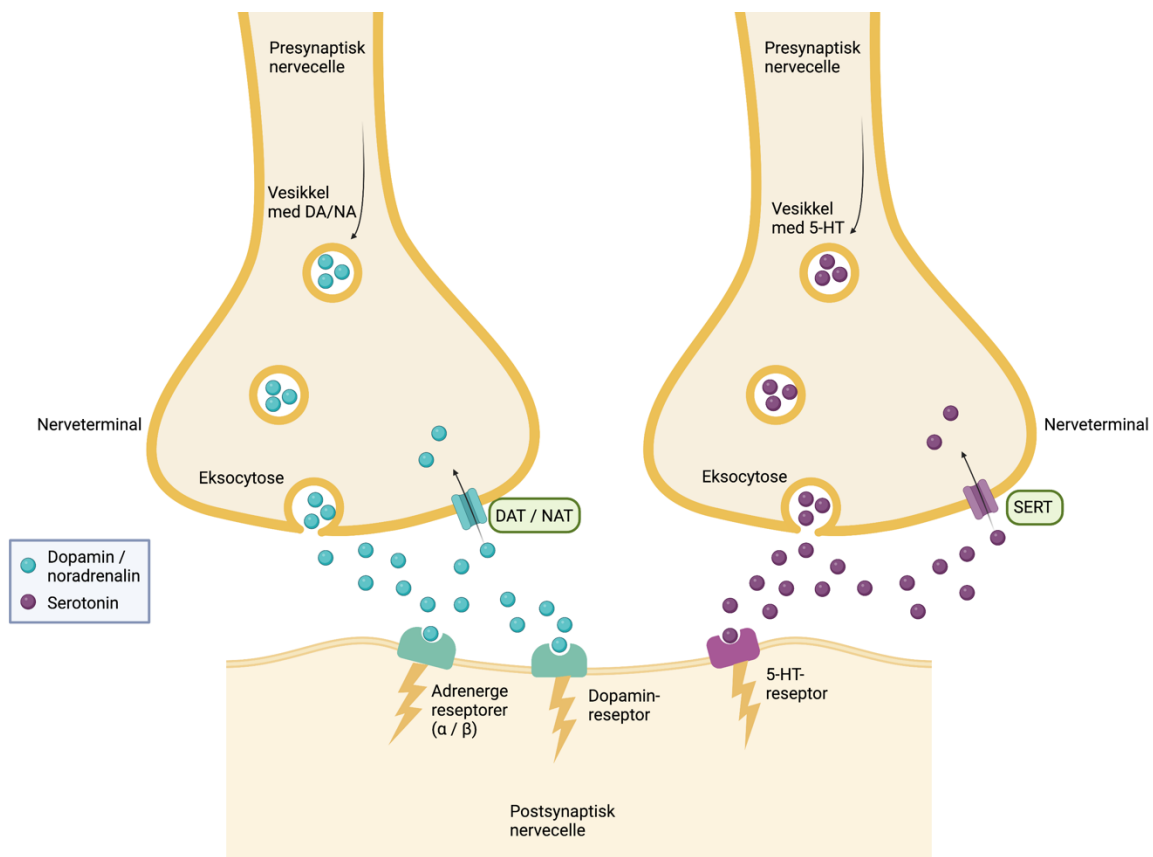
## **1.4 Virkningsmekanisme av syntetiske katinoner**

### **1.4.1 Monoaminsignalerer i sentralnervesystemet**

For å kunne forstå virkningsmekanismen til syntetiske katinoner, er det essensielt å ha innsikt i hvordan monoaminsignalerer i hjernen foregår.

I sentralnervesystemet til pattedyr finnes det i stor grad nerveceller som syntetiserer, lagrer og frigjør monoaminene DA, NA og serotonin 5-HT (38). Under fysiologiske betingelser vil et stimuli føre til signaloverføring mellom nerveceller (figur 1.6) (39). Dette foregår ved frigjøring av neurotransmittere som DA, NA og 5-HT fra vesikler i nerveterminalen via eksocytose (39). Neurotransmitterne DA, NA og 5-HT diffunderer over synapsespalten og aktiverer de postsynaptiske reseptorene, henholdsvis dopaminerge, adrenerge og serotonerge

reseptorer. Aktivisering av disse reseptorene fører til en respons i den postsynaptiske nervecellen (39). Presynaptiske nerveceller har cellemembranproteiner som fungerer som dopamintransportører (DAT), noradrenalintransportører (NAT) og serotonintransportører (SERT) (3, 4, 24). Signaloverføringen mellom nervecellene opphører ved aktivt reopptak av de frigjorte monaminene fra synapsespalten tilbake inn i nervecellen gjennom monoamintransportørene (38). Denne reopptaksprosessen bidrar til resirkulering av DA, NA og 5-HT, slik at de kan benyttes på nytt ved et nytt signal (40).



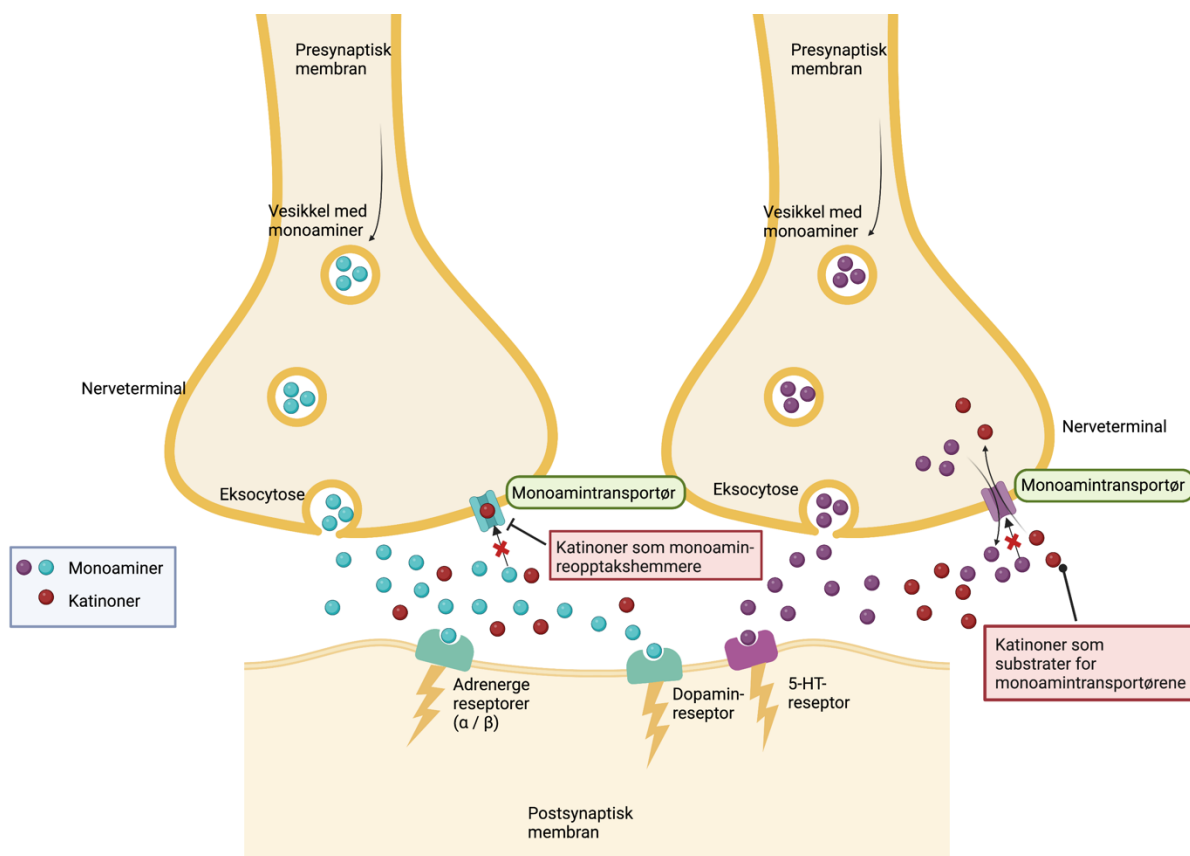
**Figur 1.6** Forenklet illustrasjon på signaloverføring mellom dopaminerge, noradrenerge og serotonerge nerveceller. Et stimuli fører til frigjøring av neurotransmitterne dopamin (DA), noradrenalin (NA) og serotonin (5-HT) fra den presynaptiske cellen (39). Neurotransmitterne binder seg til reseptorer på den postsynaptiske cellen og utøver en respons i målcellen (39). Dopamintransportører (DAT), noradrenalintransportører (NAT) og serotonintransportør (SERT) transporterer henholdsvis DA, NA og 5-HT tilbake i den presynaptiske nervecellen og signaloverføringen opphører (38). Figuren er laget i biorender.com.

## 1.4.2 Hemmere eller substrater for monoamintransportører

Syntetiske katinoner utøver sin effekt ved å virke på monoamintransportørene DAT, NAT og SERT (figur 1.7) (3, 4, 24). Virkningen er avhengig av den kjemiske strukturen, som avgjør affiniteten og selektiviteten til DAT, NAT og SERT (9, 29). Syntetiske katinoner virker på to forskjellige måter: ved å hemme reopptaket av monoaminer, eller som substrater for monoamintransportørene (3, 29, 38, 41). Basert på ulik selektivitet til monoamintransportørene vil de ulike katinonene kunne gi varierende sentralstimulerende effekter ved forskjellige doser, i tillegg til å ha ulikt avhengighetspotensial (13, 25, 29).

Syntetiske katinoner hemmer reopptak ved binding til det aktive setet i transportørene, uten å bli transportert inn i cellen (3, 41). Syntetiske katinoner kan også bli transportert inn i cytoplasma gjennom aktiv transport, og dermed fungere som substrat for transportørene (38). Når de syntetiske katinonene transporteres inn i cytoplasma fører det til effluks av monoaminer gjennom monoamintransportøren, også kalt transport-mediert frigjøring (39, 42, 43). Resultatet av blokkerte transportører og effluks av monoaminer gjennom monoamintransportørene er økte ekstracellulære konsentrasjoner av monoaminene DA, NA og 5-HT, som forlenger aktiveringen av postsynaptiske reseptorer (3, 13, 25, 38, 44). De postsynaptiske reseptorene er delt inn etter subtyper av DA, NA og 5-HT, hvor DA-reseptorer er delt inn i D<sub>1</sub>- og D<sub>2</sub>-reseptorer, som er viktige i hukommelse, oppmerksomhet, impuls kontroll, og motorisk aktivitet (45).





**Figur 1.7** Forenklet illustrasjon av virkestedet til nye syntetiske katinoner. Katinoner øker konsentrasjonen av monoaminer i synapsespalten ved å virke som: 1) reopptakshemmer av dopamin (DA), noradrenalin (NA) og serotonin (5-HT) (venstre nerveterminal) og 2) som substrat for monoamintransportøren (høyre nerveterminal) (3, 29, 38, 41). Ved å øke konsentrasjonen av monoaminer i synapsespalten vil signaler forlenges fra de postsynaptiske reseptorene og videre til målcellene, hvor responsen utøves (38). De postsynaptiske reseptorene kan være adrenerge reseptorer, dopaminreseptorer eller 5-HT-reseptorer. Figuren er laget i biorender.com.

## 1.5 Inndeling av syntetiske katinoner

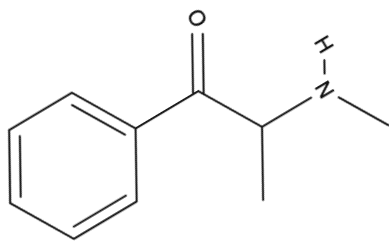
Syntetiske katinoner kan deles inn i tre grupper basert på virkningsmekanisme og effekt på monoamintransportørene i *in vitro*-studier (24). Dette inkluderer i hvor stor grad katinonene hemmer reopptak av DA, NA og 5-HT, og effekt på frigjøringen av disse neurotransmitterne (24, 29).

Den første gruppen er syntetiske katinoner som har lignende virkningsmekanisme som kokain (figur 1.3 B) og MDMA (figur 1.3 E), som f.eks mefedron og metylon (24, 29). Denne gruppen syntetiske katinoner virker som ikke-selektive monoaminreopptakshemmere på DAT, NAT og SERT men er mer selektiv til DAT enn SERT, som er virkningen av kokain

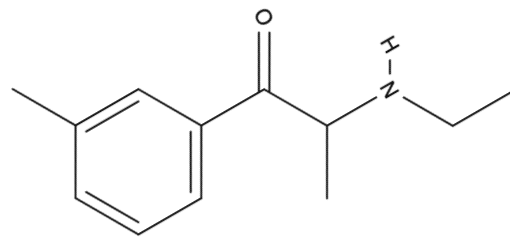
(24, 29). I tillegg inneholder denne gruppen syntetiske katinoner som kan frigjøre 5-HT fra nerveterminalene, som er virkningen av MDMA (24, 29).

Den andre gruppen er syntetiske katinoner og har egenskaper som ligner metamfetamin (figur 1.3 D), og inkluderer katinon (figur 1.3 A) og metkatinon (figur 1.8 A)(24, 29). Denne gruppen katinoner virker som katekolaminreopptakshemmere av NAT og DAT, og frigjør DA fra nerveterminalene (24, 29).

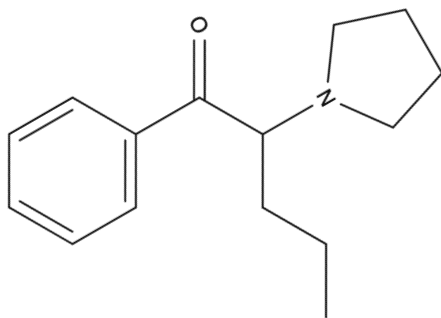
Den tredje gruppen er pyrrolidinkatinoner, som er potente og selektive katekolaminreopptakshemmere med liten effekt på SERT (24, 29). Pyrrolidinkatinoner i denne gruppen fungerer ikke som et substrat av monoaminene, og gir derfor ikke frigjøring av neurotransmittere (24, 29, 46). Eksempler på syntetiske katinoner i denne gruppen er MDPV og  $\alpha$ -PVP (figur 1.8 C) (24, 29, 46).



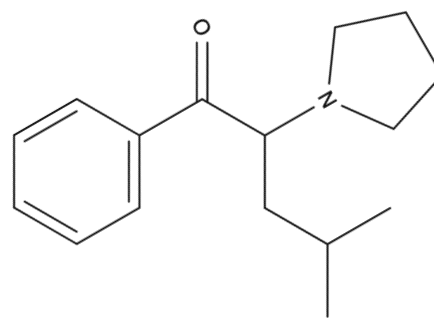
**A** Metkatinon



**B** 3-MEC (3-metyletkatinon)



**C**  $\alpha$ -PVP ( $\alpha$ -pyrrolidinovalerofenon)



**D**  $\alpha$ -PiHP ( $\alpha$ -pyrrolidinoisoheksanofenon)

**Figur 1.8** Strukturformler for de syntetiske katinonene som studeres i denne oppgaven, henholdsvis **A**) metkatinon, **B**) 3-metyletkatinon (3-MEC), **C**)  $\alpha$ -pyrrolidinovalerofenon ( $\alpha$ -PVP;  $\alpha$ -pyrrolidinopentiofenon) og **D**)  $\alpha$ -pyrrolidinoisoheksanofenon ( $\alpha$ -PiHP).

Prekliniske studier har vist at selektiviteten til DAT sammenlignet med SERT er avgjørende for hvor avhengighetsskapende et rusmiddel er (3, 47). DAT/SERT-ratioen blir beregnet med slik:  $1/IC_{50} \text{ DAT} : 1/IC_{50} \text{ SERT}$  (48). Jo mer potent effekt på DAT i forhold til SERT (DAT/SERT-ratio  $> 10$ ), desto mer avhengighetsskapende effekt har rusmiddelet (3, 13, 24, 47), da økt DA-frigjøring stimulerer belønningssystemet (31, 32). Dersom et rusmiddel har et lavt DAT/SERT-ratio indikerer dette at rusmiddelet har mindre avhengighetsskapende effekt (3, 47, 49). Dette henger sammen med at 5-HT frigjøring har en hemmende effekt på belønningssystemet og dermed kan redusere risikoen for avhengighet (3, 47, 49)

## 1.6 Hensikt med studien

Formålet med denne studien var å undersøke farmakodynamiske og farmakokinetiske egenskaper til to nye syntetiske katinoner som er tilgjengelige på det norske og europeiske rusmiddelmarkedet. Det finnes lite informasjon om virkning av disse stoffene, og dermed stoffenes helseskadelige effekter.

I denne studien ble mus brukt som dyremodell for *in vivo*- og *in vitro*-studier for de syntetiske katinonene 3-metyletkatinon (3-MEC) og  $\alpha$ -pyrrolidinoisoheksanofenon ( $\alpha$ -PiHP). De farmakologiske egenskapene til 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP ble sammenlignet med henholdsvis metkatinon og  $\alpha$ -pyrrolidinovalerofenon ( $\alpha$ -PVP), som ble benyttet som referansestoffer gjennom hele studien.

Delmål for studien:

- Undersøke virkningsmekanisme og potens av 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP i *in vitro*-eksponering for å kunne klassifisere stoffene.
- Undersøke farmakodynamiske effekter som akutt ruseffekt, stereotypisk aktivitet og endringer i kroppstemperatur etter *in vivo*-eksponering for 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP i mus.
- Undersøke farmakokinetikken til 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP etter *in vivo*-eksponering i mus.

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Kjemikalier og laborieutstyr

Alle kjemikalier som ble benyttet i denne masteroppgaven er vist i tabell 2.1. Oversikt over laborieutstyr er vist i tabell 2.2 Standard laborieutstyr som pipetter, pipettespisser, sentrifugerør, spatler, veieskip, sprøyter og kanyler ble levert fra kommersielle leverandører av laborieutstyr.

**Tabell 2.1** Kjemikalier og kjemikalieløsninger.

Produkt	Produsent/leverandør
3-metyletkatinon hydroklorid (3-MEC HCl)	Chiron AS, Trondheim, Norge
Ammoniumformat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_2$ )	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Ammoniumkarbonat $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Benzotropinmesylat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Bovint serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
D-(+)-glukose	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Dihydroksyfenyletylamin-3-4-[ring-2,5,6- $^3\text{H}$ ]-Dopamin ( $^3\text{H}$ ]-DA)	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Dinatriumhydrogenfosfat-2-hydrat	VWR Avantor, Radnor, USA
Etanolbasert desinfeksjon (70%) (Antibac <sup>®</sup> )	KiiltoClean AS, Lempäälä, Finland
Etylacetat	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Fluoksetin hydroklorid	Merck, Darmstadt, Tyskland
Heparin (100 IE/mL)	Leo, Ballerup, Danmark
Hydroksytryptamin kreatininsulfat, 5-[1,2- $^3\text{H}$ [N]] ( $^3\text{H}$ ]-5-HT)	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Isofluran	Baxter international, Deerfield, USA

Isoton saltvannsløsning (0,9 % NaCl)	B. Braun Medical, Melsungen, Tyskland
Kaliumklorid (KCl)	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Kalsiumklorid tetrahydrat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Magnesiumklorid heksahydrat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Metanol	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Metkatinon hydroklorid	Chiron AS, Trondheim, Norge
n-Heptan	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Natriumklorid (NaCl)	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Noradrenalin levo-[ring-2,5,6- <sup>3</sup> H]([ <sup>3</sup> H]-NA)	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Polyetylenimin solution (50%)	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Reboksetinmesylat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Salpetersyre (HNO <sub>3</sub> )	VWR Avantor, Radnor, USA
Sukrose	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Trizma® hydroklorid (Tris HCl)	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
UltimaGold™ tellervæske	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
<b>α</b> -pyrrolidinisoheksanofenon hydroklorid ( <b>α</b> -PiHP HCl)	Chiron AS, Trondheim, Norge
<b>α</b> -pyrrolidinovalerofenone hydroklorid ( <b>α</b> -PVP HCl; <b>α</b> -pyrrolidinopentiofenon)	Chiron AS, Trondheim, Norge

**Tabell 2.2** Laboratorieutstyr

<b>Produkt</b>	<b>Produsent/leverandør</b>
Analysevekt (Excellence plus XP205)	Metler Toledo, Greifensee, Sveits
Anestesiapparat med induksjonskammer og maske (Fluovac og MiniVac)	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus, March, Tyskland
Inndamper (Turbovap®)	Biotage, Uppsala, Sverige
Insulinsprøyte (0,5 mL, 29G)	Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA
Knivhomogenisator (IKA® T10 Basic Ultra-Turrax®)	Ika Werke, Staufen im Breisgau, Tyskland
Lux-måler	Clas Ohlson, Oslo, Norge
Mikrofiber glassfilter (Whatman GF/B 25 mm diameter)	GE healthcare
MQ-vannrensesystem (Milli-Q®)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Multi Tube-vortexer (VX-2500)	VWR Avantor, Radnor, USA
Multipipette (Multipette® E3x)	Eppendorf, Hamburg, Tyskland
pH-elektrode (WTW Sentix® 62 )	Xylem Inc., Washington, D.C., USA
pH-meter (pH 211 Microprocessor)	Hanna Instruments, Smithfield, USA
Ristevannbad (GLS Aqua 12 Plus)	Grant Instruments, Cambridge, UK
Scintillasjonsteller (Tri-carb 2810TR)	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Sentrifuge (Avanti J- 30I) med JA-17-rotor	Beckman Coulter, Brea, USA
Sentrifuge (X15-R)	Beckman Coulter, Brea, USA
Temperaturavleser (DAS-8027IUS)	Bio Medic Data Systems, Inc, Delaware, USA

Temperatursensor (IPTT-300)	Bio Medic Data Systems Inc., Delaware, USA
Vakuumbøtte	Millipore (Merck), Darmstadt, Tyskland
Vekt (TE601)	Sartorius, Göttingen, Tyskland
Versamax analyzer	Omnitech Electronics Inc., Ohio, USA
Versamax Animal Activity Monitor	Omnitech Electronics Inc., Ohio, USA
Vevshomogenisator (Eurostar power B)	Ika Werke, Staufen im Breisgau, Tyskland

## 2.2 Forsøksdyr

Hannmus av typen C57BL/6JRj (8–14 uker gamle, Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankrike) ble benyttet i alle forsøk. Alt arbeid med forsøksdyr ble utført ved Avdeling for komparativ medisin, Institutt for medisinske basalfag, Universitetet i Oslo (UiO). Etter ankomst ble dyrene akklimatisert i henholdsvis én eller to uker før de ble inkludert i *in vitro*- eller *in vivo*-forsøk. Mus til *in vitro*-studien (n=45) ble oppstallet i grupper på 5 mus per 500 cm<sup>2</sup>-bur. Mus til *in vivo*-studien (n=203) ble oppstallet i grupper på 8 mus per 900 cm<sup>2</sup>-bur. Burene inneholdt strø, miljøberikelse (plasthus/iglo og løpehjul) og materiale til redebygging. Dyrene hadde fri tilgang på vann og fôr (10 mm pellets, ssniff® M–Z autoclavable, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Tyskland). Musene ble oppstallet ved konstant temperatur (21 ± 2°C) og luftfuktighet (50 ± 10 %), og 12 timers lysperiode fra kl 07.00 til kl 19.00.

*In vivo*-studien var godkjent av Mattilsynet (Forsøksdyrforvaltningens tilsyns- og søknadssystem – FOTS) før oppstart (FOTS-ID: 29696). *In vitro*-studien, hvor dyr ble avlivet for uttak av hjernevev, var godkjent av person med særskilt kontrollansvar (PMSK) ved Avdeling for komparativ medisin (Prosjekt-ID: A054). Alle prosedyrer i forsøkene ble utført i henhold til lov om dyrevelferd, forskrift om bruk av dyr i forsøk og EU-direktivet 2010/63/EU.

## 2.3 Forsøksoppsett til *in vivo*-studier

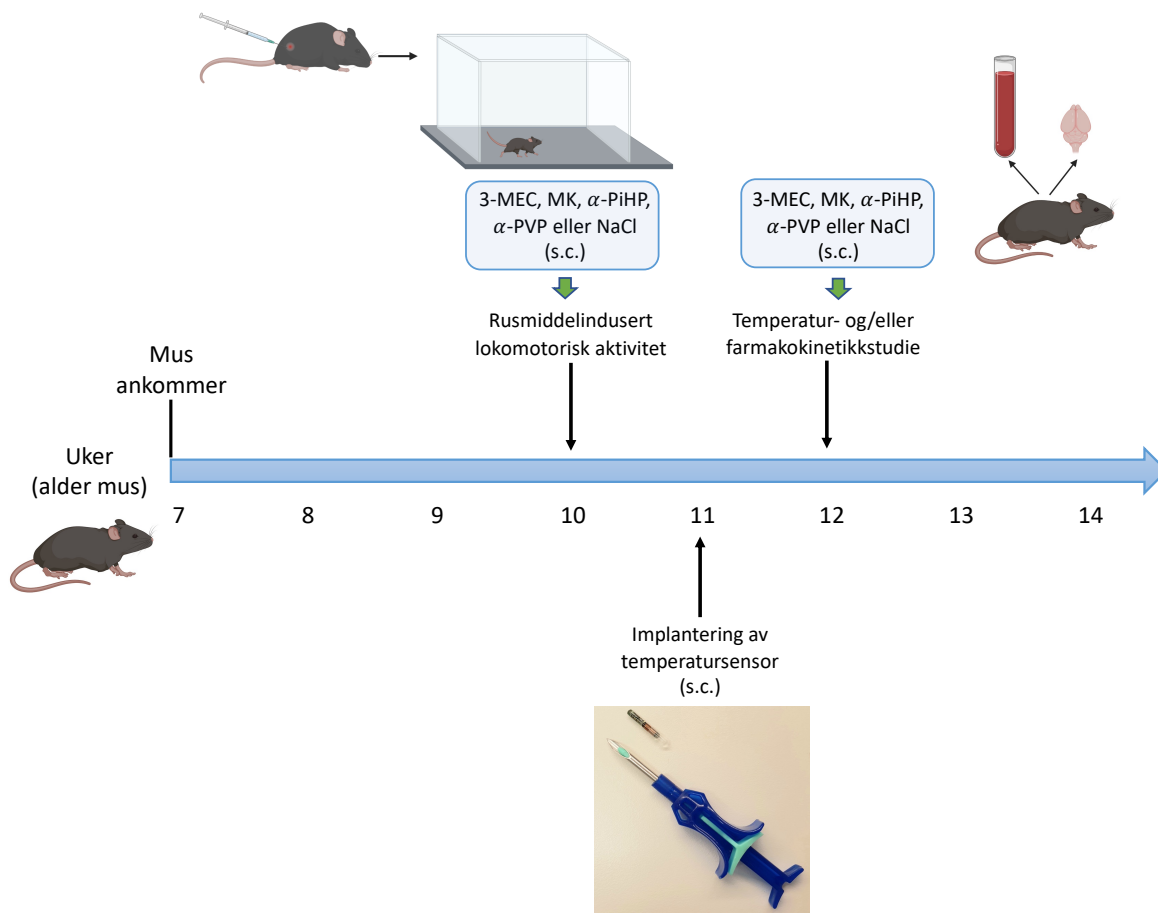
Musene ankom Avdeling for komparativ medisin da de var 8 uker gamle. Figur 2.1 viser en skjematisk oversikt over *in vivo*-studien.

