

**ANALIZA TOKSYKOLOGICZNA NOWYCH
SUBSTANCJI PSYCHOAKTYWNYCH (NSP)
I OCENA ICH TOKSYCZNEGO DZIAŁANIA
NA ORGANIZM LUDZKI**

Autoreferat

Dr Piotr Adamowicz

Kraków 2016

Dr Piotr Adamowicz

Miejsce zatrudnienia

Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
31-033 Kraków

Wykształcenie

Uniwersytet Jagielloński (2004)

Wydział Chemii

Stopień naukowy: doktor nauk chemicznych

Praca doktorska pt. „Zastosowanie technik chromatograficznych z detekcją mas w oznaczaniu ketaminy i norketaminy dla potrzeb toksykologii sądowej”

Uniwersytet Jagielloński (1997 – 1999)

Wydział Chemii

Stopień naukowy: magister ochrony środowiska

Praca magisterska pt. „Rozdzielanie enancjomerów amfetaminy metodami wysokosprawnej chromatografii cieczowej”

Uniwersytet Jagielloński (1995 – 1997)

Wydział Chemii

Stopień naukowy: licencjat ochrony środowiska

Praca licencjacka pt. „Odurzające i środowiskowe działanie rozpuszczalników organicznych”

Doświadczenie zawodowe

Instytut Ekspertyz Sądowych (od 2000 r.)

01.2005 – nadal – Adiunkt

03.2004 – nadal – Biegły IES z zakresu toksykologii leków i trucizn organicznych

01.2003 – 12.2004 – Asystent

09.2001 – 12.2002 – Chemik

01.2000 – 09.2001 – Stażysta chemik

University of Illinois at Chicago (2001 – 2002 r.)

02.2002 – 09.2002 – Visiting Research Specialist in Health Sciences (Forensic Toxicology Laboratory, Department of Psychiatry)

10.2001 – 09.2002 – Visiting Research Specialist in Pharmaceutical Sciences (Forensic Toxicology Laboratory, Department of Pharmaceutics and Pharmacodynamics)

Wytwórnia Euceryny Laboratorium Farmaceutyczne „COEL” (1998 – 1999 r.)

04.1998 – 12.1999 – Pracownik Działu Kontroli Jakości Leków

WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI

„ANALIZA TOKSYKOLOGICZNA NOWYCH SUBSTANCJI PSYCHOAKTYWNYCH (NSP) I OCENA ICH TOKSYCZNEGO DZIAŁANIA NA ORGANIZM LUDZKI”

Podstawę habilitacji stanowi cykl piętnastu prac opublikowanych w latach 2013-2016 o sumarycznym **IF** (*Impact Factor* wg Journal Citation Reports JCR) wynoszącym **27,53** (**MNiSW 360** pkt.). W dwunastu pracach jestem pierwszym autorem, a w trzech drugim. W trzynastu pracach jestem autorem korespondencyjnym.

[H1] **Adamowicz P.**, Tokarczyk B, Stanaszek R, Slopianka M. Fatal mephedrone intoxication - A case report. *Journal of Analytical Toxicology*, 2013, 37, 37-42.

IF: **2,627**, MNiSW: **25**

[H2] **Adamowicz P.**, Tokarczyk B. Simple and rapid screening procedure for 143 new psychoactive substances by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test Analysis*, 2015, DOI: 10.1002/dta.1815.

IF: **2,506**, MNiSW: **25**

[H3] **Adamowicz P.**, Wrzesień W. Simple approach for evaluation of matrix effect in the mass spectrometry of synthetic cannabinoids. *Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 8, 1-9, DOI: 10.7868/S0044450216080028.

IF: **0,479**, MNiSW: **15**

[H4] Zuba D., **Adamowicz P.** Distinction of constitutional isomers of mephedrone by chromatographic and spectrometric methods. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 2016, DOI: 10.1080/00450618.2016.1167240.

IF: **0,583**, MNiSW: **15**

[H5] **Adamowicz P.**, Gieroń J., Gil D., Lechowicz W., Skulska A., Tokarczyk B. The prevalence of new psychoactive substances in biological material - A three-year review of casework in Poland. *Drug Test Analysis*, 2016, 8, 64-71.

IF: **2,506**, MNiSW: **25**

[H6] **Adamowicz P.**, Gieroń J., Gil D., Lechowicz W., Skulska A., Tokarczyk B. 3-methylmethcathinone (3-MMC) - Interpretation of blood concentrations based on analysis of 95 cases, *Journal of Analytical Toxicology*, 2016 DOI: 10.1093/jat/bkw018.

IF: **2,858**, MNiSW: **30**

[H7] Adamowicz P., Gieroń J., Gil D., Lechowicz W., Skulska A., Tokarczyk B., Zuba D. Blood concentrations of α -pyrrolidinovalerophenone (α -PVP) determined in 66 forensic samples. *Forensic Toxicology*, 2016, 1-8, DOI: 10.1007/s11419-016-0306-0.

IF: -, MNiSW: - (IF czasopisma w 2013 r.: 5,756)

[H8] Adamowicz P., Zuba D., Byrska B. Fatal intoxication with 3-methyl-N-methylcathinone (3-MMC) and 5-(2-aminopropyl)benzofuran (5-APB). *Forensic Science International*, 2014, 245C, 126-132.

IF: 2,140, MNiSW: 30

[H9] Zuba D., Adamowicz P., Byrska B. Detection of buphedrone in biological and non-biological material - Two case reports. *Forensic Science International*, 2013, 227, 15-20.

IF: 2,115, MNiSW: 30

[H10] Gil D., Adamowicz P., Skulska A., Tokarczyk B., Stanaszek R. Analysis of 4-MEC in biological and non-biological material - three case reports. *Forensic Science International*, 2013 228, e11-e15.

IF: 2,115, MNiSW: 30

[H11] Adamowicz P., Gil D., Skulska A., Tokarczyk B. Analysis of MDPV in blood-determination and interpretation. *Journal of Analytical Toxicology*, 2013, 37, 308-312.

IF: 2,627, MNiSW: 20

[H12] Adamowicz P., Zuba D. Fatal intoxication with methoxetamine. *Journal of Forensic Sciences*, 2015, 60 Suppl 1, S264-S268.

IF: 1,306, MNiSW: 25

[H13] Adamowicz P., Zuba D., Sekuła K. Analysis of UR-144 and its pyrolysis product in blood and their metabolites in urine. *Forensic Science International*, 2013, 233, 320-327.

IF: 2,115, MNiSW: 30

[H14] Adamowicz P., Lechowicz W. The influence of synthetic cannabinoid UR-144 on human psychomotor performance - A case report demonstrating road traffic risks. *Traffic Injury Prevention*, 2015, 16, 754-759.

IF: 1,413, MNiSW: 20

[H15] Adamowicz P. Fatal intoxication with synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA. *Forensic Science International*, 2016, 261, e5-e10.