For å redusere antall forsøksdyr i studien i henhold til 3R-prinsippet (replace, reduce, refine), inngikk hver mus i flere forsøk. For å sikre at den første rusmiddeldosen var fullstendig eliminert fra kroppen før temperatur- og kinetikkstudiene ble forsøk utført tidligst én uke etter studiene av rusmiddelindusert lokomotorisk aktivitet. Øremerking ble gjort minst fire dager før musene ble inkludert i forsøk for å unngå at stressreaksjoner fra øremerking skulle påvirke resultatene.

Totalt 203 mus ble inkludert for å undersøke i rusmiddelindusert lokomotorisk aktivitet. Én uke etter måling av lokomotorisk aktivitet ble temperatursensorer implantert i 78 mus. Det ble tilstrebet 6 mus per dose rusmiddel og kontroll i lokomotionsstudien og temperaturstudien. Måling av kroppstemperatur og uttak av blod og hjerne til konsentrasjonsmålinger ble utført tidligst 4 dager etter implantering av temperatursensor. Uttak av blod og hjerne til kinetikk ble utført i 123 mus (ca. 30 mus per rusmiddel, 6 mus per tidspunkt) i kinetikkstudien.

Hver mus fikk totalt to injeksjoner av enten 3-MEC, metkatinon,  $\alpha$ -PiHP,  $\alpha$ -PVP eller 0,9 % NaCl, og alle injeksjoner ble satt subkutant (s.c.) på ryggen til musene (10 mL/kg). Det ble tilstrebet at mus i *in vivo*-studien fikk samme rusmiddel ved begge injeksjoner.





**Figur 2.1** Tidslinje for *in vivo*-studien illustrert for én mus. Musene ble inkludert i studie av rusmiddelindusert lokomotorisk aktivitet etter 3 uker akklimatisering. Rusmidlene som ble injisert s.c. var 3-MEC, metkatinon,  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP. Kontrolldyr fikk 0,9 % NaCl. Temperatursensor ble implantert én uke etter måling av rusmiddelindusert lokomotorisk aktivitet. Tidligst 4 dager etter implantering av temperatursensor ble musene inkludert i temperatur- og/eller kinetikkstudie. Hver mus fikk totalt 2 injeksjoner av rusmiddel. Figuren er laget i biorender.com.

### 2.3.1 Rusmidler og rusmiddeløsninger

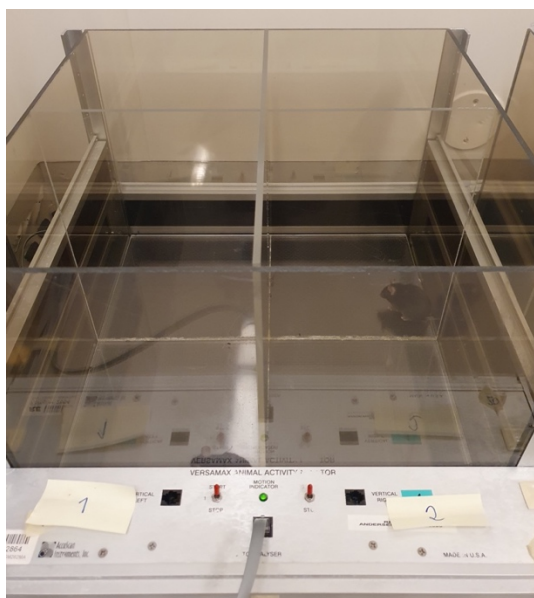
Stamløsninger av hvert rusmiddel (0,25, 1, 2,5, 5 mg/mL) ble laget ved Seksjon for rusmiddelforskning, Avdeling for rettsmedisinske fag, Oslo Universitetssykehus (OUS), og oppbevart i maksimalt 4 uker ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  på Avdeling for komparativ medisin, UiO.

Rusmidlene 3-MEC, metkatinon,  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP ble løst i og fortynnet med 0,9 % NaCl. Stamløsningene ble fortynnet til ønsket konsentrasjon. Ferdig fortynnet løsning ble injisert i musene samme dag som de ble laget ved Avdeling for komparativ medisin, UiO.

## 2.4 Lokomotorisk aktivitet

Inntak av rusmidler fører til økt frigjøring av dopamin i hjernen, spesielt i belønningsområdet som befinner seg i den mesolimbiske nervebanen (31, 32). I mus fører økt frigjøring av dopamin i belønningsområdet til økt lokomotorisk aktivitet (50). På denne måten vil eksponering for sentralstimulerte rusmidler som amfetamin og kokain i mus resultere i økt motorisk aktivitet (50, 51). Endring i lokomotorisk aktivitet er en veletablert metode for å studere akutt ruseffekt i mus, som tidligere beskrevet av Andersen et al. og Mørland et al. (51, 52).

Forsøkene ble utført i et stille rom med dempet belysning (18–25 lux, målt med en lux-måler). Registrering av lokomotorisk aktivitet ble gjort i 9 lokomosjonskammer (Versamax Animal Activity Monitor, 40 × 40 × 40 cm) med et infrarødt rutenett med (2,5 cm × 2,5 cm) i bunnen av kamrene. Hvert lokomosjonskammer var inndelt i fire kvadranter (20 cm × 20 cm) med skillevegger i pleksiglass, hvor to mus ble plassert diagonalt overfor hverandre for å unngå forstyrrelser i aktivitetsregistreringen til musene (figur 2.2). Musenes bevegelsesmønster ble registrert ved hjelp av det infrarøde rutenettet. Lokomotorisk aktivitet ble registrert i avstand (cm) per intervall på 5 min.



**Figur 2.2 Lokomosjonskammer (Versamax Animal Activity Monitor)**

Lokomosjonskammeret var delt inn i kvadranter på 20 cm × 20 cm med pleksiglass. Musene ble plassert diagonalt overfor hverandre i hvert sitt kammer for å unngå forstyrrelser i aktivitetsregistreringen

Før forsøket ble musene veid for å bestemme injeksjonsvolum (10 mL/kg). Musene ble plassert i lokomosjonskammeret i 60 min for tilvenning (habitueringsfase). Etter habituering fikk musene en s.c. injeksjon med enten metkatinon (1–25 mg/kg), 3-MEC (2,5–30 mg/kg),  $\alpha$ -PVP (0,5–10 mg/kg),  $\alpha$ -PiHP (1–15 mg/kg) eller NaCl. Umiddelbart etter injeksjonen ble hver mus plassert i det lokomosjonskammeret den var habituert i og lokomotorisk aktivitet ble målt i 240 min i programvaren Fusion versjon 5.5 VersaMax edition (Omnitech Electronics, Inc., Ohio, USA). Etter endt lokomosjonsforsøk ble kamrene vasket grundig med mildt såpevann for å unngå at lukt skulle påvirke adferd i neste forsøk.

Dosene som ble testet innledningsvis (2,5, 10 og 25 mg/kg) ble valgt på bakgrunn av tidligere studier med syntetiske katinoner (53, 54, 55). Basert på resultatene fra disse dosene, ble flere doser valgt for å finne den laveste dosen som induiserte lokomotorisk aktivitet, og dosen som ga maksimal lokomotorisk aktivitet ( $E_{\max}$ ).

Lokomotorisk aktivitet og  $E_{\max}$  ble registrert i cm per 5 min intervall (cm/5 min).  $E_{\max}$  ble funnet av intervallet (cm/5 min) som ga den høyeste gjennomsnittlige registrerte lokomotoriske aktiviteten etter administrering av de ulike dosene rusmiddel. Total lokomotorisk aktivitet ble registrert som total tilbakelagt distanse i hele forsøket (cm/240 min).

## 2.5 Stereotypisk adferd

Stereotypisk adferd er definert som repetitiv adferd uten formål (56). Slik stereotypisk adferd er unormal adferd som å rygge, gnage eller slikke på omgivelsene (vegg og golv), bevege hodet raskt fram og tilbake eller opp og ned, eller unormal hyppig og repetitiv normalatferd som å reise seg på bakbena, snuse i luften og overdrevent stell eller pussing. Musenes adferd ble registrert manuelt 15 og 30 min etter injeksjon av enten 3-MEC (2,5–30 mg/kg), metkatinon (1,0–25 mg/kg),  $\alpha$ -PiHP (1–15 mg/kg),  $\alpha$ -PVP (0,5–10 mg/kg) eller NaCl samtidig som dyrene deltok i lokomosjonsstudien. Observasjonene varte i totalt 5 min på hvert måletidspunkt.

## 2.6 Temperaturmålinger

For å undersøke hvordan 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP, samt referansestoffene metkatinon og  $\alpha$ -PVP, påvirker kroppstemperatur, ble musene implantert med en temperatursensor.

Temperatursensoren ble brukt til å registrere kroppstemperatur ved ulike tidspunkt etter eksponering for rusmidlene.

### 2.6.1 Implantering av temperatursensor

Hver mus ble plassert i et induksjonskammer med 2,5–3 % isofluran og 800 mL/min O<sub>2</sub>. Da musen hadde falt til ro ble den lagt på magen i en induksjonsmaske (2,5 % isofluran, 800 mL/min O<sub>2</sub>). En pinsett ble brukt til å klemme på foten for å sjekke tilbaketrekningsrefleksen. Ved refleks ble musen liggende litt lenger i anestesi før refleksene ble sjekket på nytt. Ved fravær av refleks ble musen ansett å være tilstrekkelig anestisert. Ryggen og injeksjonsstedet ble desinfisert med kompresser (Mesoft®) dynket med 75 % etanol (Antibac). Temperatursensoren (IPTT-300, 14 × 2 mm transponder) var integrert i en 12 G kanyle (figur 2.3), og ble injisert s.c. over den ene skulderen.

Etter implantering ble musen plassert i et bur med strø for oppvåkning. Musene ble observert daglig i 3 påfølgende dager etter implantering for å vurdere sår dannelse på injeksjonsstedet og musenes allmenntilstand. Se vedlegg A for skåringskjema for evaluering av smerte og humane endepunkter. Ingen av dyrene fikk sår dannelse etter implantering av temperatursensor, men én mus manglet temperatursensorsignal. Årsaken til dette er uviss, men kan skyldes at sensoren hadde falt ut, at sensoren ikke var blitt implantert i utgangspunktet, eller at sensoren var defekt.



**Figur 2.3** Temperaturtransponder (IPTT-300) med kanyle. Temperaturtransponderen er 14 mm lang og 2 mm bred og ble injisert s.c. over skulderen på musene. Temperatursensoren er avbildet ved siden av en kulepenn for å vise størrelsesforholdet.

## 2.6.2 Avlesing av kroppstemperatur

Musene ble veid for å bestemme volum injeksjonsløsning (10 mL/kg). Deretter ble musenes kroppstemperatur (utgangstemperatur) målt ved hjelp av en håndholdt temperaturavleser (DAS-8027IUS) 5–8 cm fra transponderen uten å berøre musen, som tidligere beskrevet av Glatfelter et al. (57). Musene ble oppstallet i hvert sitt enkeltbur med strø og materiale til redebygging gjennom hele forsøket, som varte i 240 min etter injeksjon av testsubstans.

Hver mus fikk en s.c. injeksjon av enten 3-MEC (2,5, 10 eller 25 mg/kg), metkatinon (2,5, 10 eller 25 mg/kg),  $\alpha$ -PiHP (1, 2,5 eller 10 mg/kg),  $\alpha$ -PVP (1, 2,5 eller 10 mg/kg) eller 0,9 % NaCl (10 mL/kg). Musene ble deretter plassert tilbake i buret sitt. Temperaturen til musene ble lest av ved 5, 15, 30, 60, 120 og 240 min etter injeksjon av 3-MEC, metkatinon,  $\alpha$ -PiHP,  $\alpha$ -PVP eller NaCl.

Rusmiddeldosene ble valgt ut fra resultatene i lokomosjonsforsøkene. 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP ble testet ved de samme 3 dosene som referankestoffene, henholdsvis metkatinon og  $\alpha$ -PVP. Det

ble tilstrebet å velge én dose som ga litt økning i lokomotorisk aktivitet, én dose som ga 50% av maksimal aktivitet og én dose som ga maksimal lokomotorisk atktivitet.

Mus som ble injisert med 2,5 mg/kg 3-MEC, metkatinon,  $\alpha$ -PiHP eller  $\alpha$ -PVP ble lagt i isoflurananestesi etter 238 min for uttak av blod og hjerne ved 240 min. Dette vevet ble brukt i farmakokinetikkstudien. For nærmere beskrivelse, se kap. 2.7.1 Uttak av blod og hjerne. Alle øvrige dyr som inngikk i temperaturstudien ble avlivet ved nakkestrekk etter endt forsøk.

## 2.7 Farmakokinetikkstudie

For å studere farmakokinetikken til 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP, samt referansestoffene metkatinon og  $\alpha$ -PVP, ble blod og hjerne tatt ut ved ulike tidspunkt etter rusmiddelinjeksjon og analysert for konsentrasjon av rusmiddel ved hjelp av væskechromatografi-tandem massespektrometri. Musene ble veid for å beregne volumet av injeksjonsløsning (10 mL/kg). Musene fikk en s.c. injeksjon med 2,5 mg/kg av enten 3-MEC, metkatinon  $\alpha$ -PiHP eller  $\alpha$ -PVP. Musene ble deretter plassert i hvert sitt bur med strø og nestingmateriale inntil tidspunktet for uttak av blod og hjerne, som var 5, 15, 30, 60, 120 og 240 min etter injeksjon.

### 2.7.1 Uttak av blod og hjerne

Blodprøver ble tatt ved tomtapping fra hjertet under isoflurananestesi. To min før tidspunkt for uttak av blod- og hjerneprøver ble musen plassert i et induksjonskammer med 2,5–3 % isofluran og 800 mL/min O<sub>2</sub>. Etter at musen hadde falt til ro, ble den lagt på ryggen med hodet inn i en induksjonsmaske (2,5–3 % isofluran, 800 mL/min O<sub>2</sub>). Tilbaketrekningsrefleks ble sjekket som tidligere beskrevet i kap. 2.6.1 Implantering av temperatursensor. Ved fravær av refleks ble musen ansett å være tilstrekkelig anestesert.

Huden på brystet ble klippet opp for å lettere kunne se hjertets plassering (figur 2.4).

Engangssprøyter (1 mL, 25 G kanyle) ble forhåndsfylt med 20  $\mu$ L heparin (100 IE/mL) i dødvolumet for å hindre koagulering av blodet etter uttak. Sprøytene ble brukt til å tappe ca. 300–500  $\mu$ L blod fra hjertet til hvert dyr. Blodet ble umiddelbart overført til to eppendorfrør plassert på is, hvorav 100  $\mu$ L ble pipettert over til hvert plastrør. Umiddelbart etter uttak av blodprøve ble musen avlivet ved nakkestrekk. Hjernen ble dissekert ut, lagt på aluminiumsfoliedekket is og delt sagittalt i høyre og venstre cerebrum, som ble overført til hvert sitt eppendorfrør. Blodprøvene og hjernehalvdelen ble umiddelbart frosset ned på

tørris. Prøvene ble oppbevart og fraktet på tørris til Seksjon for rusmiddelforskning samme dag, hvor de ble oppbevart ved -80 °C fram til de ble analysert.



**Figur 2.4** Uttak av blod fra hjertet til en mus som ligger i isoflurananestesi. Huden på brystet ble klippet opp for å lettere kunne finne hjertets plassering. En sprøyte forhåndsfylt med 20  $\mu\text{L}$  heparin (100 IE/mL) ble brukt til å tappe 300–500  $\mu\text{L}$  fra hjertet til hvert dyr. Heparin ble tilsatt sprøyten for å unngå koagulering av blodet.

### 2.7.2 Homogenisering av hjerne

Høyre cerebrum ble benyttet til konsentrasjonsmålinger. Hver cerebrum ble veid og deretter homogenisert i iskald 5 mM ammoniumformatløsning med pH 3,1 (4 mL tilsatt per gram hjerne) med en knivhomogenisator (IKA<sup>®</sup> T10 Basic Ultra-Turrax<sup>®</sup>) (5–8 sek på hastighet 4). Homogenatet ble overført til to eppendorfrør, hvorav 50  $\mu\text{L}$  ble pipettert over til i hvert rør og umiddelbart fryst i flytende nitrogen. Prøvene ble oppbevart ved -80 °C fram til prøveopparbeidelse påfølgende dag.

### 2.7.3 Prøveopparbeidelse før UHPLC-MS/MS

I prøveopparbeidelsen ble væske-væskekstraksjon benyttet for å ekstrahere rusmidlene fra blod og hjernevev. Det ble benyttet 100  $\mu\text{L}$  blod og 50  $\mu\text{L}$  hjernehomogenat til prøveopparbeidelsen.

Prøver med ueksponert blod eller hjernehomogenat (nullprøver) ble inkludert i prøveopparbeidelsen for å kunne oppdage interferens fra matrikskomponenter i prøvene (58). Standardløsninger som inneholdt kjent konsentrasjon av rusmidlene ble brukt til å lage en standardkurve for å kunne kvantifisere mengde rusmiddel i prøvene (58). Kontrollprøver ble brukt for å kvalitetssikre at standardkurven var korrekt. Standard- og kontrollprøver ble tilsatt internstandard (IS) for å korrigere for analytiske feil f.eks variasjon i injeksjonsvolum eller tap av prøve i prøveopparbeidelsen (58). Ved å analysere kromatogrammene fra standardene ble topparealforholdet mellom IS og analyttene beregnet (58). Dette forholdet ble plottet som en funksjon av konsentrasjonen og brukt til å bestemme konsentrasjonen av rusmidlene i prøvene (58).

Standard-, kontroll- og nullprøver ble inkludert i hver serie med prøver. Standarder, kontroller og IS ble løst i metanol:vann (1:1, v:v) og oppbevart ved -4 °C i maksimalt 5 uker. I prøveopparbeidelsen av både blod og hjernehomogenat ble 50 µL av 8–9 romtempererte standarder (4–26010 nM) og 4 kontroller (6–8000 nM) benyttet. Se vedlegg B for konsentrasjoner av standarder- og kontrolløsninger. For å kompensere for volum fra IS ble nullprøver ble tilsatt ulikt volum av metanol:vann (1:1, v:v), henholdsvis 75 µL i nullprøve uten IS og 50 µL i nullprøve med IS.

Standard-, kontroll- og nullprøver ble tilsatt 100 µL blod fra ueksponert mus eller rotte, eller 50 µL hjernehomogenat fra ueksponert mus for å ha de samme betingelsene som prøvene. Innsamlet blod og hjernehomogenat ble tint i kaldt vann og oppbevart på is fram til ekstraksjonen. For å kompensere for volum av tilsatt standard eller kontroll-løsning, ble de tinte prøvene tilsatt 50 µL metanol:vann (1:1, v:v). Det ble tilsatt 25 µL IS (10,06 µM metkatinon d<sub>3</sub> og 10 µM α-PVP d<sub>8</sub>) til alle prøver, bortsett fra nullprøve uten IS. Innholdet i rørene ble blandet i en multivortexer (VX-2500) i 10 sek. Det ble tilsatt 100 µL 0,2 M ammoniumkarbonatbuffer (pH 9,3) i alle rør. Rørene ble korket og ristet i 10 sek på multivortexer (VX-2500).

Ekstraksjonen ble initiert ved å tilsette 1,2 mL etylacetat:heptan (4:1,v:v) i alle rør. Rørene ble korket, ristet på multivortexer (VX-2500) i 10 sek og satt på en vippemaskin i 10 min. Prøvene ble deretter sentrifugert (Beckman Coulter sentrifuge, X15-R) i 5 min ved 4750 rpm (3600 x g) og 4 °C. Deretter ble 1000 µL av supernatanten (organisk fase) overført til glassrør (5 mL) før inndamping til tørrhet under en strøm av nitrogen (1,5 L/min) ved 40 °C i 30 min.



For å unngå kontaminering av inndamper (Turbovap®) ble det tilsatt 10 µL 0,01 % HNO<sub>3</sub> i alle rør før inndamping. Prøver, standarder og kontroller ble reløst i 500 µL MeOH:10 mM ammoniumformatbuffer med pH 3,1 (10:90, v:v). Rørene ble korket og ristet på multivortexer i 2 min før de ble sentrifugert (Beckman Coulter X15-R) ved 4750 rpm (3600 x g) i 5 min og 4 °C. Supernatanten (250 µL) ble overført til autosamplør (300 µL) og analysert som beskrevet i kap. 2.7.4 Konsentrasjonsbestemmelse med UHPLC-MS/MS.

## 2.7.4 Konsentrasjonsbestemmelse med UHPLC-MS/MS

Konsentrasjonsbestemmelse av 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP, samt referansestoffene metkatinon og  $\alpha$ -PVP, i blod og hjernevev ble analysert ved hjelp av væskrokromatografi (Acquity™ UHPLC-system) koblet til et tandem massespektrometer (Xevo-TQS, Waters, Milford, USA).

Analyttene 3-MEC, metkatinon  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP ble først separert i UHPLC-systemet, og ionisert, detektert og kvantifisert i MS/MS-systemet.

Analyttene ble separert ved hjelp av en BEH C18-kolonne (2,1 x 100 mm) med 1,7 µm partikkelstørrelse og gradienteluring, hvor sammensetningen av mobilfasen gradvis endret seg i løpet av analysen. Elueringen varte i totalt 8 min og gradienten bestod av to mobilfaser: 10 mM ammoniumformatbuffer med pH 3,1 (mobilfase A) og MeOH (mobilfase B). Sammensetningen av mobilfasen er beskrevet i tabell 2.3. Prøvene ble analysert med mobilfasehastighet på 0,5 mL/min, kolonnetemperatur 60 °C og et injeksjonsvolum på 0,5 µL per prøve.

**Tabell 2.3** Sammensetning av mobilfase A (% 10 mM ammoniumformatbuffer) og B (% metanol) ved gradienteluring.

Tid (min)	Mobilfase A (%) ( 10 mM ammoniumformatbuffer)	Mobilfase B (%) (MeOH)
0	90	10
0,1	90	10
0,6	80	20
1,1	74	26
2,6	74	26

5,0	0	100
6,8	0	100
7,0	90	10

En multippel reaksjonsmonitoreringsanalyse (MRM) ble brukt i MS/MS-analysen. Analyttene ble positivt ladet med elektroprayonisering (ESI+) og de fragmenterte ionene ble selektert og detektert ved hjelp av en trippelkvadrupol. En trippelkvadrupol inneholder to masseanalytatorer og en kollisjonscelle (59) s.153. I den første masseanalytatoren blir forløperionet selektert og sendt videre til kollisjonscellen, som fragmenterer forløperionet til fragmentioner (59) s. 153. Fragmentionene ble selektert på nytt i den andre masseanalytatoren og detektert (59) s. 154. Overgangen fra forløperion til fragmention for hvert rusmiddel er beskrevet nedenfor.

3-MEC, metkatinon,  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP hadde en retensjonstid på henholdsvis 2,20, 1,29, 3,73 og 2,78 min.

Overgangene for 3-MEC var:  $m/z$  192,2 > 174,1 (cone-spenning (cv): 22 V, kollisjonsenergi (ce): 12 eV);  $m/z$  192,2 >145,0 (cv: 22 V, ce: 20 eV) og  $m/z$  192,2 >144,0 (cv: 22 V, ce: 25 eV).

Overgangene for metkatinon var:  $m/z$  164,1 > 146,1 (cv: 22 V og ce: 8 eV);  $m/z$  164,1 > 131,1 (cv: 22 V, ce: 18 eV) og  $m/z$  164,1 > 130,0 (cv: 22 V, ce: 30 eV)

Overgangene for  $\alpha$ -PiHP var:  $m/z$  246,2 > 140,1 (cv: 36 V, ce: 20 eV);  $m/z$  246,2 > 105,0 (cv: 36 V, ce: 26 eV) og  $m/z$  246,2 > 91,10 (cv: 36 V, ce: 20 eV).

Overgangene for  $\alpha$ -PVP var:  $m/z$  232,2 > 161,1 (cv: 36 V, ce: 18 eV);  $m/z$  232,2 > 105,0 (cv: 36 V, ce: 26 eV) og  $m/z$  232,2 > 91,1 (cv: 36 V, ce: 20 eV)

Innstillingene til MRM var som følger: kapillærspenning på 1000 V, ioneblokktemperatur på 150 °C, desolvateringstemperatur på 500 °C, cone-gasstrøm på 300 L/time og desolvateringsgasstrøm på 1000 L/time.

Programvaren MassLynx Mass Spectrometry Software versjon 4.1 (Waters, Milford, USA) ble brukt til å kvantifisere rusmiddelkonsentrasjonene ( $\mu$ M) i blod og hjernehomogenat.

Konsentrasjoner av 3-MEC, metkatinon  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP ble regnet om til henholdsvis ng per mL blod og ng per g hjernevev ved de ulike tidspunktene for uttak. Farmakokinetiske parametere for 3-MEC, metkatinon,  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP i blod og hjernevev ble beregnet i Microsoft® Office Excel versjon 16.71 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Maksimal konsentrasjon ( $C_{\max}$ ) og tidspunkt for  $C_{\max}$  ( $T_{\max}$ ) ble funnet ut ifra de eksperimentelle dataene. Arealet under konsentrasjonskurvene ble beregnet med trapesmetoden fra tid 0 til uendelig ( $AUC_{0-\infty}$ ). Halveringstiden ( $t_{1/2}$ ) ble funnet ved stigningskonstanten ( $k$ ):  $\ln 2/k$ . Distribusjonsvolumet ( $V_d$ ) ble beregnet ut fra gitt dose delt på konsentrasjonen ved 5 min ( $C_0$ ).