IF: 2,140, MNiSW: 40

***Indeks Hirscha* dorobku naukowego na dzień 20.04.2016: 8**

Liczba cytowań na dzień 20.04.2016: 186

Łączny *Impact Factor* dorobku naukowego: 32,921

Łączna liczba punktów MNiSW dla całego dorobku naukowego: 531,5

OMÓWIENIE TEMATYKI I CELU BADAŃ ORAZ UZYSKANYCH WYNIKÓW PRAC ZAWARTYCH W JEDNOTEMATYCZNYM BLOKU PUBLIKACJI

Wykaz skrótów

2C-B – 2-(4-bromo-2,5-dimetoksyfenylo)etanoamina
2-DPMP – dezoksypipradrol
2-MMC – 2-metylometkatynon
3-MMC – 3-metylometkatynon; metafedron
4-MEC – 4-metyloetylokatynon
4-MMC – 4-metylometkatynon; mefedron
5-APB – 5-(2-aminopropylo)benzofuran
 α -PVP – α -pirolidynopentiofenon
BZP – 1-benzylpiperazyna
DAD – detektor szeregu diod
dMRM – dynamiczne monitorowanie wybranych reakcji
ELISA – test immunoenzymatyczny
EMCDDA – Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii
EWS – System Wczesnego Ostrzegania UE
FTIR – spektrometria w podczerwieni z transformacją Fouriera
GC-EI-MS – chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas z jonizacją elektronową
GC-MS – chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas
HPLC-DAD – wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją diodową
IS – wzorzec wewnętrzny
JWH-018 – naftalen-1-ylo(1-pentylo-1H-indol-3-ylo)metanon
LC – chromatografia cieczowa
LC-MS – chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas
LC-MS/MS – chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas
LC-QQQ-MS – chromatograf cieczowy połączony ze spektrometrem mas z potrójnym kwadrupolem
LC-QTOF-MS – chromatograf cieczowy połączony ze spektrometrem mas z hybrydowym detektorem typu kwadrupol-analizator czasu przelotu
LOD – granica wykrywalności
LOL – zakres liniowości
LOQ – granica oznaczalności
LSD – dietyloamid kwasu D-lizergowego
mCPP – meta-chlorofenylopiiperazyna
MDA – 3,4-metylenodioksyamfetamina
MDPBP – 3',4'-metylenodioksy- α -pirolidinobutyrofenon
MDMA – 3,4-metylenodioksyamfetamina
MDMB-CHMICA – 2-[[1-(cykloheksylo-metylo)-1H-indolo-3-ylo]formamido]-3,3-dimetylo-maślan metylu
MDPV – 3,4-metylenodioksy-pirowaleron
MPA – metiopropamina
MRM – monitorowanie wybranych reakcji
MS – spektrometria mas
MXE – metoksetamina
NBOMe – N-metoksybenzylowe pochodne fenetyloamin z grupy 2C
NMR – spektrometria magnetycznego rezonansu jądrowego
NSP – nowe substancje psychoaktywne
OUN – ośrodkowy układ nerwowy
PMA – para-metoksyamfetamina
PMMA – para-metoksyamfetamina
RRT – względny czas retencji
STS-135 – N-(adamantan-1-yl)-1-(5-fluoropentyl)-1H-indolo-3-karboksamid
SWGTOX - Naukowa Grupa Robocza ds. Toksykologii Sądowej
THC – Δ^9 -tetrahydrokannabinol
THCCOOH – 11-nor-9-karboksy- Δ^9 -tetrahydrokannabinol
UR-144 – (1-pentyloindolo-3-ylo)(2,2,3,3-tetrametylocyklopropylo)metanon
XLR-11 – (1-(5-fluoropentyl)-1H-indolo-3-yl)(2,2,3,3-tetrametylocyklopropylo)metanon

WPROWADZENIE

Tematyka badań zawartych w głównym bloku publikacji dotyczyła opracowania czułych metod analitycznych pozwalających na jednoznaczną identyfikację i oznaczenie nowych substancji psychoaktywnych (NSP) w materiale biologicznym (głównie we krwi pobranej od osób przyjmujących te środki) oraz oceny objawów działania NSP przy wyznaczonym ich stężeniu w płynach ustrojowych. W publikacjach podjęto także próby określenia wpływu NSP na sprawność psychomotoryczną. Uzyskane wyniki badań dostarczyły również danych epidemiologicznych odnośnie rodzaju najczęściej przyjmowanych NSP w Polsce, w tym powodujących zatrucia ostre i/lub śmiertelne oraz schematów ich przyjmowania.

Narkotyki projektowane

Wzrost liczby nowych substancji pojawiających się na rynku narkotykowym został zaobserwowany w latach 80. i 90. ubiegłego wieku, kiedy to do obrotu wprowadzono wiele pochodnych fenetyloaminy oraz tryptaminy. Bardzo duża liczba tych związków, określanych jako 'narkotyki projektowane' (*designer drugs*) została opisana przez Aleksandra i Annę Shulgin w dwóch książkach: "PiHKAL" (*Phenethylamines I Have Known And Loved: A Chemical Story of Love*; Fenetyloaminy, które poznałem i pokochałem: Chemiczna historia miłości) i "TiHKAL" (*Tryptamines I Have Known And Loved: The Continuation*; Tryptaminy, które poznałem i pokochałem: Kontynuacja) [1, 2]. Ich autorzy przedstawili w nich metody syntezy, a także dawkowanie i działanie, które były oparte o ich osobiste doświadczenia po użyciu tych substancji. Jedną z fenetyloamin opisanych przez Shulginów była 4-bromo-2,5-dimetoksyfenetyloamina (2C-B). Działanie tej pochodnej fenetyloaminy jest podobne do meskaliny, LSD albo psylocybiny, przez co często bywała stosowana jako ich zamiennik. Pomimo, że 2C-B po raz pierwszy została zsyntetyzowana w 1974 roku [1], to była substancją bardzo rzadko spotykaną w Polsce, a pierwszy przypadek jej zabezpieczenia zarejestrowano dopiero w maju 2007 r. [3]. Dwa lata później, na przełomie lat 2009-2010, wykryłem 2C-B we krwi pobranej od dwóch osób i były to pierwsze w kraju przypadki zidentyfikowania tej substancji w materiale biologicznym. Wyniki przeprowadzonych wtedy badań przedstawiłem w pracy *Determination of 2C-B in biological material*, która została opublikowana na łamach czasopisma *Problems of Forensic Sciences* w 2011 roku [4]. 2C-B była substancją znaną od wielu lat i w momencie prowadzenia przedstawianych badań była związkiem kontrolowanym przez Ustawę z dnia 29 lipca 2005 roku o przeciwdziałaniu narkomanii (Dz.U. 2005 Nr 179 poz. 1485, z późn. zm.). Sprzedawano ją na rynku narkotykowym, zazwyczaj dla ograniczonej grupy osób eksperymentujących z nowymi narkotykami. Zjawisko masowego wprowadzania do obrotu nowych syntetycznych substancji zaczęło się rozwijać od 2006 roku w Europie, a od około 2008 roku w Polsce i było czymś nowym.