## 2.8 Nevrotransmitteropptak i synaptosomer *in vitro*

For å studere virkningsmekanismen til 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP, samt referansestoffene metkatinon og  $\alpha$ -PiHP, ble reopptaket av DA, NA og 5-HT undersøkt i synaptosomer. Synaptosomer er avsnørte nerveterminaler som dannes ved homogenisering av hjernevev og flere påfølgende sentrifugeringstrinn (60, 61, 62). Ved homogenisering rives nerveterminalene av aksoner og dendritter (61, 62, 63). Nerveterminalene vil deretter lukke seg spontant til sfæriske partikler (62, 63). Synaptosomer inneholder alle bestanddeler til en pre- eller post-synaptisk nerveterminal, som vesikler og organeller som f.eks mitokondrier (61, 63). *In vitro*-studier i synaptosomer kan brukes for å få informasjon om hvilke monoaminer som påvirkes av syntetiske katinoner (25).

Synaptosomer ble isolert basert på framgangsmåten beskrevet av Gray and Whitaker (60) og Tuv et al. (64).

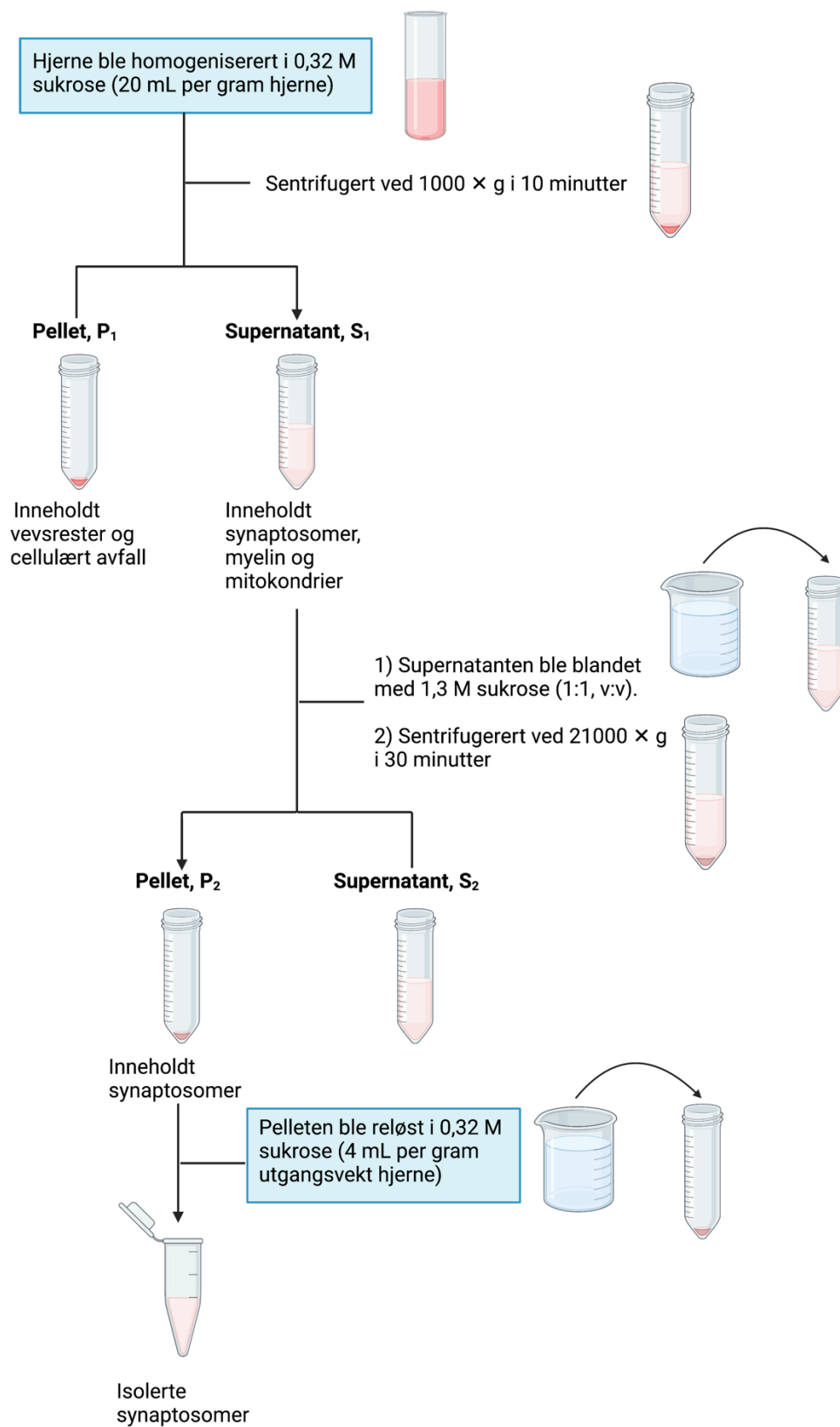
Innledningsvis ble det utført forsøk med ulike mengder hjernevev for å velge den konsentrasjonen av hjernehomogenat som ga høyest mulig spesifikt opptak og dermed lavest mulig uspesifikt opptak. Dette ble gjort for å sikre at resultatene viste spesifikt opptak gjennom monoamintransportørene. Se vedlegg C for linearitet mellom vevkonsentrasjoner og opptak.

### 2.8.1 Isolering av synaptosomer fra musehjerne

Hannmus (C57BL/6JRj) (8-15 uker) ble avlivet ved nakkestrekk. Umiddelbart etter avlivning ble cerebrum dissekert ut og nedkjølt på is dekket med aluminiumsfolie. Hjernehomogenat og

alle kjemikalieløsninger ble oppbevart på is under hele forsøket, og synaptosomene ble brukt i forsøk senest 1 time etter uttak av hjerne. For skjematisk framstilling av protokollen for isolering av synaptosomer, se figur 2.5.

Cerebrum ble veid og deretter homogenisert i iskald 0,32 M sukrose (20 mL per gram hjerne). Cerebrum ble homogenisert ved hjelp av en glass-teflonhomogenisator (IKA Eurostar power-b)(10–12 strøk på 700 rpm). Homogenatet ble overført til 50 mL sentrifugerør og sentrifugert (Beckman Coulter Avanti J- 30I) ved  $1000 \times g$  og  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  i 10 min for å separere synaptosomer, myelin og mitokondrier fra cellekjerner og cellulært avfall (60). Supernatanten med blant annet myelin ( $S_1$ ) ble overført til et nytt rør og volumet ble målt. Supernatanten ble deretter blandet med 1,3 M iskald sukrose i forholdet 1:1 (v:v) for å få en løsning med sluttkonsentrasjon på 0,8 M sukrose (65). Løsningen ble sentrifugert ved  $21000 \times g$  i 30 min og  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  for å få en pellet ( $P_2$ ) uten myelin (65). Supernatanten ( $S_2$ ) ble helt forsiktig av umiddelbart etter sentrifugering. Pelleten ( $P_2$ ) ble deretter resuspendert i iskald 0,32 M sukrose (4 mL per gram utgangsvekt hjerne).



**Figur 2.5** Skjematisk framstilling av protokollen for isolering av synaptosomer. Figuren er laget i BioRender.com.

## 2.8.2 Monoaminopptak *in vitro*

For å undersøke effekten av 3-MEC, metkatinon,  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP på reopptak via dopamintransportørene (DAT), noradrenalintransportørene (NAT) og serotonintransportørene (SERT), ble henholdsvis radioaktivt merket dopamin ( $[^3\text{H}]\text{-DA}$ ), noradrenalin ( $[^3\text{H}]\text{-NA}$ ) og serotonin ( $[^3\text{H}]\text{-5-HT}$ ) benyttet som substrat. Studier av monoaminopptak var basert på metodene til Rothman et al. (19, 66) og Bogen et al. (67).

Ved DA- og NA-opptak ble synaptosomer (20  $\mu\text{L}$ ) tilsatt hvert rør med tris-krebs-buffer (450  $\mu\text{L}$ ; 10 mM Tris HCl, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1,2 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 10 mM glukose, 1,2 mM  $\text{CaCl}_2$ ; justert til pH 7,4) med ulike konsentrasjoner av rusmidlene (5  $\mu\text{L}$ ). Effekten av 3-MEC (0,05–25  $\mu\text{M}$ ), metkatinon (0,001–2,5  $\mu\text{M}$ ),  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP (0,001–2,5  $\mu\text{M}$ ) på DA- og NA-opptak ble studert.

Ved opptak av 5-HT ble prøvene behandlet på nøyaktig samme måte som prøvene ved DA- og NA-opptak, bortsett fra at det ble tilsatt et høyere volum av rusmidler for å oppnå høy nok konsentrasjon i noen av rørene. Det ble tilsatt 5,81  $\mu\text{L}$  3-MEC, 6,25  $\mu\text{L}$  metkatinon, 3,52  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -PiHP og 3,33  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -PVP for å få en konsentrasjon på 500  $\mu\text{M}$  i rørene. Det ble tilsatt 6,67  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -PVP for å få en konsentrasjon på 1000  $\mu\text{M}$ .

Kontrollrør tilsatt monoaminreopptakshemmer ble inkludert i forsøket for å måle uspesifikt opptak, og kontrollrør uten rusmiddel ble inkludert for måle maksimalt monoaminopptak. For å måle uspesifikt opptak av DA, NA og 5-HT ble henholdsvis DAT-hemmeren benztropinmesylat (10  $\mu\text{M}$ ), NAT-hemmeren reboksetinmesylat (100  $\mu\text{M}$ ), og SERT-hemmeren fluoksetin HCl (50  $\mu\text{M}$ ) tilsatt. Alle kontrollrør ble behandlet på nøyaktig samme måte som prøvene.

Prøvene ble preinkubert ved 25 °C i 15 min på ristevannbad (Grant GLS Aqua 12 Plus). For å starte opptaket ble radioaktivt merket substrat tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 6,6 nM  $[^3\text{H}]\text{-DA}$  (0,125  $\mu\text{Ci}$ ), 4,6 nM  $[^3\text{H}]\text{-NA}$  (0,125  $\mu\text{Ci}$ ), eller 7,5 nM  $[^3\text{H}]\text{-5-HT}$  (0,125  $\mu\text{Ci}$ ) i totaltvolum på 500  $\mu\text{L}$ . Prøvene ble inkubert videre på vannbad ved 25 °C i 9 min før reaksjonen ble stoppet ved å tilsette 4 mL iskald stoppløsning (0,15 M NaCl med 0,05% (w/v) bovint serumalbumin). Prøvene ble umiddelbart filtrert gjennom et Whatman GF/B-filter (25 mm) i en Millipore-vakuummaskin og skylt ytterligere tre ganger med 4 mL stoppløsning. Filtrene ble overført til polyetylenrør (5 mL) og tilsatt 4 mL UltimaGold™ tellervæske og

ristet i 3 min. Radioaktiviteten i prøvene ble målt i en Scintillasjonsteller (Perkin Elmer Tri-carb 2810TR).

Alle prøver ble utført i duplikater og forsøkene ble gjentatt i hjernehomogenat fra 4–5 mus for hvert monoamin (DA, NA og 5-HT).

Spesifikt opptak av DA, NA og 5-HT ble beregnet ved å trekke fra uspesifikt opptak (kontrollprøver tilsatt monoaminreopptakshemmer) fra det totale opptaket i prøvene. Spesifikt opptak i prøver som var tilsatt rusmiddel ble regnet om til prosentvis opptak av kontrollprøver uten rusmiddel for de respektive substratene DA, NA og 5-HT. GraphPad Prism versjon 9.4.1 (Dotmatics, San Diego, USA) ble brukt til å beregne  $IC_{50}$ -verdier.  $IC_{50}$ -verdien forteller hvilken konsentrasjon som kreves for at opptaket av neurotransmitter blir hemmet med 50 % (68)

## 2.9 Statistikk og dataanalyse

Alle data er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  standardfeil (SEM), bortsett fra endring i kroppstemperatur som er oppgitt med gjennomsnitt + SEM og lokomotorisk aktivitet som framstilles uten SEM i den grafiske framstillingen for å kunne skille de ulike kurvene fra hverandre.

Alle statistiske analyser ble utført i IBM® SPSS® Statistics versjon 29 (IBM, New York, USA). Enveis variansanalyse (ANOVA) med Dunnett's post hoc-test ble utført for å sammenligne de eksponerte gruppene for 3-MEC, metkatinon,  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP mot kontrollgruppen. For å analysere totallokomosjon,  $E_{max}$ , og temperaturendring ble derfor enveis ANOVA benyttet. T-test for to uavhengige utvalg ble benyttet for å undersøke om det var en statistisk signifikant forskjell mellom to eksponerte grupper, henholdsvis 3-MEC og metkatinon, samt  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP. Tosidige tester ble utført i alle analysene. P-verdier under 0,05 ble ansett som statistisk signifikante.

Microsoft® Office Excel versjon 16.71 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) ble brukt til å beregne verdier og lage alle grafiske framstillinger.

# 3 Resultater

## 3.1 Lokomotorisk aktivitet

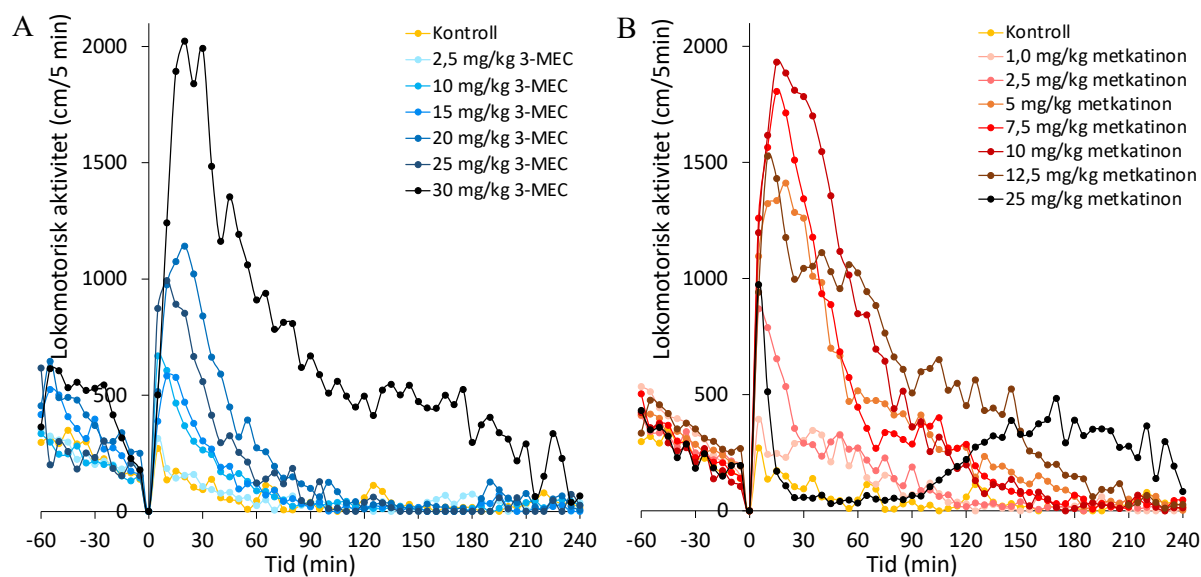
### 3.1.1 Effekt av 3-MEC og metkatinon

Lokomotorisk aktivitet ble studert i mus etter én s.c. injeksjon av 2,5–30 mg/kg 3-MEC, 1–25 mg/kg metkatinon og NaCl (kontroll) i mus. Både 3-MEC og metkatinon førte til en umiddelbar doseavhengig økning i lokomotorisk aktivitet (figur 3.1).

$T_{max}$  var 5–20 min etter injeksjon av de ulike dosene med 3-MEC og metkatinon. Etter 35-90 min var aktiviteten til dyrene som ble injisert med 2,5–25 mg/kg 3-MEC tilbake på samme nivå som kontrolldyrene, mens musene som fikk den høyeste dosen (30 mg/kg) løp mer enn kontrolldyrene helt fram til ca. 200 min (figur 3.1 A).

Dyrene som ble injisert med 1–10 mg/kg metkatinon var på det samme aktivitetsnivået som kontrolldyrene etter 85–170 min (figur 3.1 B). Administrasjon av 12,5 mg/kg og 25 mg/kg metkatinon ga to topper i lokomosjonskurven, hvor den høyeste kom etter 5 min. Musene som fikk 12,5 mg/kg metkatinon hadde en ny topp etter 55 min, men var tilbake på samme aktivitetsnivå som kontrolldyrene etter 190 min. Musene som fikk den høyeste dosen (25 mg/kg) hadde en økning i aktivitet fra 90 min som holdt seg høyere enn kontrolldyrene til forsøket ble avsluttet.

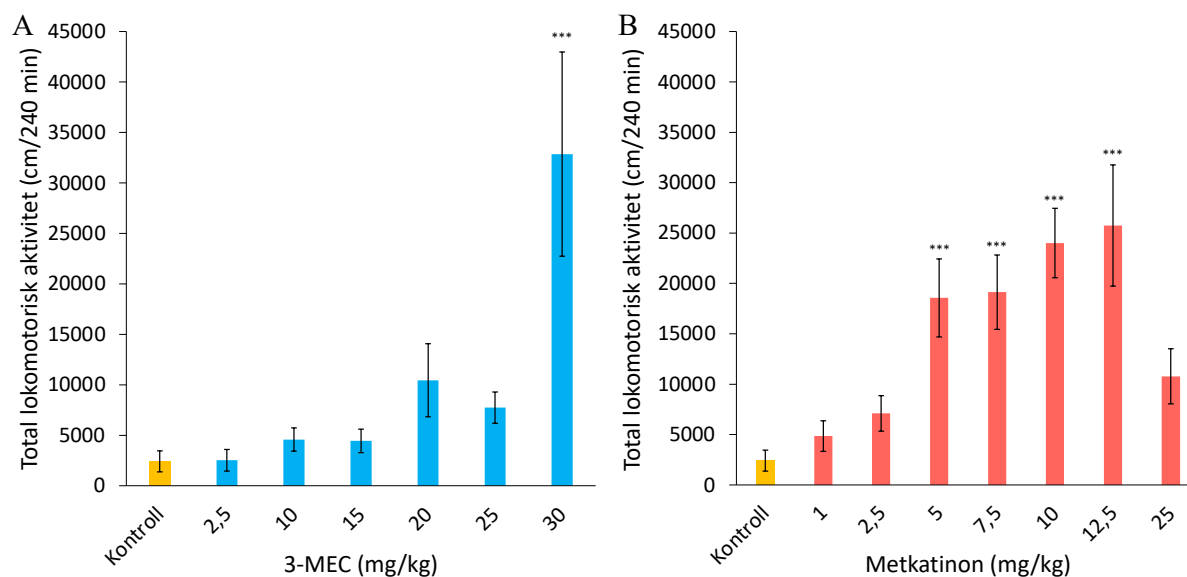




**Figur 3.1** Lokomotorisk aktivitet i mus etter injeksjon av **A)** 3-MEC og **B)** metkatinon. Lokomotorisk aktivitet (cm/5 min) ble registrert i 240 min etter injeksjon av 2,5–30 mg/kg 3-MEC, 1–25 mg/kg metkatinon og NaCl (kontroll). Musene ble habituert i kamrene i 60 min før de ble injisert ved t=0. Data er framstilt som gjennomsnitt, n=5–8, med unntak av dosene 25 og 30 mg/kg 3-MEC som ble studert i henholdsvis 3 og 4 mus, og 5 mg/kg metkatinon som ble studert i 9 mus. Kurvene er framstilt uten SEM for å kunne skille de ulike kurvene fra hverandre.

Figur 3.2 viser den totale lokomotoriske aktiviteten til musene fra tidspunktet for injeksjon av 2,5–30 mg/kg 3-MEC, 1–25 mg/kg metkatinon, og NaCl til 240 min. Total lokomotorisk aktivitet etter 3-MEC-eksponering var høyest etter 30 mg/kg ( $32857 \pm 10116$  cm/240 min), og var signifikant høyere enn for kontrolldyrene ( $2413 \pm 1041$  cm/240 min,  $p < 0,001$ , figur 3.2 A). Administrasjon av 10–25 mg/kg 3-MEC førte også til noe økning i lokomotorisk aktivitet, men denne økningen var ikke signifikant forskjellig fra kontroll.

Den totale lokomotoriske aktiviteten etter administrasjon av 5 mg/kg ( $18560 \pm 3874$  cm/240 min), 7,5 mg/kg ( $19131 \pm 3692$  cm/240 min), 10 mg/kg ( $24010 \pm 3445$  cm/240 min) og 12,5 mg/kg ( $25746 \pm 6015$  cm/240 min) metkatinon var signifikant høyere enn for kontrolldyrene ( $2413 \pm 1041$  cm/240 min,  $p < 0,001$ , figur 3.2 B). Den høyeste totale aktiviteten ble målt etter administrasjon av 12,5 mg/kg metkatinon. Det var ingen signifikant forskjell mellom 25 mg/kg metkatinon og kontroll.



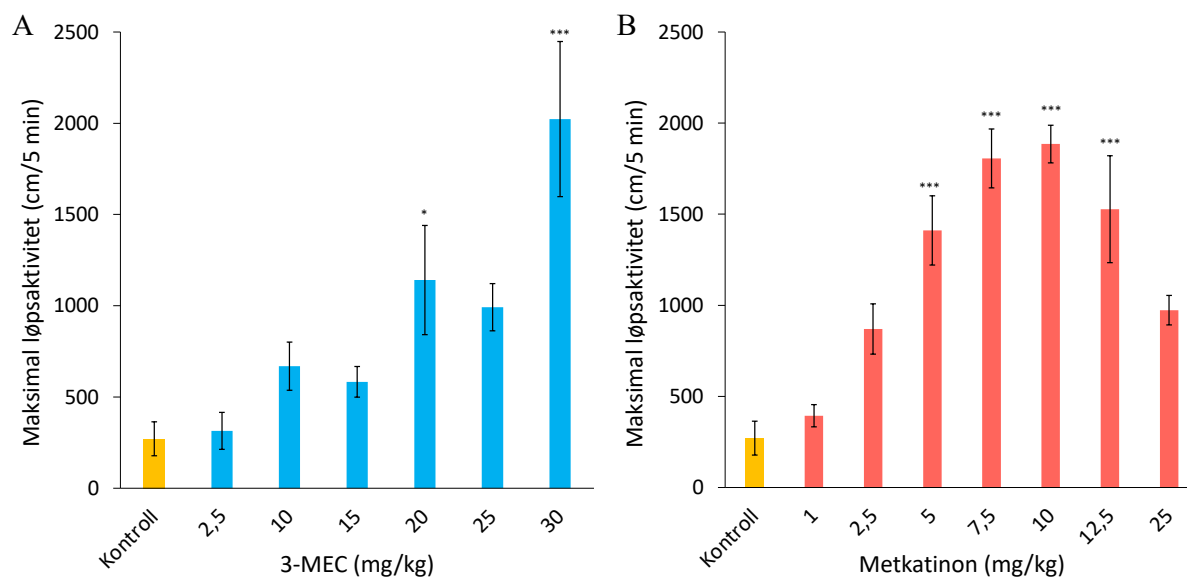
**Figur 3.2** Total lokomotorisk aktivitet i mus etter injeksjon av **A)** 3-MEC og **B)** metkatinon. Total lokomotorisk aktivitet (cm/240 min) ble beregnet fra tidspunktet for injeksjon til 240 min etter injeksjon av 2,5–30 mg/kg 3-MEC, 1–25 mg/kg metkatinon og NaCl (kontroll). Data er framstilt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 5-8$ , med unntak av dosene 25 og 30 mg/kg 3-MEC som ble studert i henholdsvis 3 og 4 mus, og 5 mg/kg metkatinon som ble studert i 9 mus. Signifikante forskjeller i total lokomotorisk aktivitet for de ulike dosene sammenlignet med kontroll er vist med asterisk(\*) over søylene (\*\* $p < 0,001$ ). Statistiske analyser ble utført med enveis ANOVA etterfulgt av Dunnett's post-hoc test.

Figur 3.3 viser  $E_{max}$  etter injeksjon av 2,5–30 mg/kg 3-MEC, 1–25 mg/kg metkatinon og NaCl.

Eksponering for både 20 mg/kg ( $1141 \pm 299$  cm/5 min) og 30 mg/kg ( $2023 \pm 425$  cm/5 min) 3-MEC ga en signifikant høyere  $E_{max}$  sammenlignet med kontrolldyrene ( $271 \pm 93$  cm/5 min,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ) og ble målt etter 20 mg/kg og 30 mg/kg (figur 3.3 A).

Administrasjon av 30 mg/kg 3-MEC ga høyest  $E_{max}$ .

For metkatinon var  $E_{max}$  signifikant høyere enn for kontrolldyrene ( $271 \pm 93$  cm/5 min,  $p \leq 0,001$ ) etter administrasjon av 5 mg/kg ( $1411 \pm 190$  cm/5 min), 7,5 mg/kg ( $1806 \pm 162$  cm/5 min), 10 mg/kg ( $1885 \pm 103$  cm/5 min) og 12,5 mg/kg ( $1528 \pm 293$  cm/5 min), som ble målt etter henholdsvis 5, 20, 15, 20 og 10 min (figur 3.3 B). Høyest  $E_{max}$  ble målt etter administrasjon av 10 mg/kg metkatinon. En ytterligere økning av dosen til 12,5 eller 25 mg/kg metkatinon reduserte  $E_{max}$  sammenlignet med 10 mg/kg.



**Figur 3.3** Maksimal lokomotorisk aktivitet ( $E_{max}$ ) i mus etter injeksjon av **A)** 3-MEC og **B)** metkatinon.  $E_{max}$  (cm/5 min) ble beregnet for hver dose ut ifra 5 min-intervallet som ga den høyeste gjennomsnittlige registrerte aktiviteten etter injeksjon av 2,5–30 mg/kg 3-MEC, 1–25 mg/kg metkatinon og NaCl (kontroll). Data er framstilt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 5-8$ , med unntak av dosene 25 og 30 mg/kg 3-MEC som ble studert i henholdsvis 3 og 4 mus, og 5 mg/kg metkatinon som ble studert i 9 mus. Signifikante forskjeller i  $E_{max}$  ved de ulike dosene sammenlignet med kontroll er vist med asterisk(\*) over søylene (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). Statistiske analyser ble utført med enveis ANOVA etterfulgt av Dunnett's post-hoc test.