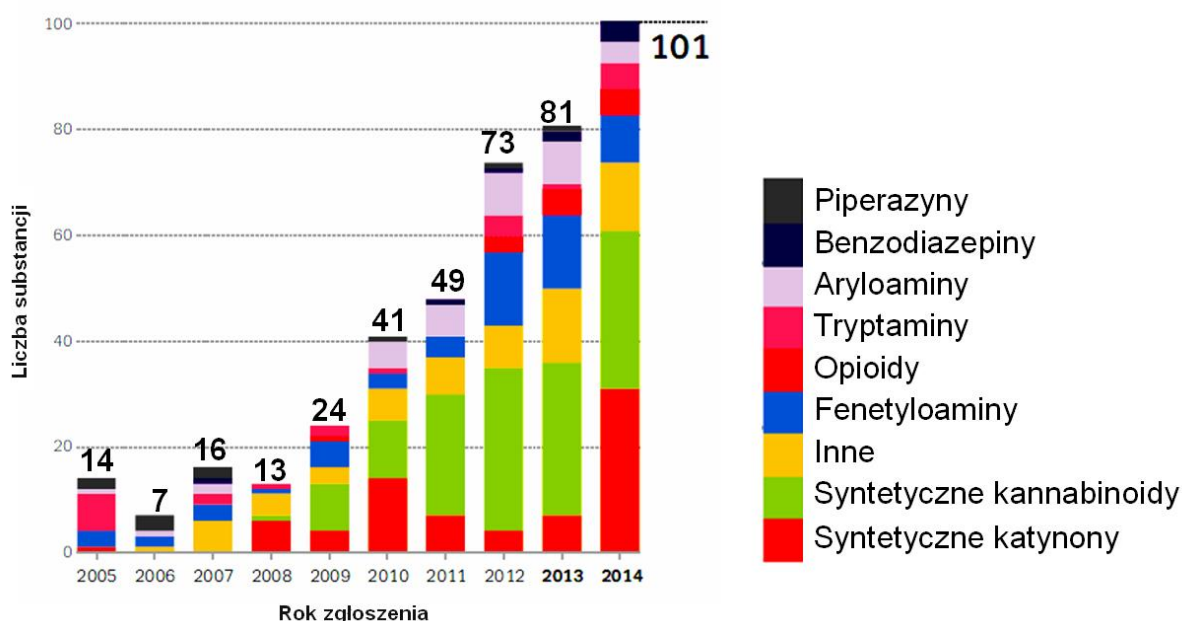
Nowe substancje psychoaktywne (NSP)

Od pojawienia się po raz pierwszy w 2006 r. produktu o nazwie 'Spice', liczba NSP wprowadzanych na rynek narkotykowy systematycznie i intensywnie (a w ostatnim czasie lawinowo) wzrasta. Istnieje szereg określeń, których używa się w stosunku do tych środków. W krajach anglojęzycznych funkcjonują pod nazwą *legal highs* lub *herbal highs* (w przypadku preparatów roślinnych), w Polsce wszystkie tego

typu środki określane są mianem ‘dopalacze’, natomiast w literaturze przedmiotu najczęściej występują jako NSP lub też określane są jako ‘nowe narkotyki’. Oficjalnie nie są one przeznaczone do spożycia przez ludzi i są sprzedawane pod trywialnymi nazwami, jako tzw. ‘odczynniki do badań’ (*research chemicals, RCs*), ‘przedmioty kolekcjonerskie’ (*collectibles*), ‘nawozy roślinne’ (*plant fertilizers*), ‘sole do kąpielii’ (*bath salts*) i ‘kadzidełka’ (*incenses*), dla uniknięcia odpowiedzialności karnej.

Zgodnie z definicją zawartą w Decyzji Rady Europy nr 2005/387/JHA dotyczącej wymiany informacji, oceny ryzyka i kontroli nowych substancji psychoaktywnych [5], NSP są to „nowe środki odurzające lub substancje psychotropowe, w czystej formie lub w preparatach, która nie są wymienione w konwencjach Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ) [6, 7], ale które mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego porównywalne do wywoływanego przez takie substancje”.

Pierwsze NSP były sprzedawane legalnie, a ich posiadanie nie było zabronione ponieważ nie były kontrolowane przepisami Ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii. Ich zakup był możliwy w sklepach, które otwierano w większości polskich miast. Początkowo składnikami ‘dopalaczy’ były pochodne piperazyny, z których najpopularniejsza była 1-benzylpiperazyna (BZP), ale na rynku wkrótce pojawiły się też pierwsze syntetyczne kannabinoidy. Po objęciu kontrolą BZP (także w Polsce) na rynek trafiły pierwsze pochodne katynonu. Producenci nowych narkotyków poszukiwali także informacji o lekach, które nie trafiły na rynek farmaceutyczny. Wytwarzali je i wprowadzali na rynek ‘dopalaczy’. W 2007 roku w Europie pojawił się mefedron, który do Polski trafił dwa lata później. Jego popularność wzrastała i szybko stał się najpopularniejszą NSP w Polsce i wielu innych europejskich krajach. Przyjmowanie mefedronu doprowadziło do wielu zatruc, w tym śmiertelnych, co spowodowało dopisanie tego związku do list substancji kontrolowanych. Przypadek zatrucia mefedronem został przeze mnie opublikowany w 2012 roku w *Journal of Analytical Toxicology* [H1]. Była to pierwsza publikacja opisująca zatrucie tą substancją, mające miejsce w Polsce.



Rys. 1. Liczba nowych substancji psychoaktywnych (NSP) raportowanych do Systemu Wczesnego Ostrzegania UE w latach 2005-2014 [8].

NSP objęte kontrolą prawną są natychmiast zastępowane przez ich nowe niekontrolowane pochodne. Związki te trafiają na rynek bez żadnych badań ich toksyczności czy toksykokinetyki. Nieznane działanie tych środków stanowi bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia, a nawet utraty życia ich użytkowników. Wzrost liczby substancji wprowadzanych na rynki narkotykowe doprowadził decyzją Rady Europy do powstania Systemu Wczesnego Ostrzegania (*Early Warning System, EWS*) o nowych środkach w 2005 roku. System ten jest prowadzony przez Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA*). W 2008 roku do EMCDDA zgłoszono 13 NSP. W kolejnych latach rejestrowano odpowiednio 24 (2009), 41 (2010), 49 (2011), 73 (2012), 81 (2013) oraz 101 NSP w 2014 roku (rys. 1). Jak wynika z raportów tej organizacji, w latach 2005-2014, na rynek europejski wprowadzono w sumie ponad 400 NSP, a obecnie monitorowanych jest ich ponad 450 [8]. Dotychczas nie są dostępne dane z 2015 roku, ale można się spodziewać, że liczba NSP, które pojawiły się na rynku w ubiegłym roku nie będzie niższa od tej z roku 2014.

Gwałtowny wzrost liczby NSP obserwowany od 2010 roku również w Polsce doprowadził do zdecydowanych działań organów administracji rządowej skutkujących zamknięciem prawie 1400 sklepów oferujących 'dopalacze' i konfiskaty ponad 100 tys. preparatów. Niestety efekty tych działań były krótkotrwałe, a obecnie sprzedaż NSP, głównie przez Internet, sukcesywnie rośnie. Polska jest obecnie jednym z europejskich krajów, w których konfiskuje się największe ilości NSP [8]. Substancje te są zazwyczaj sprowadzane spoza Europy (głównie Chin i Indii), po czym na miejscu są konfekcjonowane. Coraz częściej są także wytwarzane w nielegalnych laboratoriach na terenie naszego kraju. W Polsce w Ustawie o przeciwdziałaniu narkomanii regulującej problematykę środków psychoaktywnych znajdują się wykazy środków odurzających (N) i substancji psychotropowych (P). Środki psychoaktywne są podzielone na 4 grupy w zależności od ryzyka wywołania uzależnienia oraz zakresu stosowania dla celów medycznych. W przypadku stwierdzenia zasadności objęcia kontrolą nowej substancji, ww. ustawa jest nowelizowana. W ostatniej nowelizacji, która weszła w życie 1 lipca 2015 roku, na listach substancji kontrolowanych pojawiło się kolejnych 114 NSP.

NSP należą do różnych grup chemicznych, m.in. katynonów, fenetyloamin, tryptamin, piperazyn i syntetycznych kannabinoidów. W ostatnich latach pojawiły się substancje należące do aminoindanów, aryloalkiloamin oraz arylocykloheksyloamin. W sklepach internetowych oferowane są także pochodne wielu produktów leczniczych, głównie benzodiazepin (np. fenazepam, cinazepam czy flubromazolam będący analogiem triazolamu), które nie są objęte lekospisem w Polsce. Ze względu na działanie NSP można podzielić m.in. na związki o działaniu stymulującym, psychodelicznym oraz dysocjacyjnym. Z chemicznego punktu widzenia NSP stanowią najczęściej proste modyfikacje substancji kontrolowanych. Jest to spowodowane faktem, że substancje te są syntetyzowane w celu ominięcia obowiązujących przepisów antynarkotykowych, zwykle poprzez zmianę struktury znanych środków odurzających i substancji psychotropowych, albo przez wytworzenie substancji o odmiennych strukturach chemicznych, ale wywołujących objawy podobne do efektów działania na ośrodkowy układ nerwowy (OUN) znanych narkotyków. Tworzone są poprzez wprowadzanie do struktur dodatkowych grup chemicznych, np. metylowych lub też zastąpienie atomu wodoru atomem halogenu (Br, Cl, I). Często pojawiają się izomery strukturalne substancji kontrolowanych, np. 3-metylometakatynon (3-MMC), który zastąpił kontrolowany od 2010 roku mefedron (4-metylometakatynon, 4-MMC), a należy

zaznaczyć, że zidentyfikowano także 2-MMC, którego działanie jest słabsze od 4-MMC i 3-MMC. Wśród NSP szczególną popularność zyskały także substancje, które pierwotnie przeznaczone były do badań naukowych nad receptorami. Ze względu na charakter substancji psychoaktywnych kluczowe znaczenie mają cztery rodzaje receptorów – dopaminowe, adrenergiczne, serotoninowe oraz kannabinoidowe. Endogennymi ligandami trzech pierwszych receptorów są odpowiednio następujące neuroprzekaźniki: dopamina, adrenalina i noradrenalina oraz serotonina. Z kolei najbardziej znaną substancją działającą na receptory kannabinoidowe jest Δ^9 -tetrahydrokannabinol (THC). Wśród NSP wymienić należy metoksybenzylowe pochodne fenetyloamin, czyli tzw. NBOMe oraz syntetyczne kannabinoidy (obecnie zidentyfikowano ponad 130 związków z tej grupy).

ZAŁOŻENIA I CEL BADAŃ

NSP stanowią istotny problem między innymi dla toksykologów sądowych i klinicznych oraz ustawodawców wielu krajów. Związane jest to głównie z bardzo szybkim wzrostem liczby substancji oraz ich dużym podobieństwem chemicznym w grupie. Badania przesiewowe na obecność NSP w materiale biologicznym powinny być częścią rutynowego toku postępowania w przypadkach zatruc. Objęcie analizą dużej liczby związków z różnych grup chemicznych stanowi jednak poważne wyzwanie dla analityka, co sprawia, że dotychczas nie opracowano kompleksowych metod przesiewowych, które umożliwiłyby wykrywanie tak szerokiego spektrum tych związków w materiale biologicznym. Popularne testy immunochemiczne nie są efektywne dla różnorodnych i zmiennych NSP. Dodatkowo dostarczają one często wyników błędnych zarówno dodatnich, jak i ujemnych. Stosowane w wielu laboratoriach metody analityczne, takie jak chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (GC-MS), czy wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją diodową (HPLC-DAD) okazują się w stosunku do NSP niewystarczające. Skutkuje to brakiem możliwości jednoznacznej identyfikacji substancji obecnych zarówno we krwi osób trafiających do szpitalnych oddziałów toksykologicznych z podejrzeniem zatrucia, jak i osób, które uległy zatruciom śmiertelnym oraz osób podejrzanych o stosowanie NSP, w tym kierowców. Brak skorelowania danych dotyczących zaobserwowanych objawów oraz stężeń konkretnych substancji u osób stosujących NSP uniemożliwia określenie ich wpływu na organizm, a także sprawność psychomotoryczną. Zdrowotne i społeczne konsekwencje używania NSP stają się coraz istotniejszym problemem. Dane pozwalające na ocenę tego zjawiska są ciągle fragmentaryczne. Działania mające na celu przeciwdziałanie rozpowszechnianiu się NSP wymagają więc skutecznych badań.

Nowoczesne techniki analityczne rozszerzają możliwości badawcze. Z tego względu podjęto próbę kompleksowego podejścia do problemu identyfikacji NSP w płynach ustrojowych. Celem części badań zawartych w jednotematycznym bloku publikacji było opracowanie metody przesiewowej pozwalającej na jednoczesne objęcie szerokiego spektrum NSP z wielu grup chemicznych oraz metod potwierdzających umożliwiających ich jednoznaczną identyfikację i oznaczenie w płynach ustrojowych, w szczególności we krwi.