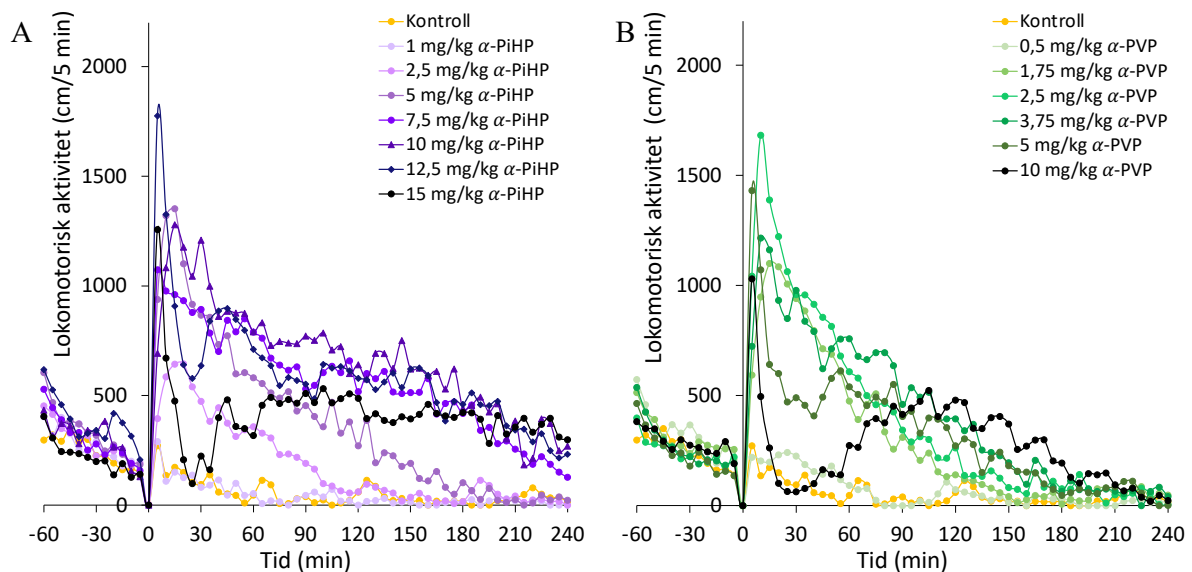
### 3.1.2 Effekt av $\alpha$ -PiHP og $\alpha$ -PVP

Lokomotorisk aktivitet ble studert i mus etter én s.c. injeksjon av 1–15 mg/kg  $\alpha$ -PiHP, 0,5–10 mg/kg  $\alpha$ -PVP og NaCl (kontroll). Både  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP førte til en umiddelbar doseavhengig økning i lokomotorisk aktivitet (figur 3.4).

$T_{max}$  var 5–20 min etter injeksjon av de ulike dosene  $\alpha$ -PiHP, mens  $T_{max}$  ble registrert 5–35 min etter injeksjon av  $\alpha$ -PVP.

Etter 55–170 min var aktiviteten til dyrene som ble injisert med 1–5 mg/kg  $\alpha$ -PiHP tilbake på samme nivå som kontrolldyrene, mens musene som ble injisert med dosene 7,5–15 mg/kg hadde fortsatt høyere aktivitet sammenlignet med kontrolldyrene etter 240 min (figur 3.4 A). Administrasjon av 12,5 mg/kg og 15 mg/kg  $\alpha$ -PiHP ga to topper i lokosjonskurvene: den første etter 5 min og den andre etter 45 min.

Etter eksponering for 0,5–3,75 mg/kg  $\alpha$ -PVP var den lokomotoriske aktiviteten tilbake på samme nivå som kontrolldyrene etter 60–190 min (figur 3.4 B). Administrasjon av 5 mg/kg og 10 mg/kg  $\alpha$ -PVP ga to topper i lokomosjonskurven hvor den høyeste var etter 5 min, og den andre etter henholdsvis 55 min og 100 min, og 3,5 mg/kg ga antydning til to topper. Aktiviteten til musene som fikk 5 mg/kg var tilbake på det samme nivået som kontrolldyrene etter 170 min, mens musene som fikk 10 mg/kg hadde et høyere aktivitetsnivå enn kontrolldyrene helt til 210 min.

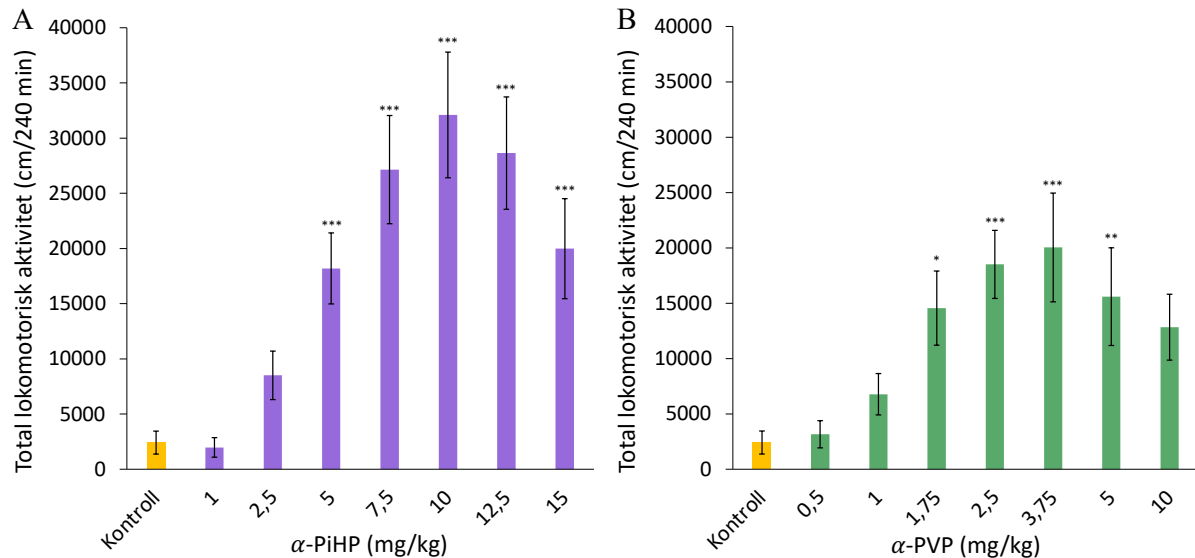


**Figur 3.4** Lokomotorisk aktivitet i mus etter injeksjon av **A)**  $\alpha$ -PiHP og **B)**  $\alpha$ -PVP. Lokomotorisk aktivitet (cm/5min) ble registrert i 240 min etter injeksjon av 1–15 mg/kg  $\alpha$ -PiHP, 0,5–10 mg/kg  $\alpha$ -PVP og NaCl (kontroll). Musene ble habituert i kamrene i 60 min før de ble injisert ved t=0. Data er framstilt som gjennomsnitt, n = 5–8. Kurvene er framstilt uten SEM for å kunne skille de ulike kurvene fra hverandre.

Figur 3.5 viser den totale lokomotoriske aktiviteten til musene fra tidspunktet for injeksjon av 1–15 mg/kg  $\alpha$ -PiHP, 0,5–10 mg/kg  $\alpha$ -PVP og NaCl til 240 min.

Total lokomotorisk aktivitet etter eksponering for 5 mg/kg ( $18194 \pm 3218$  cm/240 min), 7,5 mg/kg ( $27145 \pm 4904$  cm/240 min), 10 mg/kg ( $32101 \pm 5693$  cm/240 min), 12,5 mg/kg ( $28642 \pm 5092$  cm/240 min) og 15 mg/kg ( $19984 \pm 4532$  cm/240 min)  $\alpha$ -PiHP var signifikant høyere sammenlignet med kontrolldyrene ( $2413 \pm 1041$  cm/240 min,  $p < 0,001$ , figur 3.5 A). Den høyeste totale aktiviteten ble målt etter administrasjon av 10 mg/kg  $\alpha$ -PiHP.

Den totale lokomotoriske aktiviteten etter eksponering for 1,75 mg/kg ( $14557 \pm 3350$  cm/240 min), 2,5 mg/kg ( $18504 \pm 3075$  cm/240 min), 3,75 mg/kg ( $20035 \pm 4414$  cm/240 min) og 5 mg/kg ( $15592 \pm 5924$  cm/240 min)  $\alpha$ -PVP var signifikant høyere enn for kontrolldyrene ( $2413 \pm 1041$  cm/240 min,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , figur 3.5 B). Den høyeste totale aktiviteten ble registrert etter administrasjon av 3,75 mg/kg. Det var ingen signifikant forskjell mellom 10 mg/kg  $\alpha$ -PVP og kontroll.

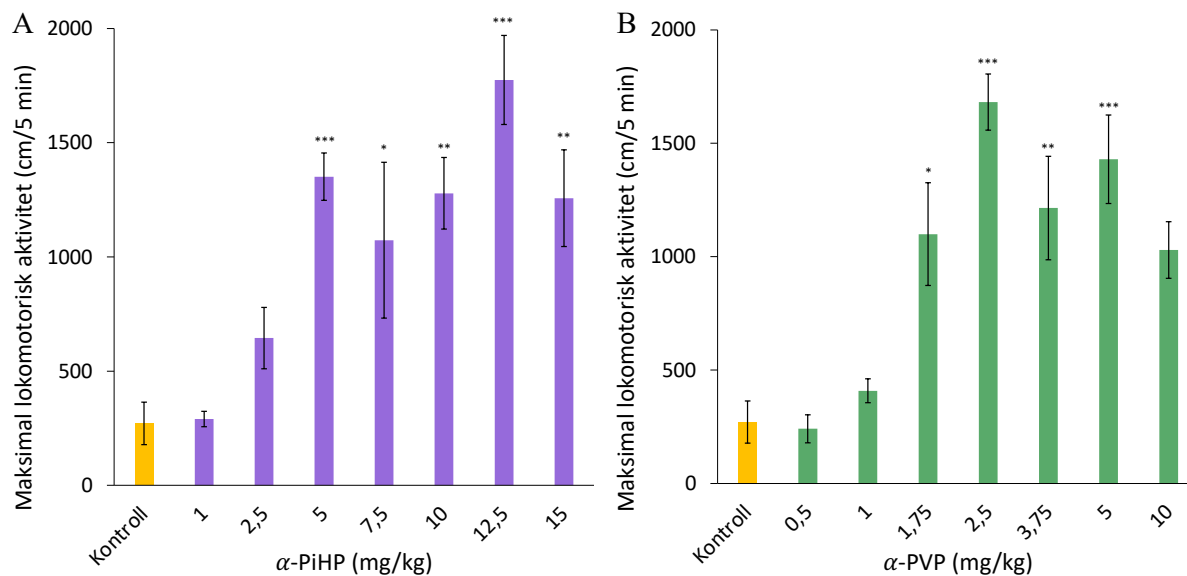


**Figur 3.5** Total lokomotorisk aktivitet i mus etter injeksjon av **A)**  $\alpha$ -PiHP og **B)**  $\alpha$ -PVP. Total lokomotorisk aktivitet (cm/240 min) ble beregnet fra tidspunktet for injeksjon til 240 min etter injeksjon av 1–15 mg/kg  $\alpha$ -PiHP, 0,5–10 mg/kg  $\alpha$ -PVP og NaCl (kontroll). Data er framstilt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 5$ –8. Signifikante forskjeller i total lokomotorisk aktivitet for de ulike dosene sammenlignet med kontroll er vist med asterisk (\*) over søylene (\* $p < 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). Statistiske analyser ble utført med enveis ANOVA etterfulgt av Dunnett's post-hoc test.

Figur 3.6 viser  $E_{\max}$  etter injeksjon av 1–15 mg/kg  $\alpha$ -PiHP, 0,5–10 mg/kg  $\alpha$ -PVP og NaCl.

For  $\alpha$ -PiHP var  $E_{\max}$  signifikant høyere enn for kontrolldyrene ( $271 \pm 93$  cm/5 min,  $p < 0,05$ ,  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,001$ ) etter administrasjon av 5 mg/kg ( $1350 \pm 104$  cm/5 min), 7,5 mg/kg ( $1073 \pm 341$  cm/5 min), 10 mg/kg ( $1279 \pm 157$  cm/5 min), 12,5 mg/kg ( $1775 \pm 195$  cm/5 min) og 15 mg/kg ( $1257 \pm 212$  cm/5 min), som ble målt etter henholdsvis 15, 5, 15, 5 og 5 min (figur 3.6 A). Høyest  $E_{\max}$  ble målt etter administrasjon av 12,5 mg/kg  $\alpha$ -PiHP. En økning av dose til 15 mg/kg  $\alpha$ -PiHP ga ingen ytterligere økning i  $E_{\max}$ .

For  $\alpha$ -PVP var  $E_{max}$  signifikant høyere enn for kontrolldyrene ( $271 \pm 93$  cm/5 min,  $p < 0,05$ ,  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,001$ ) etter administrasjon av 1,75 mg/kg ( $1100 \pm 227$  cm/5min), 2,5 mg/kg ( $1682 \pm 124$  cm/5 min), 3,75 mg/kg ( $1215 \pm 228$  cm/5 min) og 5 mg/kg ( $1430 \pm 195$  cm/5 min), som ble målt etter henholdsvis 15, 10, 10 og 5 min (figur 3.6 B). Høyest  $E_{max}$  ble målt etter eksponering for 2,5 mg/kg  $\alpha$ -PVP. En økning av dosen til 3,75 mg/kg  $\alpha$ -PVP eller høyere ga ingen ytterligere økning i  $E_{max}$ .



**Figur 3.6** Maksimal lokomotorisk aktivitet ( $E_{max}$ ) i mus etter injeksjon av **A)**  $\alpha$ -PiHP og **B)**  $\alpha$ -PVP.  $E_{max}$  (cm/5 min) ble beregnet for hver dose ut ifra 5-min-intervallet som ga den høyeste gjennomsnittlige aktiviteten etter injeksjon av 1–15 mg/kg  $\alpha$ -PiHP, 0,5–10 mg/kg  $\alpha$ -PVP og NaCl (kontroll). Data er framstilt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 5-8$ . Signifikante forskjeller i  $E_{max}$  for de ulike dosene sammenlignet med kontroll er vist med asterisk(\*) over søylene (\* $p < 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ). Statistiske analyser ble utført med enveis ANOVA etterfulgt av Dunnett's post-hoc test.

## 3.2 Stereotypisk adferd

Mens musene var i lokosjonskamrene, ble stereotypisk adferd observert ved 15 og 30 min. Stereotypisk adferd som ble registrert manuelt var unormal adferd som å rygge, gnage eller slikke på omgivelsene (vegg og gulv), samt bevegelse av hodet raskt fram og tilbake eller opp og ned. Det ble også observert unormal og hyppig repetitiv normaladferd som å reise seg på bakbena, snuse rundt i luften og overdrevent stell eller pussing. Alle de nevnte

observasjonene av stereotypisk adferd ble gjort ved økende doser av 3-MEC, metkatinon,  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP.

Mus som fikk  $\alpha$ -PiHP gnagde og slikket på vegg og gulv 15 og 30 min etter injeksjon av dosene 7,5, 12,5, og 15 mg/kg, mens noen mus også rygget etter administrering av 12,5 mg/kg.

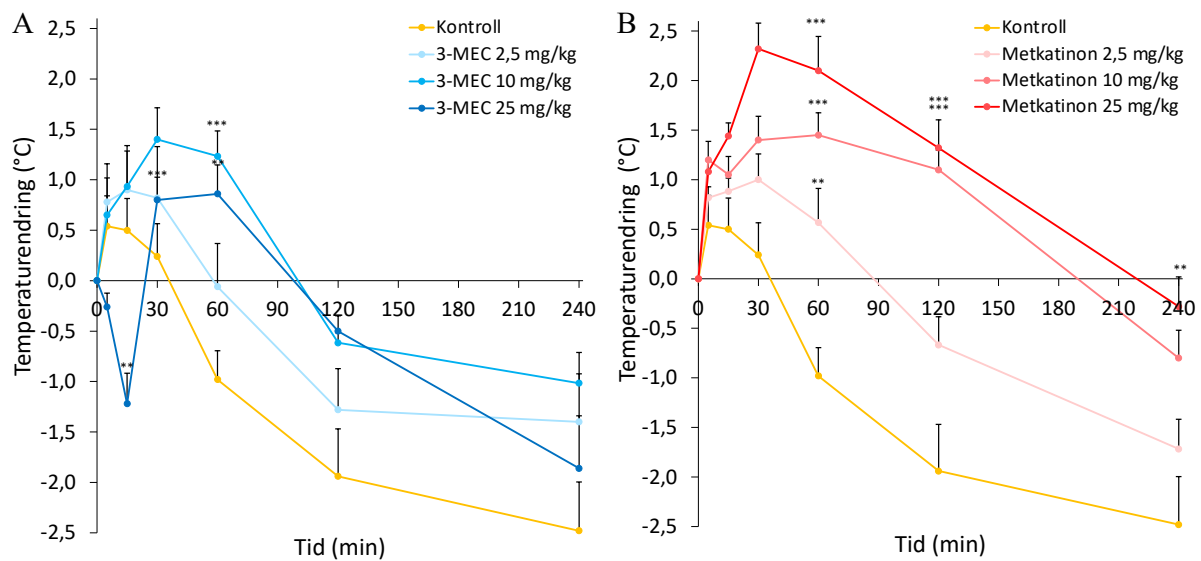
Noen mus gnagde på vegg og gulv 15 min etter injeksjon av 3,75 mg/kg  $\alpha$ -PVP. Ved eksponering for 5, 7,5 og 10 mg/kg  $\alpha$ -PVP gnagde samtlige mus på vegg og gulv etter 15 og 30 min. I tillegg ble det observert at noen mus som fikk 7,5 og 10 mg/kg  $\alpha$ -PVP rygget. For en fullstendig oversikt over registrert stereotypisk adferd, se vedlegg D.

### 3.3 Kroppstemperatur etter eksponering

#### 3.3.1 Effekt av 3-MEC og metkatinon

Figur 3.7 viser endring i musenes kroppstemperatur fra utgangstemperatur målt 5, 15, 30, 60, 120 og 240 min etter eksponering for 2,5, 10 og 25 mg/kg 3-MEC eller metkatinon, og NaCl. For kontrolldyrene ble det registrert en økning i temperatur umiddelbart etter eksponering, før kroppstemperaturen ble gradvis lavere enn utgangstemperaturen. Ved 60, 120 og 240 min var kroppstemperaturen i kontrolldyrene lavere enn utgangstemperaturen.

Eksponering for 25 mg/kg 3-MEC førte til en signifikant reduksjon i kroppstemperatur ved 15 min ( $1,2 \pm 0,3$  °C) sammenlignet med kontroll  $0,5 \pm 0,3$  °C,  $p < 0,01$ , figur 3.7 A). Ved 30 min var det en signifikant økning i kroppstemperatur ( $0,8 \pm 0,2$  °C) etter eksponering for 25 mg/kg 3-MEC, sammenlignet med kontroll ( $0,2 \pm 0,3$  °C,  $p < 0,001$ ). Ved 60 min og  $0,9 \pm 0,3$  °C var endring i kroppstemperatur signifikant høyere enn for kontrolldyrene, som hadde redusert kroppstemperatur sammenlignet med utgangstemperatur ved 60 min ( $1,0 \pm 0,3$  °C,  $p < 0,01$ ). Eksponering for 10 mg/kg 3-MEC ga også en økning i kroppstemperatur etter 60 min ( $1,2 \pm 0,3$  °C), som var signifikant forskjellig fra kontrolldyrene.



**Figur 3.7** Endringer i kroppstemperatur etter injeksjon av **A)** 3-MEC og **B)** metkatinon. Temperaturendring fra utgangstemperatur ( $t=0$ ) ble registrert ved 5, 15, 30, 60, 120 og 240 min etter injeksjon av 2,5, 10 og 25 mg/kg 3-MEC eller metkatinon eller NaCl (kontroll). Data er vist som gjennomsnitt + SEM for en mer oversiktlig framstilling,  $n = 5-6$ . Signifikante forskjeller i temperaturendring for de 3 dosene sammenlignet med kontroll er vist med asterisk (\*) over verdiene (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). Statistiske analyser ble utført med enveis ANOVA etterfulgt av Dunnett's post-hoc test.

Figur 3.7 B viser at jo høyere dose av metkatinon som ble administrert, desto større var endringen i kroppstemperatur. Ved 60 min var endringen i kroppstemperatur etter eksponering for 2,5 mg/kg ( $0,6 \pm 0,4$  °C), 10 mg/kg ( $1,5 \pm 0,2$  °C) og 25 mg/kg ( $2,1 \pm 0,3$  °C) metkatinon signifikant høyere enn i kontrolldyrene, som hadde redusert kroppstemperatur sammenlignet med utgangstemperatur ( $1,0 \pm 0,3$  °C,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ). Etter 120 min ga 10 mg/kg ( $1,1 \pm 0,2$  °C) og 25 mg/kg ( $1,3 \pm 0,3$  °C) metkatinon også en temperaturøkning som var signifikant høyere enn i kontrolldyrene, som hadde redusert kroppstemperatur sammenlignet med utgangstemperatur ( $1,9 \pm 0,5$  °C,  $p < 0,001$ ). Kroppstemperaturen var lavere enn utgangstemperaturen i alle gruppene ved 240 min.

### 3.3.2 Effekt av $\alpha$ -PiHP og $\alpha$ -PVP

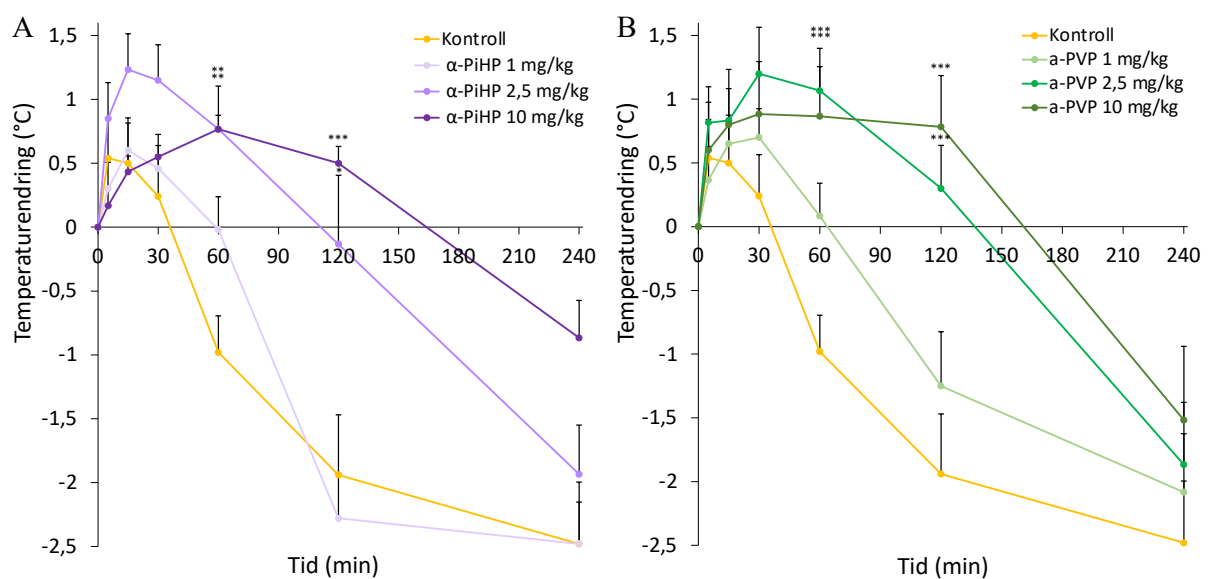
Figur 3.8 viser endring i musenes kroppstemperatur fra utgangstemperatur målt 5, 15, 30, 60, 120 og 240 min etter eksponering for 1, 2,5 og 10 mg/kg  $\alpha$ -PiHP eller  $\alpha$ -PVP, og NaCl.



Eksposering for 2,5 mg/kg førte til en signifikant endring i kroppstemperatur ved 60 min ( $0,8 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ) som var signifikant høyere

Administrasjon av 2,5 mg/kg ( $0,8 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ) og 10 mg/kg ( $0,8 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ )  $\alpha$ -PiHP ga en temperaturendring ved 60 min som var signifikant høyere enn for kontrolldyrene, som hadde redusert kroppstemperatur sammenlignet med utgangstemperatur ( $1,0 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $p < 0,01$ , figur 3.8 A). Eksposering for 2,5 mg/kg resulterte i en reduksjon i kroppstemperatur ved 120 min ( $0,1 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ), som var signifikant høyere enn i kontrolldyrene, som hadde redusert kroppstemperatur sammenlignet med utgangstemperatur ( $1,9 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $p < 0,05$ ).

Eksposering for 10 mg/kg ( $0,5 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) ga en endring i kroppstemperatur ved 120 min som var signifikant høyere enn i kontrolldyrene. Kroppstemperaturen var lavere enn utgangstemperaturen i alle gruppene ved 240 min.



**Figur 3.8** Endringer i kroppstemperatur fra utgangstemperatur etter eksponering for A)  $\alpha$ -PiHP og B)  $\alpha$ -PVP. Temperaturendring fra utgangstemperatur ble registrert ved 5, 15, 30, 60, 120 og 240 min etter s.c. injeksjon av 2,5, 10, og 25 mg/kg  $\alpha$ -PiHP eller  $\alpha$ -PVP og NaCl (kontroll). Data er framstilt som gjennomsnitt + SEM, for en mer oversiktlig framstilling,  $n = 5-6$ . Signifikante forskjeller i temperaturendring for de 3 dosene sammenlignet med kontroll er vist med asterisk (\*) over verdiene (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Statistiske analyser ble utført med enveis ANOVA etterfulgt av Dunnett's post-hoc test.

Eksposering for 2,5 mg/kg ( $1,1 \pm 0,3$  °C) og 10 mg/kg ( $0,9 \pm 0,4$  °C)  $\alpha$ -PVP ga en endring i kroppstemperatur ved 60 min som var signifikant høyere enn i kontrolldyrene, som hadde redusert kroppstemperatur sammenlignet med utgangstemperatur ( $1,0 \pm 0,3$  °C,  $p < 0,001$  figur 3.8 B). Eksposering for 2,5 mg/kg ( $0,3 \pm 0,3$  °C) og 10 mg/kg ( $0,8 \pm 0,4$  °C) ga en endring i kroppstemperatur etter 120 min som var signifikant høyere enn kontrolldyrene, som hadde redusert kroppstemperatur sammenlignet med utgangstemperatur ( $1,9 \pm 0,5$  °C,  $p < 0,001$ ). Kroppstemperaturen var lavere enn utgangstemperaturen i alle gruppene ved 240 min.

## 3.4 Farmakokinetikk i blod og hjernevev

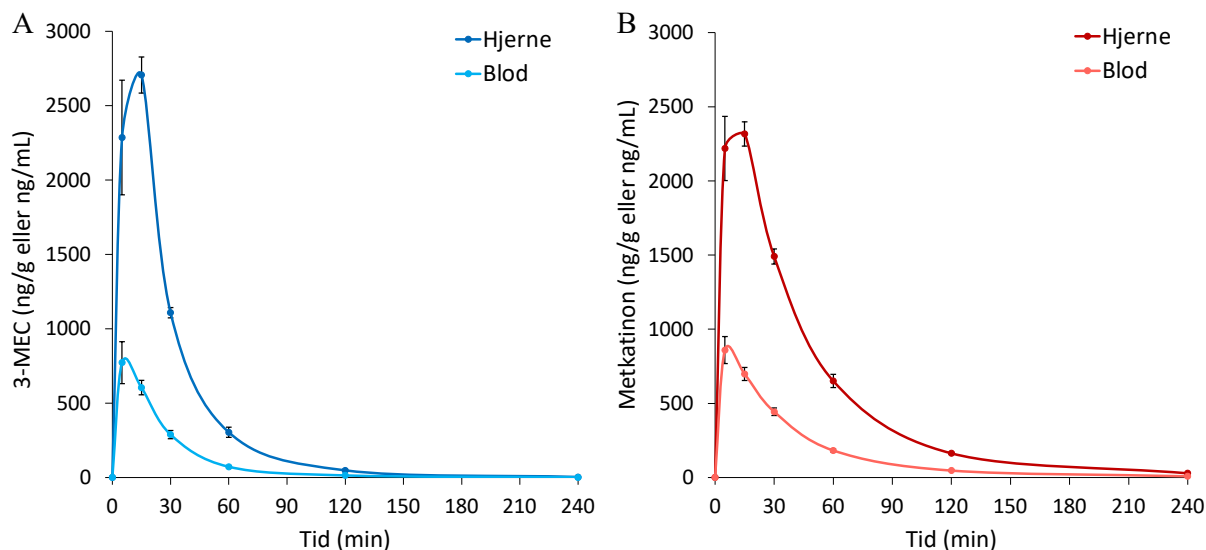
### 3.4.1 Konsentrasjonskurver for 3-MEC og metkatinon

Rusmiddelkonsentrasjoner ble målt i blod (ng/mL) og hjernevev (ng/g) tatt fra mus 5, 15, 30, 60, 120 og 240 min etter eksposering for 2,5 mg/kg 3-MEC eller metkatinon.

Figur 3.9 viser konsentrasjonskurvene for 3-MEC og metkatinon i blod og hjerne.  $C_{\max}$  for 3-MEC i blod ( $772 \pm 141$  ng/mL) ble målt 5 min etter administrasjon av 3-MEC, mens  $C_{\max}$  i hjernevev ( $2706 \pm 121$  ng/g) ble målt etter 15 min ( $T_{\max}$ , figur 3.9 A, tabell 3.1). Etter 120 min var 3-MEC nesten fullstendig eliminert fra blod og hjernevev.  $T_{1/2}$  til 3-MEC var 19 min i både blod og hjernevev.  $V_d$  var 81 mL og AUC var høyere i hjernevev ( $94298$  ng · min/g) sammenlignet med blodet ( $24461$  ng · min/mL) etter eksposering for 3-MEC.

$C_{\max}$  i blod ( $859 \pm 91$  ng/mL) etter eksposering for metkatinon ble målt etter 5 min, mens  $C_{\max}$  i hjernevev ( $2316 \pm 82$  ng/g) ble målt etter 15 min ( $T_{\max}$ , figur 3.9 B, tabell 3.1). Det var mindre enn 10 % av  $C_{\max}$  igjen i blod og hjerne 120 min etter eksposering for metkatinon.  $T_{1/2}$  til metkatinon var 27 min i blod og 29 min i hjerne.  $V_d$  var 73 mL i blod og AUC var høyere i hjernevev ( $125992$  ng · min/g) sammenlignet med blod ( $38403$  ng · min/mL).

$C_{\max}$  var henholdsvis 3,5 og 2,7 ganger høyere i hjernevev sammenlignet med blodet etter eksposering for henholdsvis 3-MEC og metkatinon (figur 3.9 A og B, tabell 3.1).



**Figur 3.9** Konsentrasjonskurver for **A)** 3-MEC og **B)** metkatinon i blod (ng/mL) og hjerne (ng/g). Rusmiddelkonsentrasjonene ble målt i blod og hjernevev som ble tatt ut 5, 15, 30, 60, 120 og 240 min etter én s.c. injeksjon av 2,5 mg/kg 3-MEC eller metkatinon. Data er framstilt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 6$ .

**Tabell 3.1** Farmakokinetiske parametere og variabler for 3-MEC og metkatinon i blod og hjerne. Det er ikke oppgitt spredningsmål på  $T_{max}$ , AUC,  $t_{1/2}$ ,  $V_d$  fordi beregningene ikke er basert på gjentatte målinger.

Farmakokinetiske parametere og variabler	3-MEC			Metkatinon		
	Blod	Hjernevev	Hjerne:blod	Blod	Hjernevev	Hjerne:blod
$C_{max}^a$ (ng/mL / ng/g)	772 $\pm$ 141	2706 $\pm$ 121	3,5	859 $\pm$ 91	2316 $\pm$ 82	2,7
$T_{max}^b$ (min)	5	15	–	5	15	–
AUC <sup>c</sup> (ng · min/ mL) (ng · min/g)	24461	94298	3,9	38403	125992	3,3
$T_{1/2}^d$ (min)	19	19	–	27	29	–
$V_d^e$ (mL)	81	–	–	73	–	–

<sup>a</sup>Maksimal konsentrasjon av rusmiddel, <sup>b</sup>tiden ved maksimal konsentrasjon av rusmiddel, <sup>c</sup>arealet under konsentrasjonskurven, <sup>d</sup>halveringstid, og <sup>e</sup>distribusjonsvolum.

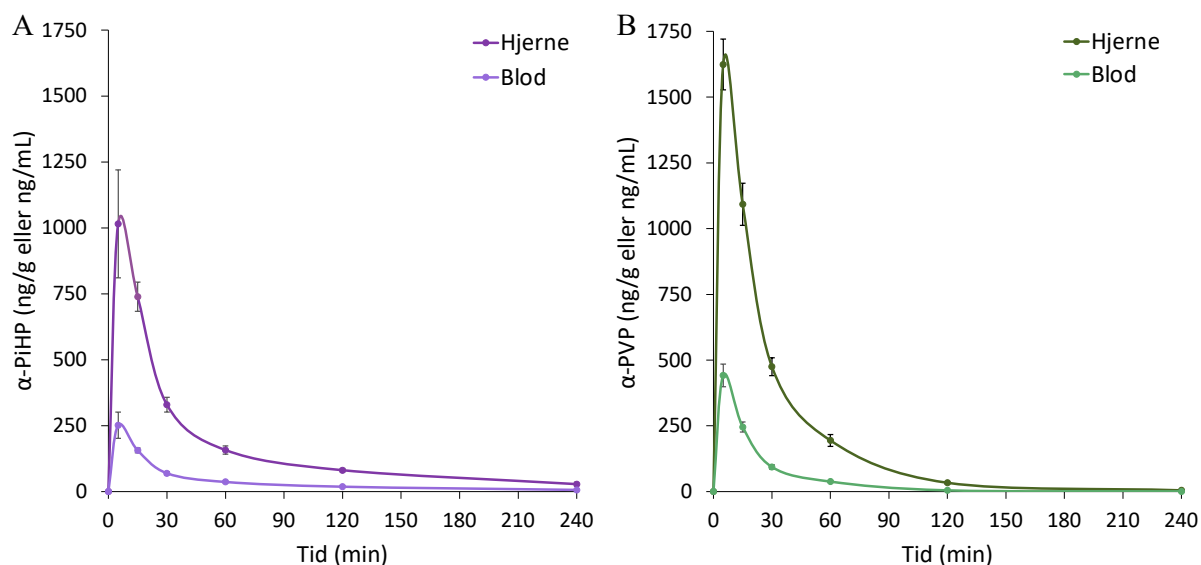
### 3.4.2 Konsentrasjonskurver for $\alpha$ -PiHP og $\alpha$ -PVP

Rusmiddelkonsentrasjoner ble målt i blod (ng/mL) og hjernevev (ng/g) tatt fra mus 5, 15, 30, 60, 120 og 240 min etter eksponering for 2,5 mg/kg  $\alpha$ -PiHP eller  $\alpha$ -PVP.

Figur 3.10 viser konsentrasjonskurvene for  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP i blod og hjerne.  $C_{\max}$  for  $\alpha$ -PiHP i blod ( $252 \pm 50$  ng/mL) og hjernevev ( $1015 \pm 205$  ng/g) ble målt 5 min ( $T_{\max}$ ) etter administrasjon av  $\alpha$ -PiHP (figur 3.10 A, tabell 3.2). Det var mindre enn 10 % av  $C_{\max}$  igjen i blod og hjerne 120 min etter eksponering for  $\alpha$ -PiHP.  $T_{1/2}$  for  $\alpha$ -PiHP var 32 min i både blod og hjernevev.  $V_d$  var 248 mL og AUC var høyere i hjernevev ( $41679$  ng  $\cdot$  min/g) sammenlignet med blod ( $9413$  ng  $\cdot$  min/mL).

$C_{\max}$  i blod ( $442 \pm 43$  ng/mL) og hjernevev ( $1624 \pm 97$  ng/g) etter administrasjon av  $\alpha$ -PVP ble målt etter 5 min ( $T_{\max}$ , figur 3.10 B, tabell 3.2). Etter 120 min var  $\alpha$ -PVP nesten fullstendig eliminert fra både blod og hjernevev.  $T_{1/2}$  for  $\alpha$ -PVP var beregnet til 21 min i blod og 18 min i hjernevev.  $V_d$  var 141 mL og AUC var  $10706$  ng  $\cdot$  min/mL i blodet og  $48724$  ng  $\cdot$  min/g i hjernevev.

$C_{\max}$  var henholdsvis 4 og 3,7 ganger høyere i hjernevev sammenlignet med blodet etter eksponering for henholdsvis  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP (figur 3.10).



**Figur 3.10** Konsentrasjoner for **A)**  $\alpha$ -PiHP og **B)**  $\alpha$ -PVP i blod (ng/mL) og hjerne (ng/g).  
Rusmiddelkonsentrasjonene ble målt i blod og hjernevev som ble tatt ut 5, 15, 30, 60, 120 og 240 min etter s.c. injeksjon av 2,5 mg/kg  $\alpha$ -PiHP eller  $\alpha$ -PVP. Data er framstilt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM, n = 5–6

**Tabell 3.2** Farmakokinetiske parametere og variabler for  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP i blod og hjerne. Det er ikke oppgitt spredningsmål på  $T_{max}$ , AUC,  $t_{1/2}$ ,  $V_d$  fordi beregningene ikke er basert på gjentatte målinger.

Farmakokinetiske parametere og variabler	$\alpha$ -PiHP			$\alpha$ -PVP		
	Blod	Hjernevev	Hjerne:blod	Blod	Hjernevev	Hjerne:blod
$C_{max}^a$ (ng/mL / ng/g)	252 $\pm$ 50	1015 $\pm$ 205	4,0	442 $\pm$ 43	1624 $\pm$ 97	3,7
$T_{max}^b$ (min)	5	5	–	5	5	–
AUC <sup>c</sup> (ng · min/ mL) (ng · min/g)	9413	41679	4,4	10706	48724	4,6
$T_{1/2}^d$ (min)	32	32	–	21	18	–
$V_d^e$ (mL)	248	–	–	141	–	–

<sup>a</sup>Maksimal konsentrasjon av rusmiddel, <sup>b</sup>tiden ved maksimal konsentrasjon av rusmiddel, <sup>c</sup>arealet under konsentrasjonskurven, <sup>d</sup>halveringstid, og <sup>e</sup>distribusjonsvolum.

## 3.5 Monoaminopptak

### 3.5.1 Effekt av 3-MEC og metkatinon

Opptak av monoaminer i synaptosomer fra musehjerne ble studert etter eksponering for 3-MEC og metkatinon. Figur 3.11 viser at jo høyere konsentrasjon av 3-MEC eller metkatinon synaptosomene ble eksponert for, desto kraftigere ble opptaket av DA, NA og 5-HT gjennom henholdsvis DAT, NAT og SERT hemmet.

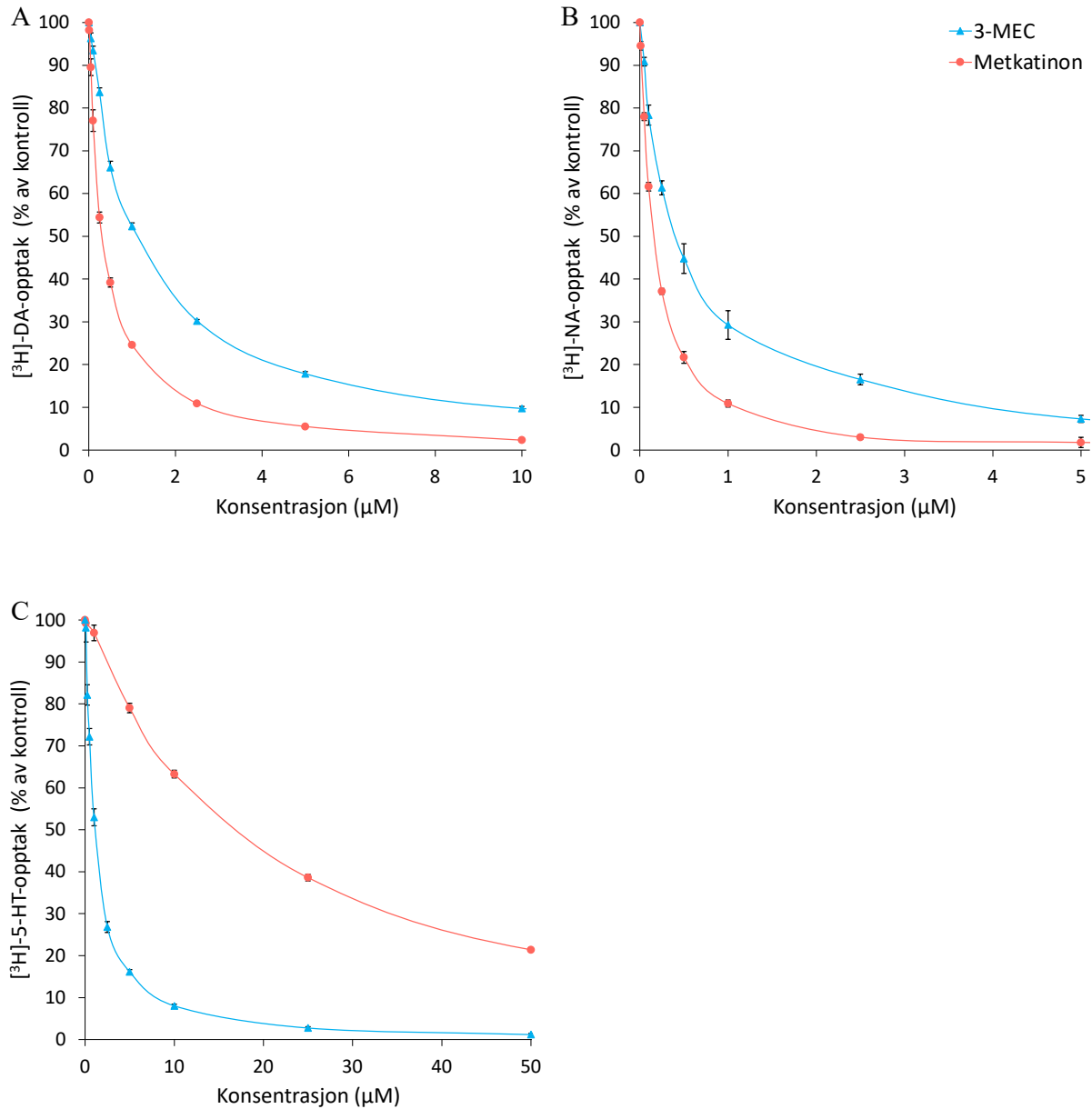
Figur 3.11 viser at høyere konsentrasjon av 3-MEC var nødvendig for å hemme opptaket av DA og NA i samme grad som metkatinon. Dette bekreftes av  $IC_{50}$ -verdiene som var signifikant høyere for 3-MEC sammenlignet med metkatinon ( $p < 0,001$ , tabell 3.3).  $IC_{50}$ -verdiene i tabell 3.3 viser at 3-MEC var 3,5 ganger mindre potent hemmer av DAT og 2,6 ganger mindre potent hemmer av NAT sammenlignet med metkatinon.

Kurveforløpet for 5-HT (figur 3.11 C) viser at en 3-MEC var mer potent hemmer av 5-HT-opptaket sammenlignet med metkatinon. Dette bekreftes av  $IC_{50}$ -verdiene i tabell 3.3, som viser at en signifikant lavere konsentrasjon av 3-MEC var nødvendig for å hemme opptaket av 5-HT i samme grad som metkatinon ( $p < 0,001$ ). 3-MEC var 13,6 ganger mer potent hemmer av SERT sammenlignet med metkatinon.

**Tabell 3.3**  $IC_{50}$ -verdier for 3-MEC og metkatinon på opptaket av DA-, NA og 5-HT i synaptosomer fra mus. Data er framstilt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 4-5$ . Signifikante forskjeller i  $IC_{50}$  er vist med asterisk (\*) ved verdiene (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Statistiske analyser ble utført med t-test for to uavhengige utvalg.

$IC_{50}^a$ i synaptosomer	[ $^3H$ ]-DA-opptak	[ $^3H$ ]-NA-opptak	[ $^3H$ ]-5-HT-opptak
3-MEC ( $\mu M$ )	$1,13 \pm 0,03^{***}$	$0,41 \pm 0,04^{***}$	$1,17 \pm 0,10^{***}$
Metkatinon ( $\mu M$ )	$0,32 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$	$15,92 \pm 0,34$

<sup>a</sup>Konsentrasjon av rusmiddel som kreves for å hemme opptaket av neurotransmitter med 50 %.



**Figur 3.11** Effekt av 3-MEC og metkatinon på opptak av **A)** radiomerket DA etter eksponering for 0,05–10  $\mu\text{M}$  3-MEC og 0,01–10  $\mu\text{M}$  metkatinon, **B)** radiomerket NA etter eksponering for 0,05–5  $\mu\text{M}$  3-MEC og 0,1–5  $\mu\text{M}$  metkatinon og **C)** radiomerket 5-HT etter eksponering for 0,01–50  $\mu\text{M}$  3-MEC og 0,1–50  $\mu\text{M}$  metkatinon i synaptosomer fra musehjerne. Resultatene er regnet ut som % av kontroll, og er framstilt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 4-5$ . Vær oppmerksom på at konsentrasjonene på x-aksen er forskjellig i grafene.

### 3.5.2 Effekt av $\alpha$ -PiHP og $\alpha$ -PVP

Opptak av monoaminer i synaptosomer fra musehjerne ble studert etter eksponering for  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP. Figur 3.12 viser at jo høyere konsentrasjon av  $\alpha$ -PiHP eller  $\alpha$ -PVP synaptosomene ble eksponert for, desto kraftigere ble opptaket av DA, NA og 5-HT gjennom henholdsvis DAT, NAT og SERT hemmet.

Kurveforløpet for DA (figur 3.12 A) viser at  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP hemmet DA-opptaket i like stor grad. Dette bekreftes av  $IC_{50}$ -verdiene i (tabell 3.4). Figur 3.12 B viser at en høyere konsentrasjon av  $\alpha$ -PiHP var nødvendig for å hemme opptaket av NA i samme grad som  $\alpha$ -PVP.  $IC_{50}$ -verdiene i tabell 3.4 viser at  $\alpha$ -PiHP var en signifikant mindre potent hemmer av NAT sammenlignet med  $\alpha$ -PVP ( $p < 0,002$ ).

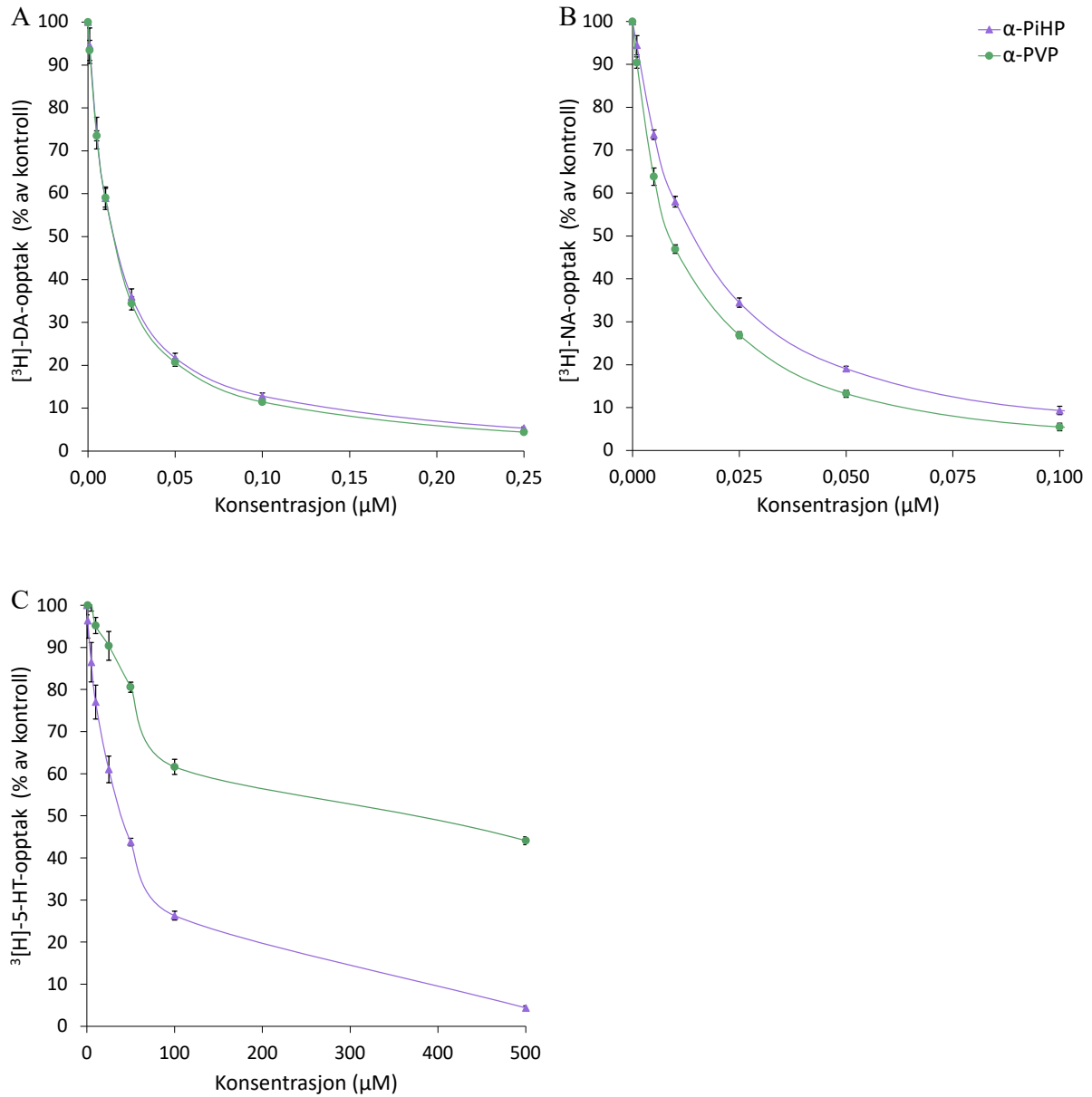
Kurveforløpet for 5-HT i figur 3.12 C viser at  $\alpha$ -PiHP var en mer potent hemmer av SERT sammenlignet med  $\alpha$ -PVP. Dette bekreftes av  $IC_{50}$ -verdiene i tabell 3.4, som viser at en signifikant lavere konsentrasjon av  $\alpha$ -PiHP var nødvendig for å hemme opptaket av 5-HT i samme grad som  $\alpha$ -PVP ( $p < 0,001$ ).  $\alpha$ -PiHP var 2,2 ganger mer potent hemmer av SERT sammenlignet med  $\alpha$ -PVP.

**Tabell 3.4**  $IC_{50}$ -verdier for  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP på opptaket av DA-, NA og 5-HT i synaptosomer fra mus. Data er framstilt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 4$ . Signifikante forskjeller i  $IC_{50}$  er vist med asterisk(\*) ved verdiene (\*\* $p < 0,002$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). Statistiske analyser ble utført med t-test for to uavhengige utvalg.

$IC_{50}^a$ i synaptosomer	[ $^3H$ ]-DA-opptak	[ $^3H$ ]-NA-opptak	[ $^3H$ ]-5-HT-opptak
$\alpha$ -PiHP ( $\mu M$ )	$0,014 \pm 0,002$	$0,013 \pm 0,001^{**}$	$36,95 \pm 5,54^{***}$
$\alpha$ -PVP ( $\mu M$ )	$0,014 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,000$	$81,60 \pm 5,54$

<sup>a</sup>Konsentrasjon av rusmiddel som kreves for å hemme opptaket av neurotransmitter med 50 %.





**Figur 3.12** Effekt av  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP på opptak av **A)** radiomerket DA etter eksponering for 0,001–2,5  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP, **B)** radiomerket NA etter eksponering for 0,001–0,1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP og **C)** radiomerket 5-HT etter eksponering for 1–500  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP i synaptosomer fra musshjerne. Resultatene er regnet ut som % av kontroll og framstilt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 4$ . Vær oppmerksom på at konsentrasjonen på x-aksen er forskjellig i grafene.

## 4 Diskusjon

Hensikten med denne studien var å undersøke farmakodynamiske og farmakokinetiske egenskaper til de nye syntetiske katinonene 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP, samt deres respektive referankestoff metkatinon og  $\alpha$ -PVP. Ved hjelp av både *in vivo*-studier i mus og *in vitro*-studier i isolerte nerveterminaler fra musehjerne, ble farmakodynamiske effekter, farmakokinetikk, virkningsmekanisme og potens for de nevnte stoffene undersøkt.

### 4.1 Farmakodynamiske og farmakokinetiske egenskaper av 3-MEC og metkatinon

#### 4.1.1 3-MEC er en mer potent hemmer av SERT

Resultatene våre viser at 3-MEC er en potent hemmer av DAT og NAT, i likhet med metkatinon. Det krevde derimot en høyere konsentrasjon av 3-MEC sammenlignet med metkatinon for at opptaket av DA og NA skulle bli hemmet med 50 % ( $IC_{50}$ ). 3-MEC er dermed en noe mindre potent hemmer av DAT og NAT med  $IC_{50}$ -verdier på henholdsvis 1,13  $\mu$ M og 0,41  $\mu$ M, sammenlignet med metkatinon som hadde lavere  $IC_{50}$ -verdier på 0,32  $\mu$ M og 0,16  $\mu$ M ved henholdsvis DAT og NAT. Tidligere studier har vist at metkatinon er en potent DAT-hemmer med  $IC_{50}$ -verdier på 0,34  $\mu$ M i rottesyntosomer (69) og  $IC_{50}$ -verdier fra 0,36  $\mu$ M (70) til 1,12  $\mu$ M (24) i transfekterte humane HEK293-celler. Tilsvarende har tidligere studier av metkatinon i HEK293-celler vist  $IC_{50}$ -verdier på 0,085  $\mu$ M (24) til 0,5  $\mu$ M (70) ved NAT.