Różnorodność NSP wymaga aby opracowywane metody były czułe i selektywne, a zastosowane techniki ekstrakcji umożliwiały izolację związków o różnym charakterze z matrycy biologicznej z zadawalającą wydajnością. Jednocześnie założono, że metody

muszą być wydolne do identyfikacji i oznaczania związków posiadających podobną strukturę chemiczną i podobne właściwości fizykochemiczne, w tym również izomerów strukturalnych. Ponadto oprócz różnorodności, NSP stwarzają duże trudności analityczne ze względu na ich działanie na organizm w małych dawkach oraz szybkie i liczne przemiany metaboliczne, którym ulegają w organizmie. Prowadzi to do wystąpienia niskich stężeń związków macierzystych i ich licznych metabolitów w biopróbkach. Metody powinny charakteryzować się niską granicą wykrywalności (LOD). Opracowane procedury przesiewowe powinny mieć charakter otwarty, tzn. zapewniający możliwość ustawicznego dołączania nowych związków do postępowania analitycznego. Szczególny nacisk położono więc na chromatografię cieczową połączoną z tandemową spektrometrią mas, która umożliwia włączanie do badań kolejnych związków bądź modyfikację stworzonej biblioteki. Kolejnym założeniem było opracowanie metod prostych i szybkich, umożliwiających analizę dużej liczby próbek. Bardzo istotnym elementem uwzględnianym przy opracowywaniu metod badawczych była ich zgodność ze standardami obowiązującymi w międzynarodowej kontroli jakości badań. Realizowano to poprzez prowadzenie odpowiednich procesów walidacji. Przy opracowywaniu metod uwzględniono również niewielką objętość biopróbki potrzebną do przeprowadzenia analizy.

Kolejnym celem była ocena objawów działania NSP, przy wyznaczonym ich stężeniu w próbkach krwi. Znajomość zaobserwowanych objawów, okoliczności zdarzenia, oszacowanie czasu, w którym nastąpiło przyjęcie NSP i wyniki analizy toksykologicznej umożliwiły określenie wpływu wybranych środków na organizm, a w szczególności na sprawność psychomotoryczną. Ocena stężeń NSP dotyczyła także sekcyjnego materiału biologicznego, a więc określenia zakresów stężeń – toksycznych i spotykanych w przypadkach zatruc śmiertelnych. Wieloletni monitoring NSP w materiale biologicznym nadsyłanym do rutynowych badań do Instytutu Ekspertyz Sądowych (IES) w ramach działalności opiniodawczej dostarczył danych epidemiologicznych odnośnie do rodzaju najczęściej przyjmowanych NSP w Polsce, w tym powodujących zatrucia ostre i/lub śmiertelne oraz schematów ich przyjmowania.

MATERIAŁ BADAWCZY

Przedmiotem badań były głównie próby płynów ustrojowych, przede wszystkim krwi, pobierane od osób zmarłych oraz osób uwikłanych w kolizję z prawem, a w szczególności kierowców, które stanowiły materiał nadesłany do IES, w latach 2011-2016, wraz z postanowieniami organów dochodzeniowych o przeprowadzenie analizy chemiczno-toksykologicznej. Łącznie przebadano ponad 2000 prób krwi. Badaniami objęto także próby moczu i płynu z gałki ocznej, a także inny materiał sekcyjny, w tym wycinki narządów wewnętrznych pobranych od osób zmarłych, które przed śmiercią przyjmowały NSP. Opisy objawów i okoliczności zdarzenia uzyskiwano z protokołów pobrania krwi wypełnianych przez lekarza, akt sprawy oraz innych ustaleń faktycznych w sprawach.

Próby krwi kontrolnej (wolnej od analitów) stosowane do opracowania i walidacji metod pochodziły ze stacji krwiodawstwa.

W niektórych pracach materiałem badawczym były także środki i substancje zabezpieczone na miejscu zdarzenia, występujące w formie proszków i kryształów.

Certyfikowane substancje wzorcowe stosowane podczas opracowywania i walidacji metod pochodziły z firm Cayman Chemical Company, LGC Standards, Lipomed, Cerilliant oraz NMI (Australian Government National Measurement Institute). Niektóre substancje stosowane do opracowywania metody przesiewowej pochodziły z materiałów zabezpieczonych na rynku narkotykowym, które zidentyfikowano metodami chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas z jonizacją elektronową (GC-EI-MS), chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS) z wykorzystaniem hybrydowego detektora typu kwadrupol-analizator czasu przelotu, spektrometrii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) oraz spektrometrii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), zgodnie z procedurami stosowanymi w IES.

Pozostałe stosowane odczynniki chemiczne były czystości do HPLC.

METODYKA BADAWCZA

Ciągle pojawiające się NSP sprawiają, że metodyka ich oznaczania w materiale biologicznym musi być nieustannie rozwijana. Cechami, które umożliwiają kompleksową analizę szerokiego spektrum NSP w materiale biologicznym charakteryzują się tylko metody wykorzystujące nowoczesne techniki sprzężone, szczególnie chromatograficzne z detekcją mas, np. chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Wymóg niskiej granicy wykrywalności dla metod stosowanych do wykrywania tych związków w różnego rodzaju bioprobkach wynika zarówno z konieczności objęcia analizą przesiewową związków o różnym charakterze chemicznym, jak i wprowadzania ich do organizmu w niskich dawkach, jak to ma miejsce np. w przypadku syntetycznych kannabinoidów oraz pochodnych fenetyloaminy, szczególnie substancji z grupy NBOMe, dla których dawka aktywna najczęściej nie przekracza 1 mg.

Dlatego też do badań stosowano głównie techniki sprzężone. Do rozdzielania analitów stosowano chromatografię cieczową (LC), a do identyfikacji spektrometrię mas (MS), a czasem detekcję diodową (DAD). W badaniach wykorzystywano chromatografy cieczowe połączone ze spektrometrami mas w postaci potrójnego kwadrupola (LC-QQQ-MS) oraz z hybrydowym detektorem typu kwadrupol-analizator czasu przelotu (LC-QTOF-MS). Do głównych zalet opracowanych metod sprzężonych należą wysoka czułość i selektywność. Metody te zapewniają także jednoznaczną identyfikację oraz eliminują potencjalne interferencje ze strony matrycy materiału biologicznego dzięki komplementarności, czyli użyciu dwóch różnych metod wytwarzających sygnały analityczne na różnych zasadach. W badaniach wykorzystano również technikę GC-MS. Metody GC-MS i HPLC-DAD stosowano także podczas analizy materiałów niebiologicznych (m.in. proszków i kryształów) zabezpieczonych na miejscu zdarzenia. Szczegółowe informacje na temat opracowanych metod podano w poszczególnych publikacjach [H1-H15].