Det er interessant å merke seg at 3-MEC var nesten 14 ganger mer potent som hemmer av SERT med  $IC_{50}$ -verdi på 1,17  $\mu$ M, sammenlignet med metkatinon med en  $IC_{50}$ -verdi på 15,92  $\mu$ M. Studier av metkatinons effekt på opptak via SERT i rottesyntosomer fant  $IC_{50}$  på 21,3  $\mu$ M (69), og fra 10  $\mu$ M (24) til 35  $\mu$ M (70) i humane celler. Som forventet er det noe variasjon i metkatinons effekt på monoaminreopptak i ulike celle- og vevspreparater fra ulike arter. Likevel viser alle studiene (24, 69, 70) samme trend med potent hemming av DAT- og NAT-reopptak og liten effekt på SERT-reopptak i det samme mikromolarområdet, som samsvarer med våre resultater.

En studie av Cozzi et al. (71) kan gi en mulig forklaring på hvorfor 3-MEC (figur 1.8 B) er en mer potent hemmer av SERT sammenlignet med metkatinon. Cozzi et al. (71) viste at en fluor-substituering i 3-posisjon på fenytringen til metkatinon førte til økt hemming av SERT og mindre potent hemming av DAT og NAT. MDMA (figur 1.3 E), også kjent som virkestoffet i ecstasy), har substituenten i 3- og 4-posisjon på fenytringen og hemmer SERT i større grad enn DAT og NAT (9, 24, 28). Det kan dermed tenkes at en økt serotonerg effekt er forbundet med substitusjon i 3- og 4-posisjon på fenytringen på metamfetaminmolekylet.

3-MEC har en DAT/SERT-ratio på 1 som er betydelig lavere enn for metkatinon (50). Siden 3-MEC er en mer potent hemmer av SERT sammenlignet med metkatinon, indikerer det at 3-MEC kan ha en mindre avhengighetsskapende effekt som følge av en lavere DAT/SERT-ratio (3, 47).

På grunnlag av våre studier av monoaminopptak kan 3-MEC klassifiseres som syntetiske katinoner med lignende egenskaper som kokain og MDMA, ettersom 3-MEC virker som en ikke-selektiv monoaminreopptakshemmer av DAT, NAT og SERT (24, 53). Likevel bør det gjøres studier på frigjøring av monoaminene for å kunne konkludere noe helt sikkert om hvilken klasse katinoner 3-MEC tilhører. Metkatinon tilhører derimot gruppen metamfetaminlignende syntetiske katinoner, da metkatinon er en potent DAT- og NAT-hemmer, som også frigjør DA fra nerveterminalene (9, 24, 53, 70, 71).

#### **4.1.2 Akutt ruseffekt og stereotypisk aktivitet av 3-MEC**

Resultatene fra lokomotionsstudien viser en dose- og tidsavhengig respons i lokomotorisk aktivitet etter eksponering for 3-MEC og metkatinon. Musenes lokomotorisk aktivitet er en indikator på akutt ruseffekt (72), da eksponering av stimulerende rusmidler som amfetamin og kokain fører til økt bevegelsesaktivitet hos mus (50). Dette observeres ved løping, økt utforsking av omgivelsene og generelt økt motorisk aktivitet (50). På denne måten kan aktivitetsnivået i mus gi en indikasjon på det generelle stimulerende potensialet til et rusmiddel.

Bare den høyeste dosen av 3-MEC på 30 mg/kg induserte total lokomotorisk aktivitet som var signifikant, mens dette gjaldt lavere doser av metkatinon fra 5–12,5 mg/kg. Dette samsvarer godt med én tidligere studie i mus som viste signifikant økning i total lokomotorisk aktivitet etter s.c. injeksjon av 10 mg/kg metkatinon (53). Den høyeste dosen på 30 mg/kg 3-MEC

induserte  $E_{\max}$  (2023 cm/5 min) som var signifikant høyere enn kontroll etter 20 min. Metkatinon induserte den høyeste aktiviteten 15 min etter eksponering for 10 mg/kg metkatinon (1885 cm/5 min), som samsvarer med en annen studie i mus (73). Etersom  $T_{\max}$  er lengre for 3-MEC (20 min) sammenlignet med metkatinon (5–20 min) kan det ha en betydning for risikoen for overdosering, dersom 3-MEC administreres kort tid etter.

Det er verdt å merke seg at det var en kraftig økning i total lokomotorisk aktivitet og  $E_{\max}$  ved overgangen fra en dose på 25 mg/kg 3-MEC til en dose på 30 mg/kg. Dette indikerer at selv en liten økning i doseringen kan gi sterkere effekter av 3-MEC, som potensielt kan øke risikoen for overdosering av stoffet.

En *in vivo*-studie i rotter (74) viste at økte nivåer av 5-HT i hjernen er sterkt korrelert med stereotypisk adferd. Stereotypisk adferd kan brukes som en indikator på rusnivået hos musene (75). Det ble observert stereotypisk adferd i form av unormal og hyppig repetitiv normaladferd i forsøkene med 3-MEC, mens unormal og hyppig repetitiv adferd ble observert for metkatinon. Basert på resultatene fra *in vitro*-studien er det sannsynlig at 3-MEC induserer en høy serotonerg aktivitet. Det er dermed mulig at høyere doser av 3-MEC enn det vi har testet i denne studien også kan indusere unormal og repetitiv oppførsel som å gnage og slikke på vegger. Studier som undersøker høyere doser av 3-MEC er derfor nødvendig for å si noe mer om stereotypisk aktivitet, ettersom det bare var én dose som induserte en signifikant høyere totalaktivitet.

Våre studier viser at det kreves en 2,4 og 3 ganger større dose av 3-MEC for å oppnå det samme nivået av henholdsvis total lokomotorisk aktivitet og  $E_{\max}$  sammenlignet med metkatinon. Dette tyder på at 3-MEC er mindre potent ved DAT enn metkatinon, basert på sammenhengen mellom lokomotorisk aktivitet og økt frigjøring av dopamin i hjernen til mus (50, 51). Selv om 3-MEC var noe mindre potent ved DAT i *in vitro*-studien, antyder det imidlertid at aktiviteten til 3-MEC er noe lavere enn metkatinon på grunn av serotonerge effekter. Dette kan begrunnes ut ifra flere studier (75–78), som har indikert at økte ekstracellulære nivåer av 5-HT i hjernen etter administrasjon av stimulerende rusmidler kan redusere virkningen av DA på lokomotorisk aktivitet, og dermed evnen til å skape avhengighet. To tidligere studier utført av Cozzi et al. og Schindler et al. (71, 76) har blant annet undersøkt om interaksjoner mellom dopaminerge og serotonerge effekter *in vitro*-funn av syntetiske katinoner kan relateres til lokomotorisk aktivitet og kommet fram til samme

konklusjon: en mer potent SERT-hemmer vil i større grad kunne redusere DA-indusert lokomotorisk aktivitet.

For doser av metkatinon på 12,5 mg/kg eller høyere ble det registrert to aktivitetsfaser. På bakgrunn av observasjon av musene og erfaring fra tidligere studier, kunne vi konkludere med at musene var for ruset til å kunne koordinere løpsaktivitet ved disse dosene. I slike tilfeller begynner ofte musene å være aktive igjen når rusmiddelet har blitt metabolisert og hjernekonsentrasjonen når et nivå som tillater at musene går eller løper framover (73, 79). Våre funn tyder på at dette nivået ble nådd etter 90 min, da aktiviteten tiltok igjen.

Virkingen av 3-MEC var generelt kortere sammenlignet med metkatinon, da 10 mg/kg 3-MEC varte i omtrent 60 min, mens samme dose av metkatinon varte i omtrent 150 min. Våre resultater av metkatinon samsvarer med en studie i mus som viste at virkingen av 10 mg/kg metkatinon varte i 100–180 min (73).

Så vidt vi kjenner til har ikke 3-MECs effekt på lokomotorisk aktivitet blitt studert tidligere. Våre resultater av metkatinon samsvarer godt med to tidligere studier (53, 73) som viser den samme dose-responsprofilen.

#### **4.1.3 3-MECs farmakokinetikk**

3-MECs  $C_{max}$  og AUC var henholdsvis 3,5 og 3,9 ganger høyere i hjernevev, sammenlignet med blod. 3-MEC var lik farmakokinetikkprofilen til metkatinon, der  $C_{max}$  og AUC var henholdsvis 2,7 og 3,3 ganger høyere i hjernevev sammenlignet med blod. 3-MEC nådde en  $C_{max}$  på 772 ng/mL i blod og 2706 ng/g i hjernevev, sammenlignet med 859 ng/mL og 2316 ng/g metkatinon i henholdsvis blod og hjernevev.  $T_{max}$  ble observert etter 5 min i blod og 15 min i hjerne for både 3-MEC og metkatinon.

$C_{max}$  av 3-MEC er høyere i hjernen sammenlignet med metkatinon, som tyder på at 3-MEC i større grad går over blod-hjernebarrieren (24). Dette kan forklares ut ifra at 3-MEC er et mer lipofilt molekyl enn metkatinon på grunn av metylsubstituert fenylring og en etylgruppe koblet til aminet. Dette støttes opp av log P-verdiene som forteller noe om hvordan rusmiddelet fordeler seg mellom oktanol og vann ved fysiologiske betingelser (37 °C og pH 7,4) (80). 3-MEC har en log P på 2,3 (81) som er høyere enn log P for metkatinon på 1,6 (82). log P-verdien bekrefter at 3-MEC er et mer lipofilt molekyl enn metkatinon, noe som

indikerer at 3-MEC fordeler seg mer i kroppens vev (80).  $V_d$  samsvarer også med disse funnene, da 3-MEC (81 mL) hadde et større  $V_d$  enn metkatinon (73 mL). Dette bekrefter en høyere fordeling i vevet, og dermed hjernen, i forhold til blodet (83 s. 32).

$T_{1/2}$  for 3-MEC (19 min) i blod og hjerne var kortere sammenlignet med metkatinon (30 min). Etersom  $t_{1/2}$  for et legemiddel eller rusmiddel er konstant og uavhengig av dose for 1. ordens kinetikk (83) s. 62, betyr det at 3-MEC elimineres hurtigere enn metkatinon ved den samme dosen.

Så vidt vi kjenner til har ikke 3-MECs farmakokinetiske egenskaper blitt studert tidligere, og det er kun to tidligere *in vivo*-studier av metkatinons farmakokinetikk i henholdsvis mus (84) og kanin (85), hvor  $t_{1/2}$  var mye lengre enn det vi har funnet i vår studie.

#### **4.1.4 3-MEC induserer hypertermi**

Eksponering for 10 og 25 mg/kg 3-MEC førte til den største signifikante økningen i kroppstemperatur på 0,8–1,2 °C ved 60 min, og var lavere enn metkatinon ved samme tidspunkt og doser (1,5–2,1 °C). Våre funn samsvarer godt med en annen studie av metkatinon utført i mus av Anneken et al., som fant en dose-avhengig økning av kroppstemperatur på 1,5–2 °C ved dosene 20 og 40 mg/kg (86).

Det er verdt å merke seg at eksponering for 25 mg/kg 3-MEC førte til en signifikant reduksjon av kroppstemperatur på 1,2 °C i forhold til kontroll første 15 min etter injeksjon, etterfulgt av en økning i kroppstemperatur sammenlignet med kontroll. En nedgang i kroppstemperatur 3–4 °C lavere enn kontroll har tidligere blitt rapportert ved høye doser (80 mg/kg) av metkatinon (86–88). Så vidt vi kjenner til er det ingen studier av 3-MEC som viser påvirkning på kroppstemperatur, og få studier av metkatinon til dags dato. Dosene vi benyttet i vår studie var lavere enn i studien til Anneken et al. Det kan dermed tenkes at en slik effekt med reduksjon i temperatur kan bli forventet ved høyere doser av både 3-MEC og metkatinon. Dette er begrunnet ut i fra at studien til Anneken et al. som også viste økt kroppstemperatur sammenlignet med kontroll for 20–40 mg/kg metkatinon (86). Våre funn viser at 3-MEC kan forårsake hypertermi i store doser, som kan være av klinisk betydning.

Det var forventet at kroppstemperaturen til kontrolldyrene skulle være uforandret gjennom forsøket. Umiddelbart etter s.c. injeksjon av saltvann økte temperaturen ca. 0,5 °C, for

deretter å synke til ca. 2,5 °C lavere enn utgangstemperaturen 240 min etter injeksjon. Det er annerkjent at stressresponser kan øke kroppstemperaturen hos mus som følge av håndtering ved å f.eks bli holdt fast ved injeksjon (89, 90). Det er dermed en sannsynlig at stressresponser fører til den umiddelbare økningen i temperatur hos kontrolldyrene. Tidligere studier (91–96) har vist at romtemperatur kan påvirke kroppstemperatur i mus etter eksponering for rusmidler, og har dermed gitt et varierende utfall i om stoffer induserer hypotermi eller hypertermi. Studier utført i romtemperatur har vist å senke kroppstemperatur (91, 92, 94, 95).

Før forsøkene våre stod musene oppstallet med andre mus, og kroppstemperaturen kunne ha blitt lavere etter 240 min som følge av at de stod oppstallet enkeltvis i forsøket. Denne nedgangen i kroppstemperatur i kontrollmus har også blitt sett i tidligere studier som bruker samme temperatursensor (88, 89, 97, 98), men har ikke blitt adressert. En annen mulig forklaring på en redusert kroppstemperatur kan være at forsøksrommet der musene stod oppstallet hadde en lavere temperatur enn vanlige oppstallingsbetingelser på  $21 \pm 0,2$  °C.

## 4.2 Farmakodynamiske og farmakokinetiske effekter $\alpha$ -PiHP og $\alpha$ -PVP

### 4.2.1 $\alpha$ -PiHP er en mer potent hemmer av SERT

Våre *in vitro*-studier viste at  $\alpha$ -PiHP er en like potent hemmer av DAT som  $\alpha$ -PVP, som begge hadde en  $IC_{50}$ -verdi på 0,014  $\mu$ M. For å hemme NAT-opptak med 50 % krevde det en noe høyere konsentrasjon av  $\alpha$ -PiHP ( $IC_{50}$ : 0,013  $\mu$ M), sammenlignet med  $\alpha$ -PVP ( $IC_{50}$ : 0,009  $\mu$ M). Tidligere studier i rottesyntosomer har vist at  $\alpha$ -PVP er en potent katekolaminreopptakshemmer med  $IC_{50}$ -verdier på 0,013  $\mu$ M (99) til 0,019  $\mu$ M (68, 100) ved DAT, og  $IC_{50}$ -verdier fra 0,014 (99)  $\mu$ M til 0,028  $\mu$ M (68) ved NAT. Som forventet er det noe variasjon i  $IC_{50}$ -verdier for monoaminopptak mellom ulike studier. Dette kan skyldes bruk av ulike biologiske preparater, ulike arter eller stammer, og ulike forsøksbetingelser. Likevel viser alle studiene (68, 99, 100) den samme trenden med potent hemming av DAT- og NAT-reopptak i det samme mikromolarområdet.

Flere studier (99–102) har vist at en økt lengde av  $\alpha$ -karbonkjeden i pyrrolidinkationer øker potensen som DAT- og NAT-hemmer, opp til en viss lengde (103). En mer forgreinet  $\alpha$ -

karbonkjede bidrar også til å opprettholde en høy affinitet til DAT (100).  $\alpha$ -PiHP (figur 1.6 D) er strukturelt lik  $\alpha$ -PVP (figur 1.6 C), med unntak av en forgreinet  $\alpha$ -karbonkjede med en ekstra metylgruppe (isobutylgruppe). Vi fant ingen forskjell i hemming av DA-opptak for  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP og konkluderer med at en forgreinet alkylkjede på  $\alpha$ -karbonet bidrar til å opprettholde potentensen som DAT-hemmer, når det gjelder  $\alpha$ -PiHP.

Det er interessant å merke seg at  $\alpha$ -PiHP var 2,2 ganger mer potent som hemmer av SERT, med en  $IC_{50}$ -verdi på 36,96  $\mu$ M, i forhold til  $\alpha$ -PVP som hadde en  $IC_{50}$ -verdi på 81,60  $\mu$ M. Studier i rottesynaptosomer har vist  $IC_{50}$ -verdier for  $\alpha$ -PVP over 10  $\mu$ M (99) til 75  $\mu$ M (68) ved SERT, hvor studien til Gannon et al. (68) samsvarer godt med våre funn.

$\alpha$ -PiHP har en DAT/SERT-ratio på 2639, som er noe høyere enn for  $\alpha$ -PVP (5829). En mer potent SERT-hemming kan indikere en mindre avhengighetsskapende effekt av  $\alpha$ -PiHP sammenlignet med  $\alpha$ -PVP, på grunn av en mindre DAT/SERT-ratio (3, 47). Selv om  $\alpha$ -PiHP hemmer SERT i større grad enn  $\alpha$ -PVP, er likevel  $\alpha$ -PiHP en betydelig mer potent hemmer av DAT og NAT enn SERT.

På bakgrunn av våre studier av monoaminopptak, tilhører  $\alpha$ -PiHP gruppen pyrrolidinkatinoner, som inneholder en pyrrolidinring på amingruppen, med varierende  $\alpha$ -karbonkjede (3, 24, 101). Pyrrolidinkatinoner er potente og selektive hemmere av DAT og NAT med liten effekt på SERT (3, 23, 24), og inkluderer  $\alpha$ -PVP (68). Pyrrolidinkatinoner er derimot ikke et substrat for monoamintransportørene og frigjør derfor ikke monoaminer (24, 46, 99). Frigjøringsstudier av  $\alpha$ -PiHP på monoaminer kreves likevel for å kunne si noe sikkert om  $\alpha$ -PiHP er et substrat for monoamintransportørene.

#### 4.2.2 Akutt ruseffekt og stereotypisk aktivitet av $\alpha$ -PiHP

Resultatene fra lokomosjonsstudien viste en dose- og tidsavhengig respons i lokomotorisk aktivitet etter eksponering for  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP, som er en indikator på akutt ruseffekt (72).

Doser fra 5–15 mg/kg  $\alpha$ -PiHP induserte total lokomotorisk aktivitet og  $E_{max}$  som var signifikante sammenlignet med kontroll, mens dette gjaldt lavere doser av  $\alpha$ -PVP fra 1,75–5 mg/kg. En signifikant økning i totalaktivitet har tidligere blitt rapportert for doser av 1–20 mg/kg  $\alpha$ -PVP i mus (103, 104) og 3–10 mg/kg  $\alpha$ -PVP i rotte (99).



Høyest totalaktivitet ble observert etter injeksjon av 10 mg/kg  $\alpha$ -PiHP (32101 cm/240 min) og 3,75 mg/kg  $\alpha$ -PVP (20035 cm/240 min). En 2,7 ganger høyere dose var nødvendig for å oppnå  $E_{\max}$  etter  $\alpha$ -PiHP, sammenlignet med  $\alpha$ -PVP. Denne forskjellen må skyldes andre faktorer enn effekt på DAT, siden monoaminreopptaksstudien viste at  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP var like potente hemmere av DAT (50). Som tidligere nevnt, har tidligere studier på syntetiske kationer (71, 76) indikert at økende potens som SERT-hemmer vil i større grad kunne redusere DA-indusert lokomotorisk aktivitet. I lys av dette kan det tenkes at det kreves en større dose av  $\alpha$ -PiHP for å oppnå samme lokomotorisk aktivitet som  $\alpha$ -PVP, fordi  $\alpha$ -PiHP var dobbelt så potent hemmer av SERT sammenlignet med  $\alpha$ -PVP.

For doser av  $\alpha$ -PiHP på 12,5 mg/kg eller høyere observerte vi redusert lokomotorisk aktivitet, trolig fordi hjernekonsentrasjonen av rusmiddel var så høy at dyrene ikke greide å koordinere løpsaktivitet etter administrasjon av disse dosene. Denne reduksjonen i lokomotorisk aktivitet sammenfalt med observasjoner av stereotypisk aktivitet 15 og 30 min etter administrasjon av høye doser  $\alpha$ -PiHP (12,5 og 15 mg/kg), sammenlignet med  $\alpha$ -PVP (3,75–10 mg/kg). Andre studier har også vist at denne reduksjonen i aktivitet er forbundet med stereotypisk adferd, etterfulgt av en økning i aktivitet som følge av at dosen avtar (104–106).

To aktivitetsfaser ble også sett ved høye doser av  $\alpha$ -PVP (3,75–10 mg/kg), og andre studier av  $\alpha$ -PVP (104–106) sammenfaller med våre observasjoner av stereotypisk adferd.

En studie av Baumann et al. (74) på MDMA *in vivo* i rotter viste at økte nivåer av 5-HT i hjernen er sterkt korrelert med stereotypisk adferd. Ettersom høy serotonerg aktivitet i form av serotonergt syndrom kan forårsake forvirring, hallusinasjoner og hypertermi (4, 9), kan det tenkes at  $\alpha$ -PiHP hemming av SERT utøver en slik effekt, da det ved høye doser ble observert unormal og repetitiv oppførsel som å gnage og slikke på vegger.

Så vidt vi kjenner til finnes det bare én studie av  $\alpha$ -PiHP i mus, og den viser den samme dose-responsprofilen for  $\alpha$ -PiHP etter dosering av 2,5–10 mg/kg (107), som samsvarer med våre funn. Dose-responsprofilen for  $\alpha$ -PVP kan også bekreftes av tidligere studier i mus (103, 104).

### 4.2.3 $\alpha$ -PiHPs farmakokinetikk

$\alpha$ -PiHPs  $C_{\max}$  og AUC var 4 ganger høyere i hjernevev sammenlignet med blod. Tilsvarende for  $\alpha$ -PVP var  $C_{\max}$  og AUC av henholdsvis 3,7 og 3,3 ganger høyere i hjernevev sammenlignet med blod. Det ble målt en  $C_{\max}$  på 252 ng/mL i blod og 1015 ng/mL i hjernevev av  $\alpha$ -PiHP, som var lavere sammenlignet med 442 ng/g og 1624 ng/g  $\alpha$ -PVP i henholdsvis blod og hjernevev.  $T_{\max}$  ble observert etter 5 min i blod og hjerne for både  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP, som indikerer en rask virkning. Det har også nylig blitt rapportert høye konsentrasjoner av  $\alpha$ -PiHP i blod (966–2377 ng/mL) hjernevev (852–1016 ng/g) etter et dødsfall assosiert med stoffet (37).

Høyere konsentrasjon av  $\alpha$ -PiHP i hjernevev sammenlignet med i blod indikerer at  $\alpha$ -PiHP i stor grad krysser blod-hjernebarrieren. Dette kan forklares ved at  $\alpha$ -PiHP (figur 1.6 D) er et mer lipofilt molekyl enn  $\alpha$ -PVP på grunn av en ekstra metylgruppe på  $\alpha$ -karbonkjeden  $\alpha$ -PiHP har en log P-verdi på 3,9 (108), som er noe høyere enn  $\alpha$ -PVP (log P: 3,4)(109). log P-verdien bekrefter dermed at  $\alpha$ -PiHP er mer lipofilt enn  $\alpha$ -PVP.  $V_d$  samsvarer også med disse funnene da  $\alpha$ -PiHP (248 mL) i hjernen var høyere enn for  $\alpha$ -PVP (148 mL), som bekrefter at  $\alpha$ -PiHP fordeler seg mer i vevet, og dermed hjernen (83 s. 32).

$T_{1/2}$  for  $\alpha$ -PiHP var 32 min i blod og hjernevev, som var lengre enn  $t_{1/2}$  for  $\alpha$ -PVP (ca. 20 min). Dette betyr at  $\alpha$ -PiHP elimineres saktere enn  $\alpha$ -PVP ved den samme dosen.

### 4.2.4 $\alpha$ -PiHP inducerer hypertermi

Eksponering for 10 mg/kg  $\alpha$ -PiHP førte til den største signifikante økningen i kroppstemperatur på 0,8 °C etter 60 min, sammenlignet med  $\alpha$ -PVP som viste en signifikant temperaturøkning på 0,9 °C ved samme dose og tidspunkt. Ved 120 min induserte  $\alpha$ -PiHP en økning i kroppstemperatur som var signifikant høyere enn kontrolldyrene i likhet med  $\alpha$ -PVP, som antyder at  $\alpha$ -PiHP har en langvarig effekt på kroppstemperatur.

Resultatene fra temperatustudien viste at eksponering for de høyeste dosene av  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP (2,5 og 10 mg/kg) førte til en dose- og tidsavhengig økning kroppstemperatur som samsvarer med litteraturen på  $\alpha$ -PVP (98, 106) Våre funn viser at  $\alpha$ -PiHP kan forårsake hypertermi i store doser, som kan være av klinisk betydning.

Så vidt vi kjenner til er det ingen studier på  $\alpha$ -PiHP og få studier på  $\alpha$ -PVP som viser hvordan disse stoffene påvirker kroppstemperatur til dags dato, og de som finnes presenterer motstridende funn. To studier i rotter viste at doser fra 5–10 mg/kg  $\alpha$ -PVP reduserte kroppstemperatur sammenlignet med utgangstemperaturen hos kontrolldyr (106, 110), mens studien til Taffe et al. (110) viste at en dose på 1 mg/kg øker kroppstemperaturen i rotte. Studien til Nelson et al. i rotte (98) er i samsvar med våre funn, som viser at kroppstemperaturen øker etter eksponering for 0,3–3 mg/kg  $\alpha$ -PVP. En mulig forklaring på motstridende funn i studier på endring i kroppstemperatur er at romtemperatur påvirker responsen i rottene etter eksponering for rusmiddel, noe som har blitt sett ved administrering av blant annet MDMA (91, 92), mefedron (93, 94) og metamfetamin (95, 96). Romtemperaturer ved vanlige laboratoriebetingelser (22–24 °C) kan føre til en lavere kroppstemperatur, mens høyere romtemperaturer over 26 °C gir en høyere kroppstemperatur (91, 92, 94, 95). Det kreves dermed flere studier som viser hvordan  $\alpha$ -PiHP påvirker kroppstemperatur.