OMÓWIENIE UZYSKANYCH WYNIKÓW

Badaniami zawartymi w przedstawianym cyklu publikacji objęto związki należące do różnych grup NSP. Największe grupy stanowiły katynony oraz syntetyczne kannabinoidy. Opracowano metody umożliwiające identyfikację i oznaczenie NSP w materiale biologicznym. W pracach omówiono także popularne formy w jakich występują konkretne NSP, a także dawki i drogi podania. Opublikowane prace dostarczają danych dotyczących wpływu NSP na organizm, w tym na sprawność psychomotoryczną, w szczególności w odniesieniu do wyznaczonych stężeń. Istotne jest także omówienie przypadków zatruc NSP wraz z wyznaczonymi we krwi (i innym materiale) ich stężeniami oraz opisami efektów wywoływanych przez te substancje. Z uwagi na fakt, że większość NSP będących tematem moich prac to związki nowe, istnieje bardzo mało danych literaturowych na ich temat. Dlatego prowadzone przeze mnie prace należy traktować jako prekursorskie i wiodące w tej tematyce.

Opracowane metody analityczne

Metoda przesiewowa

Istnieje duże zapotrzebowanie na szybkie metody przesiewowe, które umożliwiałyby identyfikację NSP w materiale biologicznym. Pomimo tego, jak dotychczas nie zostały opracowane takie metody. Metody immunochemiczne są ograniczone do konkretnych grup związków. Dostępne testy nie są specyficzne i wystarczająco czułe, aby wykrywać NSP, a w konsekwencji pojawiające się na rynku nowe substancje są za ich pomocą słabo lub też w ogóle nie wykrywane. Największym ograniczeniem metod immunochemicznych jest jednak to, że są one zawsze ukierunkowane na związki o podobnym charakterze chemicznym z określonych grup. Nie istnieją testy, które umożliwiałyby jednoczesną identyfikację związków z wszystkich grup NSP.

Kluczową z punktu widzenia procesu identyfikacji nowych związków jest metoda LC-MS/MS. Opublikowane dotychczas nieliczne metody obejmujące najszersze spektrum związków ograniczały się do kilkudziesięciu substancji z wybranych grup NSP. Często wymagały wieloetapowego przygotowania próbek oraz kilku nastrzyków (ze względu na różne warunki chromatograficzne dla różnych grup związków), co znacząco komplikowało i wydłużało procedurę badawczą, a w konsekwencji także koszty [9-11]. Dlatego w pierwszej kolejności postanowiłem zająć się opracowaniem metody prostej i szybkiej.

Bardzo ważnym elementem procesu analitycznego, decydującym o wyniku analizy, jest proces przygotowania próbek. Do izolacji NSP z matrycy biologicznej opracowano prostą procedurę przygotowania, wymagającą użycia próby krwi o objętości zaledwie 0,2 ml [H2]. W przypadku analizy złożonych matryc, zwłaszcza biologicznych, proces izolacji może prowadzić do utraty części analitów, dlatego konieczne jest stosowanie wzorców wewnętrznych. Dodanie wzorców wewnętrznych przed przystąpieniem do przygotowania próbki umożliwia skorygowanie tych strat. Ponadto, niezależnie otrzymane wyniki od objętości pobieranego ekstrahenta i wahań działania aparatury. Idealnymi wzorcami wewnętrznymi są oczywiście deuterowane pochodne analitów. Dlatego do krwi dodawano deuterowane pochodne związków z najpopularniejszych grup NSP – katynonów i syntetycznych kannabinoidów

(odpowiednio mefedron-D₃ i JWH-018-D₉). Izolację NSP z krwi prowadzono poprzez stopniowe strącanie acetonitrylem (o objętości 0,6 ml). Uzyskany supernatant po odwirowaniu przy 13 000 obr/min przez 5 min odparowywano w temperaturze 37°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 0,1% roztworze kwasu mrówkowego w wodzie (v/v).

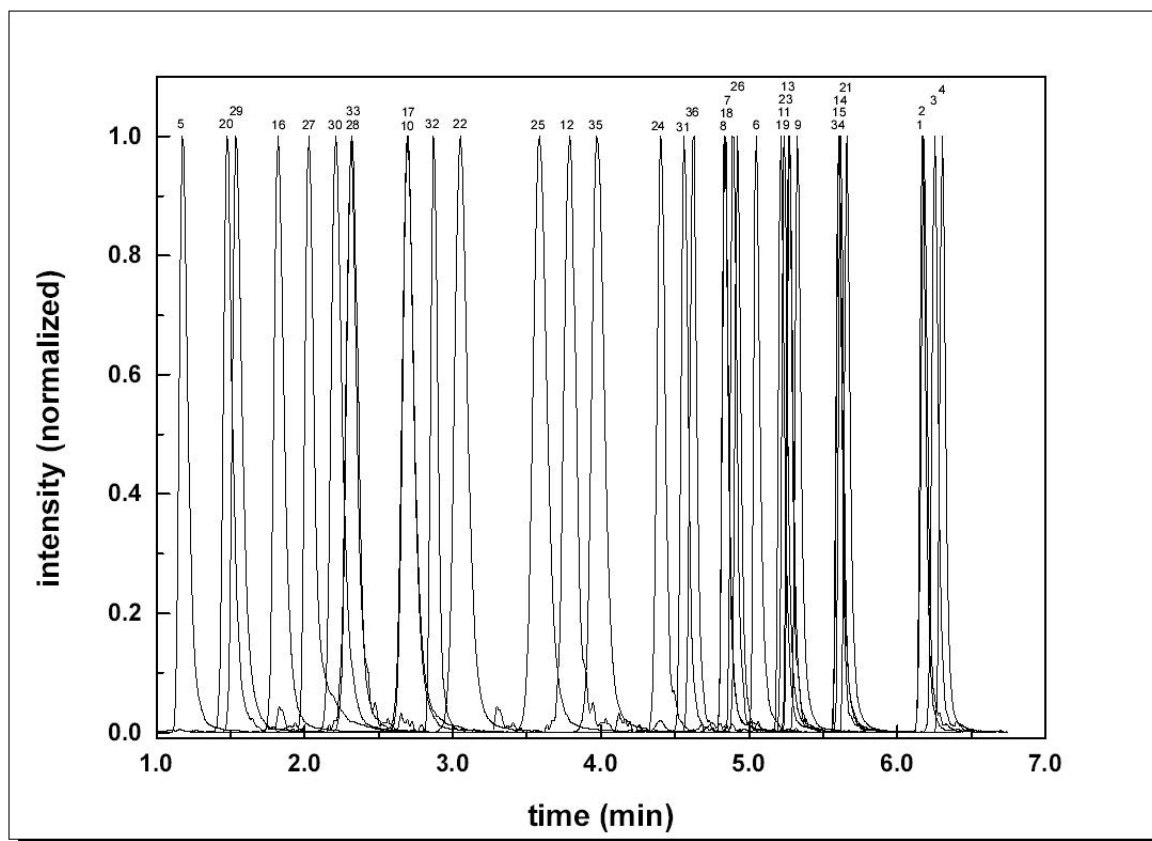
Zaproponowana procedura izolacji analitów z próbek jest bardzo prosta i zapewnia powtarzalną wydajność znacząco upraszczając procedurę. Najważniejszą wadą tej metody izolacji jest wyosobnienie wraz z analitami dużej ilości składników matrycy krwi. Współizolowane składniki matrycy wpływają na jakość oznaczeń techniką LC-MS poprzez wywoływanie tzw. efektów matrycowych. Takie efekty mogą prowadzić do błędnych oznaczeń analitu w badanej próbce. Składniki matrycy mogą wpływać na najważniejsze parametry metody jakimi są liniowość, precyzja i dokładność oznaczeń. Efekty takie badałem w szczególności w odniesieniu do syntetycznych kannabinoidów (UR-144, XLR-11 i STS-135), a ich wyniki przedstawiłem w pracy [H3]. W pracy tej sprawdziłem wpływ sposobu ekstrakcji (strącanie acetonitrylem, ekstrakcja ciecz-ciecz, ekstrakcja do fazy stałej) na wielkość efektów matrycowych. Przedstawiłem także prosty sposób określania i przedstawiania efektów matrycowych (tzw. znormalizowane profile). Opracowana metoda łączy zalety oraz eliminuje wady dotychczas stosowanych dwóch – nastrzyku po kolumnie (metoda jakościowa dla całego chromatogramu) oraz dodatku wzorca po ekstrakcji (metoda ilościowa określająca efekt matrycowy tylko w miejscu elucji badanej substancji). Umożliwia ilościowe określenie efektów matrycowych w całym chromatogramie, co ma szczególne znaczenie podczas opracowywania nowych metod analitycznych. Uzyskane wyniki pokazały znaczną zależność efektów matrycowych od sposobu przygotowania próbki, rodzaju analizowanego związku i monitorowanego jonu [H3].

Należy jednak zaznaczyć, że nadrzędnym celem podczas opracowywania procedury przesiewowej [H2] było zastosowanie takiej metody izolacji, która obejmowała szerokie spektrum związków o różnych właściwościach fizykochemicznych. Strącanie niewielkiej objętości krwi w konsekwencji ograniczyło zużycie rozpuszczalników i czas przygotowania oraz przełożyło się także na ograniczenie kosztów. Nie licząc czasu odparowywania acetonitrylu, całkowity czas przygotowania jednej próbki krwi wynosi zaledwie kilka minut, co pozwala na porównanie tej procedury do tych stosowanych w metodach immunochemicznych. W przypadku przygotowywania większej liczby próbek czas przygotowania przypadający na jedną próbkę jest znacząco krótszy.

Do badań zastosowano chromatograf cieczowy serii 1200 połączony ze spektrometrem mas 6460 w postaci potrójnego kwadrupola firmy Agilent Technologies. Rozdział analitów następował na kolumnie Zorbax SB-C18 (2,1 x 50 mm, 1,8 μm) firmy Agilent Technologies. Faza ruchoma podawana na kolumnę w trybie gradientowym składała się z mieszaniny 0,1% roztworu kwasu mrówkowego w wodzie (v/v) i 0,1% roztworu kwasu mrówkowego w acetonitrylu (v/v). Zastosowanie krótkiej kolumny oraz prostego programu gradientu składu fazy pozwoliło na znaczne skrócenie czasu analizy, a dodatkowo umożliwiło zastosowanie przepływu na poziomie 0,3 ml/min, co przełożyło się na niewielkie zużycie faz ruchomych [H2].

Użycie techniki LC-MS/MS zapewniło czułość, selektywność i specyficzność, które są niezbędne w analizie przesiewowej w kierunku wielu NSP. Nie bez znaczenia jest fakt, że tego typu techniki stają się coraz powszechniejsze w laboratoriach toksykologicznych, co sprawia, że opracowana przeze mnie metoda może być rutynowo wykorzystywana w innych jednostkach. Opisane powyżej urządzenie pracowało w trybie dynamicznego

monitorowania wybranych reakcji (dMRM) oraz detekcji jonów dodatnich. Tryb dMRM polega na monitorowaniu przejść MRM dla konkretnego związku tylko w czasie zbliżonym do oczekiwanego dla tego związku czasu retencji (zastosowano przedział detekcji $\pm 0,5$ min), co istotnie wpływa na czułość. Dla każdego z analitów (z wyjątkiem trzech) monitorowano po trzy przejścia MRM (jon macierzysty oraz po trzy jony fragmentacyjne). W sumie rejestrowano 432 przejścia MRM. Pozostałe istotne parametry detektora masowego wynosiły odpowiednio: napięcie kapilary: 3500 V, przepływ i temperatura gazu (azot): 10 l/min i 325°C, przepływ i temperatura gazu osłonowego: 10 l/min i 350°C, ciśnienie nebulizera: 40 psi [H2].



Rys. 2. Przykładowy chromatogram MRM ekstraktu z krwi wzbożonej 36 NPS, w stężeniu 100 ng/ml [H2].

Opracowana przeze mnie metoda przesiewowa umożliwia objęcie analizą 143 NSP z różnych grup (liczba związków): katynonów (36), fenetyloamin (26), tryptamin (18), piperazyn (9), piperydyn (2), syntetycznych kannabinoidów (34), aryloalkiloamin (7), arylocykloksesyloamin (3), aminoindanów (2) i innych związków (6). Szczegółowe parametry metody wraz z wyszczególnieniem analizowanych związków przedstawiono w pracy [H2]. Założeniem było stworzenie metody otwartej, do której można by włączać kolejne substancje pojawiające się na rynku. Dlatego obecnie metoda obejmuje już prawie 170 NSP. Zastosowany program gradientowy pozwala na elucję tak dużej liczby związków w czasie poniżej 10 min (całkowity czas analizy wraz ze stabilizacją fazy ruchomej wynosi 14 min). Większość analitów jest bardzo dobrze rozdzielona dzięki różnym czasom retencji oraz odmiennym parom MRM. Kilka związków (w szczególności

izomery strukturalne, np. 2-MMC, 3-MMC i 4-MMC) charakteryzowały się identycznymi parami MRM i zbliżonymi czasami retencji. Niemniej zastosowanie dwóch wzorców wewnętrznych (mefedron-D₃ i JWH-018-D₉) znacząco ułatwiło identyfikację poprzez określanie względnych czasów retencji (RRT). Dla 32 NSP przeprowadzono walidację, a dla 104 określono granicę wykrywalności. Oszacowane LOD mieściły się w zakresie od 0,01 do 3,09 ng/ml, ale tylko dla 15 z nich były wyższe niż 1 ng/ml. Należy zaznaczyć, że LOD były obliczane dla pary MRM o najniższej intensywności z trzech monitorowanych. Tak niskie granice detekcji świadczą, że metoda jest odpowiednia do wykrywania NSP we krwi, w tym tych z grup syntetycznych kannabinoidów oraz pochodnych fenetyloaminy z grupy NBOMe. Związki te charakteryzują się bardzo wysokim powinowactwem odpowiednio do receptorów serotoninowych 5-HT_{2A} i kannabinoidowych CB₁ [12, 13]. Ich dawki aktywne są więc bardzo niskie (znacznie poniżej 1 mg), co skutkuje bardzo niskimi stężeniami we krwi. Opracowana procedura jest od kilku lat rutynowo stosowana w Pracowni Analiz Toksykologicznych IES. Uzyskiwane wyniki, które omówiono poniżej i w kilku publikacjach [H5, H6, H7] potwierdzają jej użyteczność.