## 4.3 Sammenligning av de syntetiske katinonene

### 4.3.1 Kliniske vurderinger og potens av 3-MEC og $\alpha$ -PiHP

Basert på våre studier av monoaminopptak var 3-MEC en ikke-selektiv monoaminreopptakshemmer av DAT, NAT og SERT, og kan klassifiseres som et syntetisk katinon med lignende egenskaper som kokain og MDMA (24, 53). Metkatinon tilhører derimot gruppen metamfetaminlignende syntetiske katinoner, da metkatinon er en potent DAT- og NAT-hemmer, som også frigjør DA fra nerveterminalene (9, 24, 53, 70, 71). Tilsvarende tilhører  $\alpha$ -PiHP gruppen pyrrolidinkatinoner, som er potente og selektive hemmere av DAT og NAT med begrenset aktivitet på SERT (3, 23, 24)

3-MEC var nesten 14 ganger mer potent som hemmer av SERT sammenlignet med referankestoffet metkatinon. Dette kan indikere en mindre avhengighetsskapende effekt av 3-MEC på grunn av en høyere DAT/SERT-ratio (3, 47) på 1, sammenlignet med metkatinon med en ratio på 50. Økte konsentrasjoner av 5-HT kan også bidra til å hemme DA-indusert lokomotorisk aktivitet (75–78). For å oppnå en signifikant økning i total aktivitet i mus med 3-MEC, krevde det en 6 ganger så høy dose sammenlignet med metkatinon. Våre funn antyder dermed at 3-MEC er mindre potent enn metkatinon. Sammenlignet med andre

stimulerende rusmidler, har kokain en DAT/SERT-ratio på ca. 3 og metamfetamin en ratio på ca. 22 (9, 13, 24, 48). Basert på DAT/SERT-ratioer er 3-MEC sannsynligvis mindre avhengighetsskapende enn kokain og metamfetamin.

$\alpha$ -PiHP er en 2,2 ganger mer potent hemmer av SERT sammenlignet med referankestoffet  $\alpha$ -PVP. Dette kan indikere en mindre avhengighetsskapende effekt (3, 47) av  $\alpha$ -PiHP på grunn av en lavere DAT/SERT-ratio på 2639, sammenlignet med  $\alpha$ -PVP som har en ratio på 5829. Våre funn tyder på at  $\alpha$ -PiHP er mindre potent sammenlignet med  $\alpha$ -PVP. DAT/SERT-ratioene for både  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP er imidlertid betydelig høyere sammenlignet med 3-MEC og metkatinon på grunn av en lav hemming av SERT (3, 47). Dette indikerer at både  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP er mer avhengighetsskapende på tvers av gruppene syntetiske katinoner, også sammenlignet med amfetamin og kokain.

#### **4.3.2 Pyrrolidinkatinoner krysser blod-hjernebarrieren i større grad**

3-MEC og  $\alpha$ -PiHP, samt referankestoffene metkatinon og  $\alpha$ -PVP hadde 2,7–4 ganger høyere  $C_{\max}$  i hjernevev sammenlignet med i blodet, hvor  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP hadde høyest ratio. Pyrrolidinkatinoner som  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP er mer lipofile enn andre grupper syntetiske katinoner på grunn av pyrrolidinringen på amingruppen (26). Dette gjenspeiler seg i log P-verdiene til  $\alpha$ -PiHP (3,9) og  $\alpha$ -PVP (3,4), som er høyere enn for 3-MEC (2,3) og metkatinon (1,6).  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP går i stor grad over blod-hjernebarrieren på grunn av høy lipofilisitet og har dermed et høyt  $V_d$  (9, 24).  $\alpha$ -PiHP har et  $V_d$  på 248 mL, som gir lengre  $t_{1/2}$  (11) i blodet og i hjerne på 32 min, sammenlignet med  $\alpha$ -PVP, 3-MEC og metkatinon som alle hadde lavere  $V_d$  og kortere  $t_{1/2}$ . Som en konsekvens av den økte lipofilisiteten er  $T_{\max}$  for  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP kortere sammenlignet med 3-MEC og metkatinon. Dette indikerer en raskere virkning av  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP, sammenlignet med 3-MEC og metkatinon.

#### **4.3.3 Mindre fare for hypertermi etter 3-MEC og $\alpha$ -PiHP**

Økning i kroppstemperatur etter eksponering for  $\alpha$ -PiHP (0,8 °C) og  $\alpha$ -PVP (0,9–1,1 °C) var mindre sammenlignet med eksponering for 3-MEC (0,9–1,2 °C) og metkatinon (0,6–2,1°C). Dette kan bety at det er mindre fare for hypertermi etter inntak av  $\alpha$ -PiHP sammenlignet med 3-MEC. En studie av MDMA viser en økning på ca. 1,5 °C etter administrering (111), som er

likt funnene våre for 3-MEC og metkatinon. Dette tyder på at disse stoffene kan ha en lignende effekt på kroppstemperatur som MDMA.

## 4.4 Overførbarhet fra mus til mennesker

Mus og rotter er ofte foretrukket som modellorganismer på grunn av deres likheter med mennesker når det gjelder hjerneanatomi, fysiologi og genetikk (112). Selv om det er likheter mellom gnagere og mennesker, er det likevel artsspesifikke forskjeller som avgjør virkningen av et legemiddel eller rusmiddel (113). Det er derfor utfordrende å trekke konklusjoner og generalisere funn fra dyrestudier til mennesker, ettersom resultatene ikke kan overføres med absolutt sikkerhet (113). Likevel bidrar studier i mus med en verdifull innsikt om årsakssammenhenger, da de kan si noe om egenskapene til rusmidler innad i en art. Dyrestudier er dermed en viktig del av å kunne gi en indikasjon på virkningen hos mennesker.

## 4.5 Videre studier

Det er indentifisert mange potensielle virkesteder i nerveterminaler for syntetiske katinoner (71), hvorav monoamintransportørene DAT, NAT og SERT er de viktigste som har blitt undersøkt i denne oppgaven. For å få et helhetlig bilde på virkningsmekanismen til 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP, er det nødvendig å utføre *in vitro*-studier på nevrotransmitterfrigjøring, for å kunne si noe helt sikkert om 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP er hemmere eller substrater for monoamintransportørene.

Videre er det nødvendig å undersøke om økning i lokomotorisk aktivitet skyldes økt aktivering av D<sub>1</sub> og D<sub>2</sub>-reseptorene. Ved å administrere D<sub>1</sub> og D<sub>2</sub>-antagonister før injeksjon av 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP i lokomosjonsforsøkene er det mulig å observere om lokomotorisk aktivitet kan tilskrives aktivering av D<sub>1</sub> og D<sub>2</sub>-reseptorene i mus. Dette bidrar til å øke forståelsen av hvordan stoffet virker på et molekylært nivå *in vivo*.

## 5 Konklusjon

- *In vitro*-studiene viste at 3-MEC var en potent hemmer av monoaminopptak, men var 2,5–3,5 ganger mindre potent hemmer av DA- og NA-opptak, og 13,6 ganger mer potent hemmer av 5-HT-opptaket sammenlignet med metkatinon. 3-MEC var en ikke-selektiv potent hemmer av DAT, NAT og SERT, og kan derfor klassifiseres som et syntetisk katinon med lignende egenskaper som kokain og MDMA.

$\alpha$ -PiHP var like potent og litt mindre potent hemmer av henholdsvis DA- og NA-opptaket, og en noe mer potent hemmer av 5-HT-opptaket sammenlignet med  $\alpha$ -PVP.  $\alpha$ -PiHP var potent hemmer av DAT og NAT, med liten effekt på SERT *in vitro*, og kan derfor klassifiseres som et pyrrolidinkatinon.

- *In vivo*-eksponering for 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP viste en umiddelbar effekt, der  $E_{\max}$  ble målt etter henholdsvis 20 min og 5–20 min. For å indusere aktivitet var det nødvendig med en høyere dose av  $\alpha$ -PiHP og 3-MEC noe som indikerer at  $\alpha$ -PiHP og 3-MEC ga mindre ruseffekt og var mindre potente enn referansestoffene.

Lokosjonsstudiene indikerte at stereotypisk adferd var forbundet med høye konsentrasjoner av rusmidlene i hjernen. 3-MEC induserte stereotypisk adferd som var unormal og hyppig repetitiv normaladferd ved en dose på 30 mg/kg.  $\alpha$ -PiHP og  $\alpha$ -PVP induserte stereotypisk atferd som var unormal og hyppig repetitiv etter injeksjon av doser på eller høyere enn henholdsvis 7,5 mg/kg eller 3,75 mg/kg.

3-MEC og  $\alpha$ -PiHP forårsaket en mindre økning i kroppstemperaturen hos mus, sammenlignet med referansestoffene metkatinon og  $\alpha$ -PVP. Likevel er det mulig at 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP kan forårsake hypertermi ved høye doser.

- Konsentrasjonsmålinger fra kinetikkstudien viser at 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP fordeler seg henholdsvis 3,5 og 4 ganger mer i hjernen sammenlignet med i blodet.  $C_{\max}$  av 3-MEC og  $\alpha$ -PiHP i hjernen ble målt henholdsvis 15 og 5 min etter administrering.  $T_{1/2}$  for 3-MEC var 19 min, noe som kan tyde på en kortere ruseffekt sammenlignet med metkatinon.  $T_{1/2}$  for  $\alpha$ -PiHP var 32 min og kan indikere en lengre ruseffekt sammenlignet med  $\alpha$ -PVP.

# Litteraturliste

1. Ritter JM, Flower RJ, Henderson G, Loke YK, MacEwan DJ, Rang HP. Rang and Dale's pharmacology. Ninth edition. ed. Edinburgh: Elsevier; 2019. p. 623-9.
2. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). New psychoactive substances: 25 years of early warning and response in Europe. An update from the EU Early Warning System (June 2022). Luxemburg: Publications Office of the European Union; 2022. Report No.: TD0522113ENN.
3. Baumann MH, Walters HM, Niello M, Sitte HH. Neuropharmacology of Synthetic Cathinones. In: Maurer HH, Brandt SD, editors. New Psychoactive Substances : Pharmacology, Clinical, Forensic and Analytical Toxicology. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 113-42.
4. Baumann MH, Solis E, Jr., Watterson LR, Marusich JA, Fantegrossi WE, Wiley JL. Bath salts, spice, and related designer drugs: the science behind the headlines. *J Neurosci*. 2014;34(46):15150-8.
5. Evans-Brown M, Sedefov R. Responding to New Psychoactive Substances in the European Union: Early Warning, Risk Assessment, and Control Measures. *Handb Exp Pharmacol*. 2018;252:3-49.
6. Krabseth HM, Tuv SS, Strand MC, Karinen RA, Wiik E, Vevelstad MS, et al. Nye psykoaktive stoffer. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2016;136(8):714-7.
7. Europeisk overvåkingscenter for narkotika og narkotikamisbruk (EMCDDA). Europeisk narkotikarapport 2022: Trender og utviklinger. Luxemburg: Den europeiske unions publikasjonskontor; 2022. Report No.: TDAT22001ENN.
8. Baumann MH, Partilla JS, Lehner KR. Psychoactive "bath salts": not so soothing. *Eur J Pharmacol*. 2013;698(1-3):1-5.
9. Liechti M. Novel psychoactive substances (designer drugs): overview and pharmacology of modulators of monoamine signaling. *Swiss Med Wkly*. 2015;145:w14043.
10. De Felice LJ, Glennon RA, Negus SS. Synthetic cathinones: chemical phylogeny, physiology, and neuropharmacology. *Life Sci*. 2014;97(1):20-6.
11. Nóbrega L, Dinis-Oliveira RJ. The synthetic cathinone  $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone ( $\alpha$ -PVP): pharmacokinetic and pharmacodynamic clinical and forensic aspects. *Drug Metab Rev*. 2018;50(2):125-39.
12. Costa VM, Grando LGR, Milandri E, Nardi J, Teixeira P, Mladěnka P, et al. Natural Sympathomimetic Drugs: From Pharmacology to Toxicology. *Biomolecules*. 2022;12(12).
13. Luethi D, Liechti ME. Designer drugs: mechanism of action and adverse effects. *Arch Toxicol*. 2020;94(4):1085-133.
14. Alles GA, Fairchild MD, Jensen M, Alles A. Chemical Pharmacology of *Catha Edulis*. Easton, Pa. :1961. p. 323-52.
15. Kalix P. Pharmacological properties of the stimulant khat. *Pharmacol Ther*. 1990;48(3):397-416.
16. Celastraceae. In: Aronson JK, editor. *Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition)*. Oxford: Elsevier; 2016. p. 184-90.
17. Pendl E, Pauritsch U, Kollroser M, Schmid MG. Determination of cathinone and cathine in Khat plant material by LC-MS/MS: Fresh vs. dried leaves. *Forensic Sci Int*. 2021;319:110658.

18. Aronson JK. 76 - Plant Poisons and Traditional Medicines. In: Farrar J, Hotez PJ, Junghanss T, Kang G, Lalloo D, White NJ, editors. *Manson's Tropical Infectious Diseases (Twenty-third Edition)*. London: W.B. Saunders; 2014. p. 1128-50.e6.
19. Rothman RB, Baumann MH, Dersch CM, Romero DV, Rice KC, Carroll FI, et al. Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse*. 2001;39(1):32-41.
20. Sprague JE, Riley CL, Mills EM. Chapter 36 - Body temperature regulation and drugs of abuse. In: Romanovsky AA, editor. *Handb Clin Neurol*. 157: Elsevier; 2018. p. 623-33.
21. Hyde JF, Browning E, Adams R. SYNTHETIC HOMOLOGS OF d,l-EPHEDRINE. Washington, DC :1928. p. 2287-92.
22. Kelly JP. Cathinone derivatives: a review of their chemistry, pharmacology and toxicology. *Drug Test Anal*. 2011;3(7-8):439-53.
23. Katselou M, Papoutsis I, Nikolaou P, Spiliopoulou C, Athanaselis S.  $\alpha$ -PVP ("flakka"): a new synthetic cathinone invades the drug arena. *Forensic Toxicology*. 2016;34(1):41-50.
24. Simmler LD, Buser TA, Donzelli M, Schramm Y, Dieu LH, Huwyler J, et al. Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *Br J Pharmacol*. 2013;168(2):458-70.
25. Simmler LD. Monoamine Transporter and Receptor Interaction Profiles of Synthetic Cathinones. In: Zawilska JB, editor. *Synthetic Cathinones: Novel Addictive and Stimulatory Psychoactive Substances*. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 97-115.
26. Kolesnikova TO, Khatsko SL, Demin KA, Shevyrin VA, Kalueff AV. DARK Classics in Chemical Neuroscience:  $\alpha$ -Pyrrolidinovalerophenone ("Flakka"). *ACS Chem Neurosci*. 2019;10(1):168-74.
27. Hohmann N, Mikus G, Czock D. Effects and risks associated with novel psychoactive substances: mislabeling and sale as bath salts, spice, and research chemicals. *Dtsch Arztebl Int*. 2014;111(9):139-47.
28. Simmler LD, Liechti ME. Pharmacology of MDMA- and Amphetamine-Like New Psychoactive Substances. *Handb Exp Pharmacol*. 2018;252:143-64.
29. Majchrzak M, Celiński R, Kuś P, Kowalska T, Sajewicz M. The newest cathinone derivatives as designer drugs: an analytical and toxicological review. *Forensic Toxicol*. 2018;36(1):33-50.
30. Banks ML, Worst TJ, Rusyniak DE, Sprague JE. Synthetic Cathinones ("Bath Salts"). *The Journal of Emergency Medicine*. 2014;46(5):632-42.
31. Di Chiara G. A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *J Psychopharmacol*. 1998;12(1):54-67.
32. Adinoff B. Neurobiologic processes in drug reward and addiction. *Harv Rev Psychiatry*. 2004;12(6):305-20.
33. Lüscher C, Malenka RC. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron*. 2011;69(4):650-63.
34. Laruelle M, Abi-Dargham A. Dopamine as the wind of the psychotic fire: new evidence from brain imaging studies. *J Psychopharmacol*. 1999;13(4):358-71.
35. (EMCDDA) EMCfDaDA. Report on the risk assessment of 1-phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one ( $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone,  $\alpha$ -PVP. Luxemburg: Publications Office of the European Union; 2016. Report No.: TDAK16001ENN.
36. Adamowicz P, Jurczyk A, Gil D, Szustowski S. A case of intoxication with a new cathinone derivative  $\alpha$ -PiHP - A presentation of concentrations in biological specimens. *Leg Med (Tokyo)*. 2020;42:101626.



37. Wachholz P, Celiński R, Bujak-Giżycka B, Skowronek R, Pawlas N. A fatal case of poisoning with a cathinone derivative:  $\alpha$ -PiHP and its post-mortem distribution in body fluids and organ tissues. *J Anal Toxicol*. 2023.
38. Rothman RB, Baumann MH. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol*. 2003;479(1-3):23-40.
39. Rudnick G. Mechanisms of Biogenic Amine Neurotransmitter Transporters. In: Reith MEA, editor. *Neurotransmitter Transporters: Structure, Function, and Regulation*. Totowa, NJ: Humana Press; 1997. p. 73-100.
40. Alexander SP, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, Faccenda E, Harding SD, et al. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Transporters. *Br J Pharmacol*. 2017;174 Suppl 1(Suppl Suppl 1):S360-s446.
41. Blough BE, Decker AM, Landavazo A, Namjoshi OA, Partilla JS, Baumann MH, et al. The dopamine, serotonin and norepinephrine releasing activities of a series of methcathinone analogs in male rat brain synaptosomes. *Psychopharmacology (Berl)*. 2019;236(3):915-24.
42. Sitte HH, Freissmuth M. Amphetamines, new psychoactive drugs and the monoamine transporter cycle. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(1):41-50.
43. Reith ME, Blough BE, Hong WC, Jones KT, Schmitt KC, Baumann MH, et al. Behavioral, biological, and chemical perspectives on atypical agents targeting the dopamine transporter. *Drug Alcohol Depend*. 2015;147:1-19.
44. Baumann MH, Ayestas MA, Jr., Partilla JS, Sink JR, Shulgin AT, Daley PF, et al. The designer methcathinone analogs, mephedrone and methylone, are substrates for monoamine transporters in brain tissue. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(5):1192-203.
45. Mishra A, Singh S, Shukla S. Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease. *J Exp Neurosci*. 2018;12:1179069518779829.
46. Baumann MH, Partilla JS, Lehner KR, Thorndike EB, Hoffman AF, Holy M, et al. Powerful cocaine-like actions of 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV), a principal constituent of psychoactive 'bath salts' products. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(4):552-62.
47. Negus SS, Banks ML. Decoding the Structure of Abuse Potential for New Psychoactive Substances: Structure-Activity Relationships for Abuse-Related Effects of 4-Substituted Methcathinone Analogs. *Curr Top Behav Neurosci*. 2017;32:119-31.
48. Kuropka P, Zawadzki M, Szpot P. A review of synthetic cathinones emerging in recent years (2019-2022). *Forensic Toxicol*. 2023;41(1):25-46.
49. Wee S, Anderson KG, Baumann MH, Rothman RB, Blough BE, Woolverton WL. Relationship between the serotonergic activity and reinforcing effects of a series of amphetamine analogs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;313(2):848-54.
50. Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(14):5274-8.
51. Mørland J, Jones BL, Palomares ML, Alkana RL. Morphine-6-glucuronide: a potent stimulator of locomotor activity in mice. *Life Sci*. 1994;55(8):P1163-8.
52. Andersen JM, Ripel A, Boix F, Normann PT, Mørland J. Increased locomotor activity induced by heroin in mice: pharmacokinetic demonstration of heroin acting as a prodrug for the mediator 6-monoacetylmorphine in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;331(1):153-61.
53. Wojcieszak J, Andrzejczak D, Wojtas A, Gołembiowska K, Zawilska JB. Methcathinone and 3-Fluoromethcathinone Stimulate Spontaneous Horizontal Locomotor Activity in Mice and Elevate Extracellular Dopamine and Serotonin Levels in the Mouse Striatum. *Neurotox Res*. 2019;35(3):594-605.

54. Glatfelter GC, Walther D, Evans-Brown M, Baumann MH. Eutylone and Its Structural Isomers Interact with Monoamine Transporters and Induce Locomotor Stimulation. *ACS Chem Neurosci*. 2021;12(7):1170-7.
55. Nadal-Gratacós N, Lleixà E, Gibert-Serramià M, Estrada-Tejedor R, Berzosa X, Batllori X, et al. Neuropsychopharmacology of Emerging Drugs of Abuse: meta- and para-Halogen-Ring-Substituted  $\alpha$ -PVP ("flakka") Derivatives. *Int J Mol Sci*. 2022;23(4).
56. Kelley AE. Measurement of rodent stereotyped behavior. *Curr Protoc Neurosci*. 2001;Chapter 8:Unit 8.
57. Glatfelter GC, Pottie E, Partilla JS, Sherwood AM, Kaylo K, Pham DNK, et al. Structure-Activity Relationships for Psilocybin, Baeocystin, Aeruginascin, and Related Analogues to Produce Pharmacological Effects in Mice. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2022;5(11):1181-96.
58. Pedersen-Bjergaard S, Gammelgaard B, Halvorsen TG. Introduction to pharmaceutical analytical chemistry. Second edition. ed. Hoboken, NJ: Wiley; 2019.
59. Hansen SH, Pedersen-Bjergaard S. Bioanalysis of pharmaceuticals : sample preparation, separation techniques, and mass spectrometry. West Sussex, England: Wiley; 2015.
60. Gray EG, Whittaker VP. The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat*. 1962;96(Pt 1):79-88.
61. Whittaker VP, Michaelson IA, Kirkland RJ. The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'). *Biochem J*. 1964;90(2):293-303.
62. Siegel GJ. Basic neurochemistry : molecular, cellular, and medical aspects. Place of publication not identified: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
63. Jhou JF, Tai HC. The Study of Postmortem Human Synaptosomes for Understanding Alzheimer's Disease and Other Neurological Disorders: A Review. *Neurol Ther*. 2017;6(Suppl 1):57-68.
64. Tuv SS, Bergh MS, Andersen JM, Steinsland S, Vindenes V, Baumann MH, et al. Comparative Neuropharmacology and Pharmacokinetics of Methamphetamine and Its Thiophene Analog Methiopropamine in Rodents. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21).
65. Mariussen E, Fonnum F. The effect of polychlorinated biphenyls on the high affinity uptake of the neurotransmitters, dopamine, serotonin, glutamate and GABA, into rat brain synaptosomes. *Toxicology*. 2001;159(1-2):11-21.
66. Rothman RB, Lewis B, Dersch C, Xu H, Radesca L, de Costa BR, et al. Identification of a GBR12935 homolog, LR1111, which is over 4,000-fold selective for the dopamine transporter, relative to serotonin and norepinephrine transporters. *Synapse*. 1993;14(1):34-9.
67. Bogen IL, Haug KH, Myhre O, Fonnum F. Short- and long-term effects of MDMA ("ecstasy") on synaptosomal and vesicular uptake of neurotransmitters in vitro and ex vivo. *Neurochem Int*. 2003;43(4-5):393-400.
68. Gannon BM, Baumann MH, Walther D, Jimenez-Morigosa C, Sulima A, Rice KC, et al. The abuse-related effects of pyrrolidine-containing cathinones are related to their potency and selectivity to inhibit the dopamine transporter. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43(12):2399-407.
69. Fleckenstein AE, Haughey HM, Metzger RR, Kokoshka JM, Riddle EL, Hanson JE, et al. Differential effects of psychostimulants and related agents on dopaminergic and serotonergic transporter function. *Eur J Pharmacol*. 1999;382(1):45-9.
70. Cozzi NV, Sievert MK, Shulgin AT, Jacob P, 3rd, Ruoho AE. Inhibition of plasma membrane monoamine transporters by beta-ketoamphetamines. *Eur J Pharmacol*. 1999;381(1):63-9.

71. Cozzi NV, Brandt SD, Daley PF, Partilla JS, Rothman RB, Tulzer A, et al. Pharmacological examination of trifluoromethyl ring-substituted methcathinone analogs. *Eur J Pharmacol.* 2013;699(1-3):180-7.
72. Graham DL, Meyer JS, Stanwood GD. Chapter 25 - Behavioral Phenotyping in Developmental Neurotoxicology—Simple Approaches Using Unconditioned Behaviors in Rodents. In: Slikker W, Paule MG, Wang C, editors. *Handbook of Developmental Neurotoxicology (Second Edition)*: Academic Press; 2018. p. 287-308.
73. Gatch MB, Rutledge MA, Forster MJ. Discriminative and locomotor effects of five synthetic cathinones in rats and mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2015;232(7):1197-205.
74. Baumann MH, Clark RD, Rothman RB. Locomotor stimulation produced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is correlated with dialysate levels of serotonin and dopamine in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008;90(2):208-17.
75. Baumann MH, Clark RD, Woolverton WL, Wee S, Blough BE, Rothman RB. In vivo effects of amphetamine analogs reveal evidence for serotonergic inhibition of mesolimbic dopamine transmission in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;337(1):218-25.
76. Schindler CW, Thorndike EB, Goldberg SR, Lehner KR, Cozzi NV, Brandt SD, et al. Reinforcing and neurochemical effects of the "bath salts" constituents 3,4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV) and 3,4-methylenedioxy-N-methylcathinone (methylone) in male rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2016;233(10):1981-90.
77. Bauer CT, Banks ML, Blough BE, Negus SS. Use of intracranial self-stimulation to evaluate abuse-related and abuse-limiting effects of monoamine releasers in rats. *Br J Pharmacol.* 2013;168(4):850-62.
78. Wee S, Woolverton WL. Self-administration of mixtures of fenfluramine and amphetamine by rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;84(2):337-43.
79. Gatch MB, Taylor CM, Forster MJ. Locomotor stimulant and discriminative stimulus effects of 'bath salt' cathinones. *Behav Pharmacol.* 2013;24(5-6):437-47.
80. Cone EJ, Huestis MA. Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1098:51-103.
81. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 91696119, 3-Methylethcathinone [internet][cited 2023 10. May]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91696119>.
82. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 1576, Methcathinone 2023 [internet][cited 2023 10. May]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1576>.
83. Derendorf H, Schmidt S, Rowland M. Rowland and Tozer's clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics : concepts and applications. Fifth edition. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2020. 939 p.
84. Bin Jordan YA, Mohamed K, Abbas N, El-Gendy M, Alsaif N, Alanazi M, et al. Development and validation of GC-MS method for determination of methcathinone and its main metabolite in mice plasma and brain tissue after SPE: Pharmacokinetic and distribution study. *J Pharm Biomed Anal.* 2021;194:113798.
85. Liu D, Zhang E, Zhao M, Tian Y, Yang M, Wang Y. Pharmacokinetics and tissue distribution of methcathinone in rabbits. *Leg Med (Tokyo).* 2021;51:101876.
86. Anneken JH, Angoa-Pérez M, Sati GC, Crich D, Kuhn DM. Dissecting the Influence of Two Structural Substituents on the Differential Neurotoxic Effects of Acute Methamphetamine and Mephedrone Treatment on Dopamine Nerve Endings with the Use of 4-Methylmethamphetamine and Methcathinone. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017;360(3):417-23.
87. Anneken JH, Angoa-Perez M, Sati GC, Crich D, Kuhn DM. Assessing the role of dopamine in the differential neurotoxicity patterns of methamphetamine, mephedrone, methcathinone and 4-methylmethamphetamine. *Neuropharmacology.* 2018;134(Pt A):46-56.

88. Anneken JH, Angoa-Perez M, Sati GC, Crich D, Kuhn DM. Dissociation between hypothermia and neurotoxicity caused by mephedrone and methcathinone in TPH2 knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2019;236(3):1097-106.
89. Manke HN, Nelson KH, Vlachos A, Bailey JM, Maradiaga KJ, Weiss TD, et al. Assessment of aversive effects of methylone in male and female Sprague-Dawley rats: Conditioned taste avoidance, body temperature and activity/stereotypies. *Neurotoxicol Teratol*. 2021;86:106977.
90. Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C. Laboratory routines cause animal stress. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2004;43(6):42-51.
91. Malberg JE, Seiden LS. Small changes in ambient temperature cause large changes in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced serotonin neurotoxicity and core body temperature in the rat. *J Neurosci*. 1998;18(13):5086-94.
92. Dafters RI. Effect of ambient temperature on hyperthermia and hyperkinesia induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy") in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1994;114(3):505-8.
93. Miller ML, Creehan KM, Angrish D, Barlow DJ, Houseknecht KL, Dickerson TJ, et al. Changes in ambient temperature differentially alter the thermoregulatory, cardiac and locomotor stimulant effects of 4-methylmethcathinone (mephedrone). *Drug Alcohol Depend*. 2013;127(1-3):248-53.
94. Wright MJ, Jr., Angrish D, Aarde SM, Barlow DJ, Buczynski MW, Creehan KM, et al. Effect of ambient temperature on the thermoregulatory and locomotor stimulant effects of 4-methylmethcathinone in Wistar and Sprague-Dawley rats. *PLoS One*. 2012;7(8):e44652.
95. Myles BJ, Jarrett LA, Broom SL, Speaker HA, Sabol KE. The effects of methamphetamine on core body temperature in the rat--part 1: chronic treatment and ambient temperature. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008;198(3):301-11.
96. Miller ML, Moreno AY, Aarde SM, Creehan KM, Vandewater SA, Vaillancourt BD, et al. A methamphetamine vaccine attenuates methamphetamine-induced disruptions in thermoregulation and activity in rats. *Biol Psychiatry*. 2013;73(8):721-8.
97. Nelson KH, Manke HN, Imanalieva A, Rice KC, Riley AL. Sex differences in  $\alpha$ -pyrrolidinopentiophenone ( $\alpha$ -PVP)-induced taste avoidance, place preference, hyperthermia and locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2019;185:172762.
98. Nelson KH, Hempel BJ, Clasen MM, Rice KC, Riley AL. Conditioned taste avoidance, conditioned place preference and hyperthermia induced by the second generation 'bath salt'  $\alpha$ -pyrrolidinopentiophenone ( $\alpha$ -PVP). *Pharmacol Biochem Behav*. 2017;156:48-55.
99. Marusich JA, Antonazzo KR, Wiley JL, Blough BE, Partilla JS, Baumann MH. Pharmacology of novel synthetic stimulants structurally related to the "bath salts" constituent 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV). *Neuropharmacology*. 2014;87:206-13.
100. Kolanos R, Sakloth F, Jain AD, Partilla JS, Baumann MH, Glennon RA. Structural Modification of the Designer Stimulant  $\alpha$ -Pyrrolidinovalerophenone ( $\alpha$ -PVP) Influences Potency at Dopamine Transporters. *ACS Chem Neurosci*. 2015;6(10):1726-31.
101. Eshleman AJ, Wolfrum KM, Reed JF, Kim SO, Swanson T, Johnson RA, et al. Structure-Activity Relationships of Substituted Cathinones, with Transporter Binding, Uptake, and Release. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017;360(1):33-47.
102. Kolaczynska KE, Thomann J, Hoener MC, Liechti ME. The Pharmacological Profile of Second Generation Pyrovalerone Cathinones and Related Cathinone Derivative. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15).
103. Wojcieszak J, Andrzejczak D, Wojtas A, Gołembowska K, Zawilska JB. Effects of the new generation  $\alpha$ -pyrrolidinophenones on spontaneous locomotor activities in mice, and on extracellular dopamine and serotonin levels in the mouse striatum. *Forensic Toxicol*. 2018;36(2):334-50.

104. Giannotti G, Canazza I, Caffino L, Bilel S, Ossato A, Fumagalli F, et al. The Cathinones MDPV and  $\alpha$ -PVP Elicit Different Behavioral and Molecular Effects Following Acute Exposure. *Neurotox Res.* 2017;32(4):594-602.
105. Marusich JA, Grant KR, Blough BE, Wiley JL. Effects of synthetic cathinones contained in "bath salts" on motor behavior and a functional observational battery in mice. *Neurotoxicology.* 2012;33(5):1305-13.
106. Aarde SM, Creehan KM, Vandewater SA, Dickerson TJ, Taffe MA. In vivo potency and efficacy of the novel cathinone  $\alpha$ -pyrrolidinopentiophenone and 3,4-methylenedioxypyrovalerone: self-administration and locomotor stimulation in male rats. *Psychopharmacology.* 2015;232(16):3045-55.
107. Shetty RA, Hoch AC, Sumien N, Forster MJ, Gatch MB. Comparison of locomotor stimulant and drug discrimination effects of four synthetic cathinones to commonly abused psychostimulants. *J Psychopharmacol.* 2023:2698811221142566.
108. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 59809191, 4-Methyl-1-phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one [internet][cited 2023 10. May]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/59809191>.
109. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 11148955, alpha-Pyrrolidinovalerophenone 2023 [internet][cited 2023 10. May]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11148955>.
110. Taffe MA, Nguyen JD, Vandewater SA, Grant Y, Dickerson TJ. Effects of  $\alpha$ -pyrrolidino-phenone cathinone stimulants on locomotor behavior in female rats. *Drug Alcohol Depend.* 2021;227:108910.
111. Mehan AO, Esteban B, O'Shea E, Elliott JM, Colado MI, Green AR. The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') to rats. *Br J Pharmacol.* 2002;135(1):170-80.
112. Bryda EC. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Mo Med.* 2013;110(3):207-11.
113. Jenden DJ. Difficulties in using animal data to predict pharmacological response in man. *Neurosci Biobehav Rev.* 1991;15(1):105-7.

# Vedlegg A – Skåringskjema for evaluering av smerte og humane endepunkter

Evaluation of pain and definition of human endpoint FOTS 29696

Parameters	State	Score	Date	Date	Date	Date	Date	Date
<b>Appearance /hydration status</b>	Normal, normal skin tent and posture	1						
	Slight skin tent present on dorsum	2						
	Moderate skin tent, hunched posture, piloerection present	3						
	Severe skin tent, eyes sunken in, piloerection	4						
<b>Natural behavior</b>	Normal, active in cage prior to and during handling, nesting, sleeping in groups	1						
	Decreased activity, isolated but alert, responsive to handling, labored breathing	2						
	Lethargic, isolated, decrease resistance to handling, increased or decreased respiration rates	3						
	Nonresponsive, mouse only moves when touched, vocalization, dyspnea, open mouth breathing	4						
<b>Body weight</b>	Loss $\leq 5$	1						
	Loss 6-10%	2						
	Loss 11-14%	3						
	Loss $\geq 15\%$ or 10% within 24 h	4						
<b>Injection site for temperature transponder</b>	No or minor wound on injection site	1						
	Small wound/irritation on injection site light erythema, mild edema	2						
	Enlarged wound on injection site mild erythema/edema	3						
	Open wound on injection site, severe erythema/edema purulent exudate	4						

#### Total score

4 - 5	proceed with the planned experiment
6 - 10	pay close attention; provide supplementary care, e.g. extra fluids, wet food, analgesia treatment, review progress with veterinarian
11 - 12	supplementary care, consider euthanasia
≥ 12	human endpoint/euthanasia

- Single score = 2 closely monitor health status/consider supportive actions /contact group leader
- Single score = 3 closely monitor health status/ supportive actions/contact group leader/ consider euthanasia
- Single score = 4 or 3 (respiratory distress/dyspnea) human endpoint/euthanasia

#### **Supportive actions**

##### In case of wound infection

- Consider local antibiotics treatment (Bacimycin, 2-3 times a day for 5 days). Antibiotics treatment should be used only when necessary. Consider sacrifice in case of the progressive or severe infection.
- Consider temporal isolation in case of co-habitant's behavior cause poor wound healing.

# Vedlegg B – UHPLC-MS/MS

## Oversikt over konsentrasjonene til kontrollene

**Tabell 1** Kontroll 1–4 ble benyttet i prøveopparbeidelse av blod og hjernehomogenat

	<b>Kontroll 1 (nM)</b>	<b>Kontroll 2 (nM)</b>	<b>Kontroll 3 (nM)</b>	<b>Kontroll 4 (nM)</b>
<b>3-MEC</b>	5	23	3000	6010
<b>Metkatinon</b>	6	30	4000	8010
<b><math>\alpha</math>-PiHP</b>	6	30	4000	8000
<b><math>\alpha</math>-PVP</b>	6	30	4000	8000

## Oversikt over konsentrasjonene til standardene

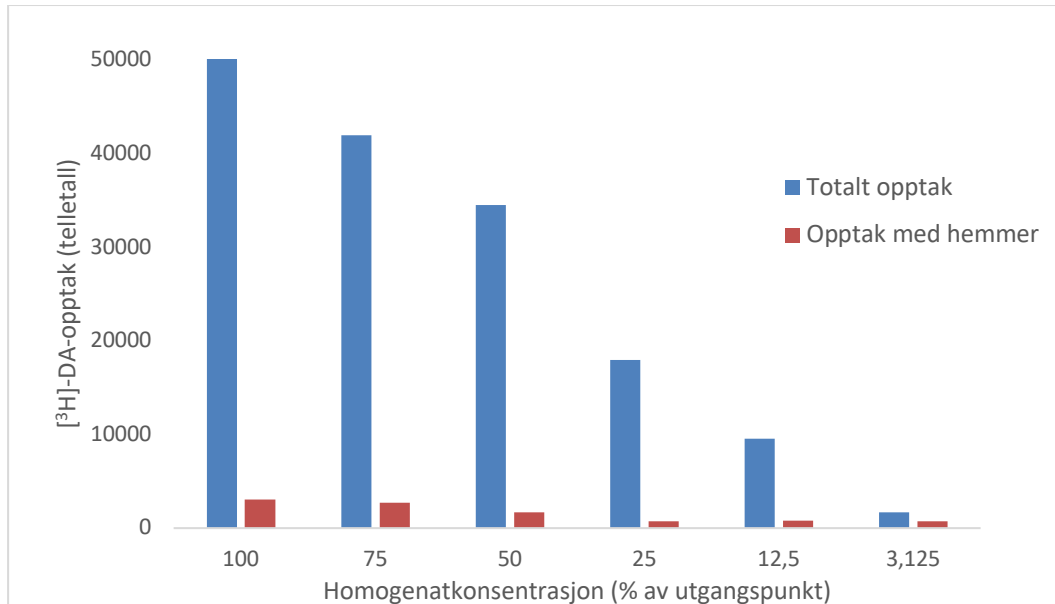
**Tabell 2** Standard ½–6 ble benyttet i prøveopparbeidelse av blod og standard ½–7 ble benyttet i prøveopparbeidelse av hjernehomogenat.

	<b>STD ½ (nM)</b>	<b>STD 1 (nM)</b>	<b>STD 2 (nM)</b>	<b>STD 3 (nM)</b>	<b>STD 4 (nM)</b>	<b>STD 5 (nM)</b>	<b>STD 5 ½ (nM)</b>	<b>STD 6 (nM)</b>	<b>STD 7 (nM)</b>
<b>3-MEC</b>	4	8	19	40	80	750	3750	7500	18750
<b>Metkatinon</b>	5	10	25	50	100	1000	5000	10010	25020
<b><math>\alpha</math>-PiHP</b>	5	10	25	50	100	1000	5010	10010	25030
<b><math>\alpha</math>-PVP</b>	5	10	25	50	100	1000	5000	10000	26010

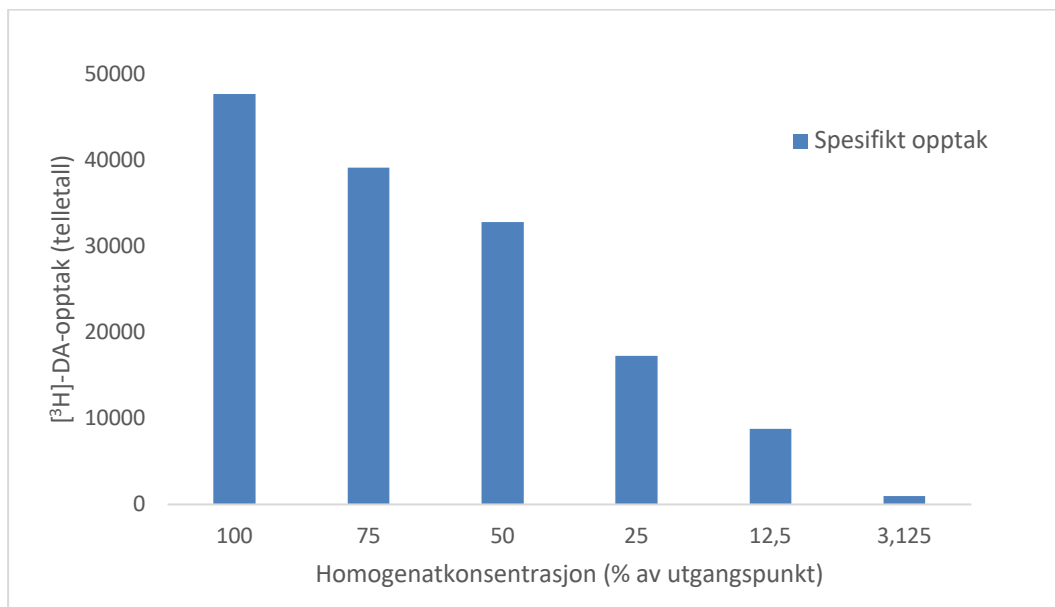


# Vedlegg C – Linearitet mellom vevskonsentrasjon og opptak

## Resultater DA-opptak

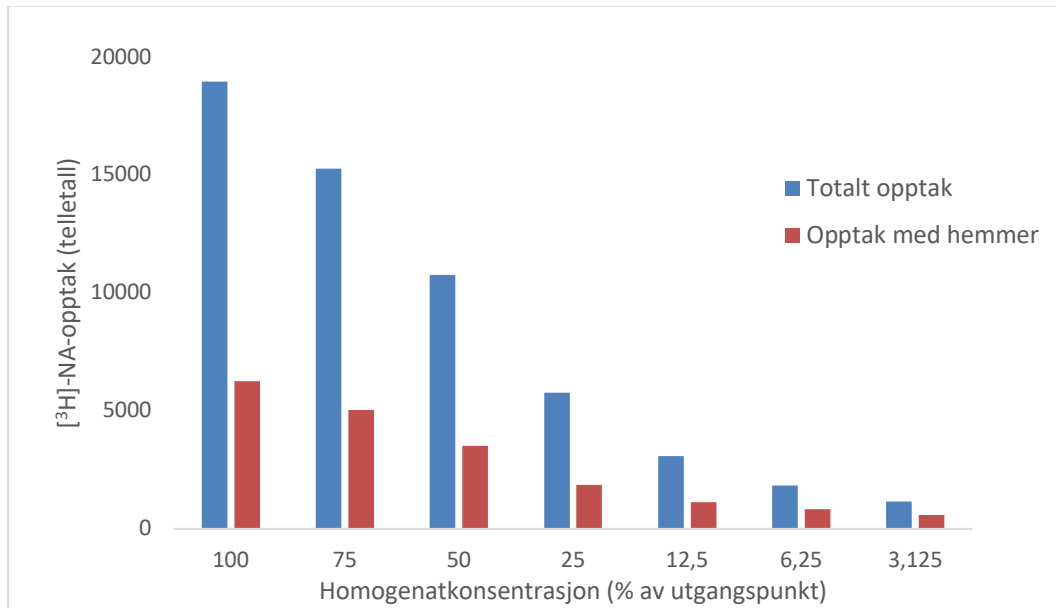


**Figur 5** Uspesifikt opptak av [<sup>3</sup>H]-DA med og uten hemmer ved ulike vevskonsentrasjoner

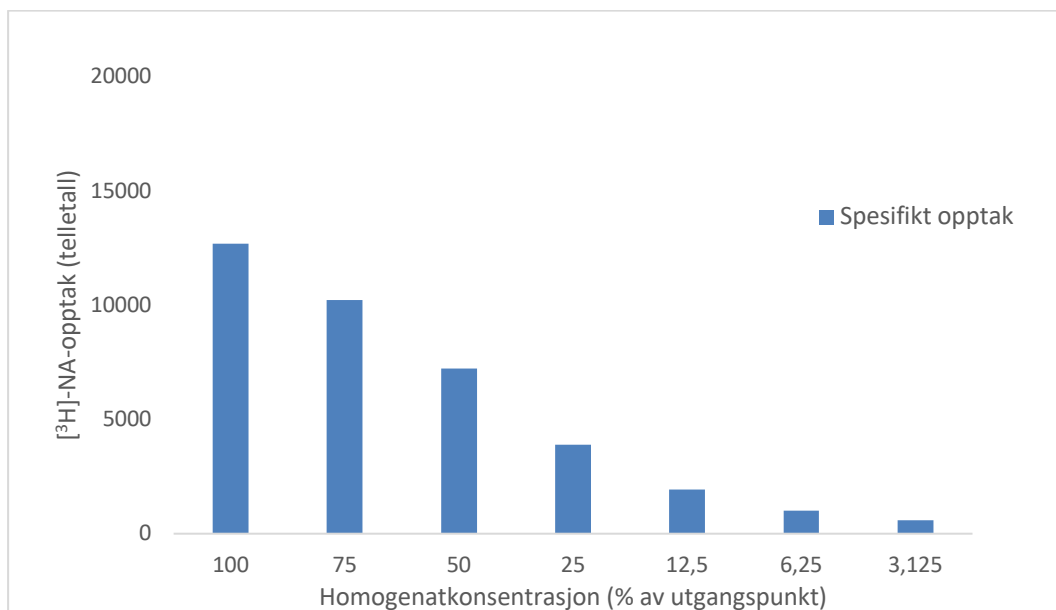


**Figur 6** Spesifikt opptak av [<sup>3</sup>H]-DA

## Resultater NA-opptak

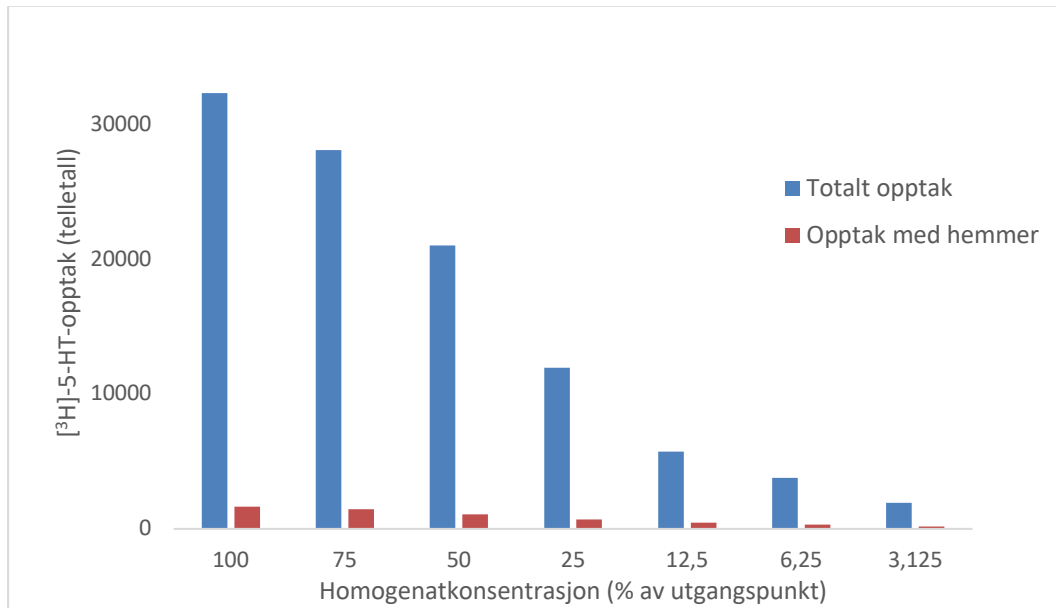


**Figur 7** Uspesifikt opptak av [<sup>3</sup>H]-NA med og uten hemmer ved ulike vevskonsentrasjoner

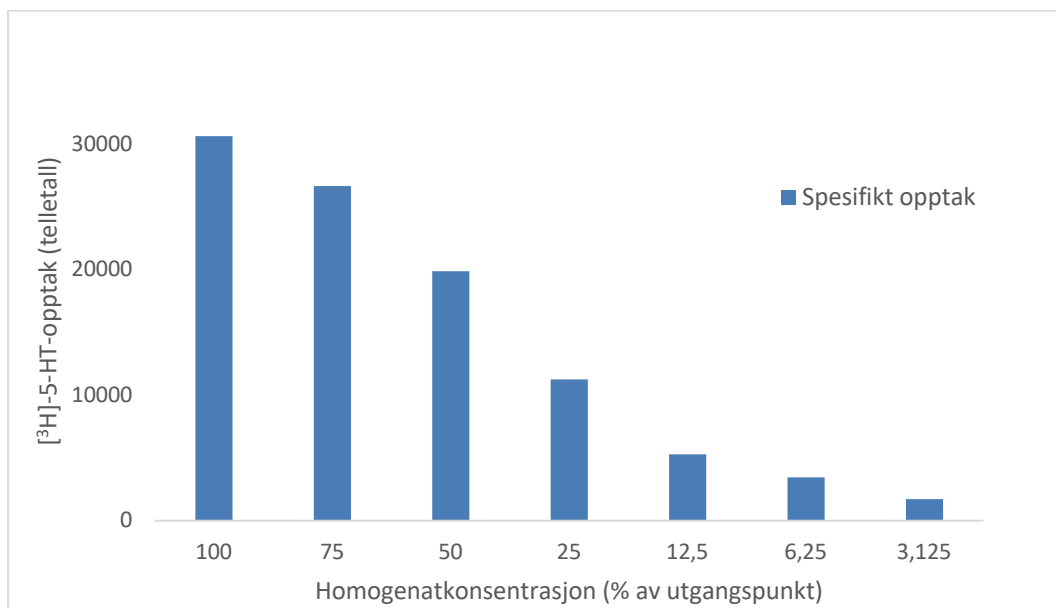


**Figur 8** Spesifikt opptak av [<sup>3</sup>H]-NA

## Resultater 5-HT-opptak



**Figur 9** Uspesifikt opptak av [<sup>3</sup>H]-5-HT med og uten hemmer ved ulike vevskonsentrasjoner



**Figur 10** Spesifikt opptak av [<sup>3</sup>H]-5-HT

## Konklusjon

Forholdet mellom totalt opptak av DA og opptak med hemmer er høyt. Jo høyere ratioen er, jo mer er det sikkert at dopamintransportøren (DAT) ble hemmet. Spesifikt opptak viser hvor stort reopptaket er av dopamin gjennom DAT. Spesifikt opptak viser også at det er en lineær sammenheng mellom vevskonsentrasjon og opptak. Høye telletall av spesifikt opptak viser at det ble tilsatt nok radioaktivt substrat. Fortynnet vev til 25% (4 mL per utgangsvekt gram hjerne) ga høyt nok ratio av totalt opptak og opptak med hemmer til at vevskonsentrasjonen ble brukt videre i forsøkene.

Den samme konklusjonen gjelder også for NA og 5-HT-opptak.

## Vedlegg D – Observert stereotypisk adferd

Dose (mg/kg)	15 min	30 min
<b>3-MEC 2,5</b>	-	-
<b>3-MEC 10</b>	-	-
<b>3-MEC 15</b>	Pusser seg.	Går i rundt seg selv i sirkler.
<b>3-MEC 20</b>	Rykker framover.	Vasker seg.
<b>3-MEC 25</b>	-	-
<b>3-MEC 30</b>	Pusser seg.	Rykker framover.
<b>MK 1</b>	-	-
<b>MK 2,5</b>	-	-
<b>MK 5</b>	Snuser rundt, reiser seg på bakbena inntil veggen, rykker fram.	-
<b>MK 7,5</b>	-	Vasker seg, rykker fram.
<b>MK 10</b>	-	-
<b>MK 12,5</b>	Reiser seg på bakbena inntil veggen.	-
<b>MK 25</b>	-	Gnaging på gulvet.
<b><math>\alpha</math>-PiHP 1</b>	-	-
<b><math>\alpha</math>-PiHP 2,5</b>	-	-
<b><math>\alpha</math>-PiHP 5</b>	-	Reiser seg på bakbena inntil veggen, vasker seg, rykker fram og til siden med hodet.
<b><math>\alpha</math>-PiHP 7,5</b>	Gnager på veggen.	Gnager på veggen.
<b><math>\alpha</math>-PiHP 10</b>	-	-
<b><math>\alpha</math>-PiHP 12,5</b>	Rygger og gnager på veggen.	Rygger og gnager på veggen.
<b><math>\alpha</math>-PiHP 15</b>	Gnager på gulvet.	-
<b><math>\alpha</math>-PVP 0,5</b>	-	-
<b><math>\alpha</math>-PVP 1</b>	-	Reiser seg på bakbena inntil veggen.
<b><math>\alpha</math>-PVP 1,75</b>	-	Rykker fram og tilbake, reiser seg på bakbena
<b><math>\alpha</math>-PVP 2,5</b>	Pusser seg.	Reiser seg på bakbena inntil veggen, pusser seg, beveger hodet fort opp og ned.
<b><math>\alpha</math>-PVP 3,75</b>	Gnager på veggen.	-
<b><math>\alpha</math>-PVP 5</b>	Skraper på veggen i hjørnet og gnager på gulv og vegg.	Gnager på veggen i hjørnet, rykker framover.
<b><math>\alpha</math>-PVP 7,5</b>	Rygger og rykker framover.	Gnager på gulvet.
<b><math>\alpha</math>-PVP 10</b>	Gnager på gulvet.	Rygger, er sammenkrøpet, prøver å reise seg, men sjangler. Står oppreist på bakbena inntil veggen og snuser.