Metody ukierunkowane

Opracowane przeze mnie metody celowane można podzielić na dwie grupy – te stosowane do oznaczania związków z grup katynonów i pochodnych fenetyloaminy oraz te, które stosowano podczas analizy ilościowej syntetycznych kannabinoidów. W badaniach materiału biologicznego stosowałem głównie poprzednio opisany aparat LC-QQQ-MS.

Metody celowane opracowałem do oznaczania we krwi (a także innych materiałach biologicznych) m.in. mefedronu [H1, H4], 2-metylometkatynonu (2-MMC) [H4], 3-metylometkatynonu (3-MMC) [H4, H6, H8], bufedronu [H4, H9], metamfepramonu (dimetylometkatynonu) [H4], etkatynonu [H4], 4-metyloetylokatynonu (4-MEC) [H10], α -pirolidynopentiofenonu (α -PVP) [H7], 3,4-metylenodioksympirowaleronu (MDPV) [H11], metoksetaminy (MXE) [H12], 5-(2-aminopropylo)benzofuranu (5-APB) [H8], (1-pentyloindolo-3-ylo)(2,2,3,3-tetrametylcyklopropylo)metanonu (UR-144) [H13, H14] i 2-[[1-(cykloheksylometylo)-1H-indolo-3-ylo]formamido]-3,3-dimetylomaślanu metylu (MDMB-CHMICA) [H15].

Do izolacji syntetycznych kannabinoidów – UR-144 i MDMB-CHMICA stosowano strącanie acetonitrylem podobnie jak w przypadku wyżej opisanej procedury przesiewowej. Jako wzorzec wewnętrzny używano deuterowaną pochodną JWH-018, która była dodawana do krwi w ilości pozwalającej na osiągnięcie stężenia 10 ng/ml. Z kolei izolację NSP należących do pozostałych grup prowadzono poprzez ekstrakcję ciec-ciecz ze środowiska zasadowego. Przed ekstrakcją do 0,2 ml krwi dodawano deuterowaną pochodną mefedronu (do osiągnięcia stężenia 100 ng/ml) oraz 0,2 ml 0,5 M buforu węglanowego (pH 11 lub 12, w zależności od metody). Następnie dodawano 1 ml chlorku n-butyłu, próby wytrząsano za pomocą wortexu, po czym wirowano. Fazę organiczną (0,8 ml) przenoszono do kolejnej fiolki i po dodaniu 0,1 ml 0,025 M HCl odparowywano przez około 10-15 minut. Pozostałą fazę wodną (kwas) nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną.

W swoich pracach analizowałem również inne niż krew materiały biologiczne. W przypadku płynu z gałki ocznej procedury przygotowania były identyczne jak dla krwi. W celu wyznaczenia całkowitego stężenia związków w moczu (w tym sprzężonych

z kwasem glukuronowym), materiał ten przed ekstrakcją poddawano hydrolizie enzymatycznej z β -glukuronidazą/arylsulfatazą (50 μ l, przez 60 min przy 55°C) [H13]. Wycinki narządów wewnętrznych homogenizowano po czym uzyskane homogenaty (równoważne 0,2 g tkanki) traktowano podobnie jak próby krwi [H15]. Jednym z ciekawszych materiałów były suche plamy krwi, których badania podjąłem się w ramach jednej z prac [H12]. W tym przypadku kawałki nasiąkniętego krwią kartonu macerowano 0,025 M kwasem solnym, a następnie uzyskane maceraty poddawano ekstrakcji ciec-ciecz. Materiał badawczy stanowiły także środki i substancje zabezpieczone na miejscu zdarzenia, występujące w formie proszków i kryształów, lub też opakowań po preparatach stanowiących 'dopalacze' [H1, H8, H9]. Wyniki tych badań nie są jednak tematem niniejszego autoreferatu.

Rozdział syntetycznych kannabinoidów następował na kolumnie Kinetex C18 2,6u 100Å (100 \times 4,6 mm) firmy Phenomenex. Taką kolumnę zastosowałem ze względu na fakt, że syntetyczne kannabinoidy charakteryzują się mniejszą polarnością przez co w odwróconym układzie faz są eluowane z kolumny po długim czasie. Kolumna Kinetex posiada ziarno, które w przeciwieństwie do większości wypełnień kolumn chromatograficznych, nie jest całkowicie porowate, co zwiększa sprawność i powoduje, że piki stają się znacznie węższe i wyższe, w szczególności te pochodzące od związków słabo eluowanych (o długich czasach retencji). Optymalizacja kształtu piku przekłada się na osiągnięcie lepszej czułości, co ma kluczowe znaczenie dla związków występujących we krwi w bardzo niskich stężeniach. Rozdział związków z pozostałych grup następował na wcześniej opisanej kolumnie Zorbax SB-C18.

We wszystkich metodach celowanych [H1, H5-H15] faza ruchoma była podawana na kolumnę w trybie gradientu składu fazy, którą stanowiła mieszanina 0,1% roztworu kwasu mrówkowego w wodzie (v/v) i 0,1% roztworu kwasu mrówkowego w acetonitrylu (v/v). Przepływ fazy ruchomej wynosił 0,5 ml/min (na kolumnie Kinetex) lub 0,3 ml/min (na kolumnie Zorbax), a objętość nastrzyku 10 μ l. Całkowite czasy analiz wynosiły odpowiednio 7 min (UR-144 [H13]), 22 min (UR-144 [H14], MDMB-CHMICA [H15]) i 23 min (UR-144 [H13]) dla metod oznaczania syntetycznych kannabinoidów oraz 13 min (MXE [H12]), 14 min (mefedron [H1], 3-MMC [H6 i H8], α -PVP [H7], 5-APB [H8], bufedron [H9], MDPV [H11]) lub 17 min (4-MEC [H10]) dla pozostałych substancji.

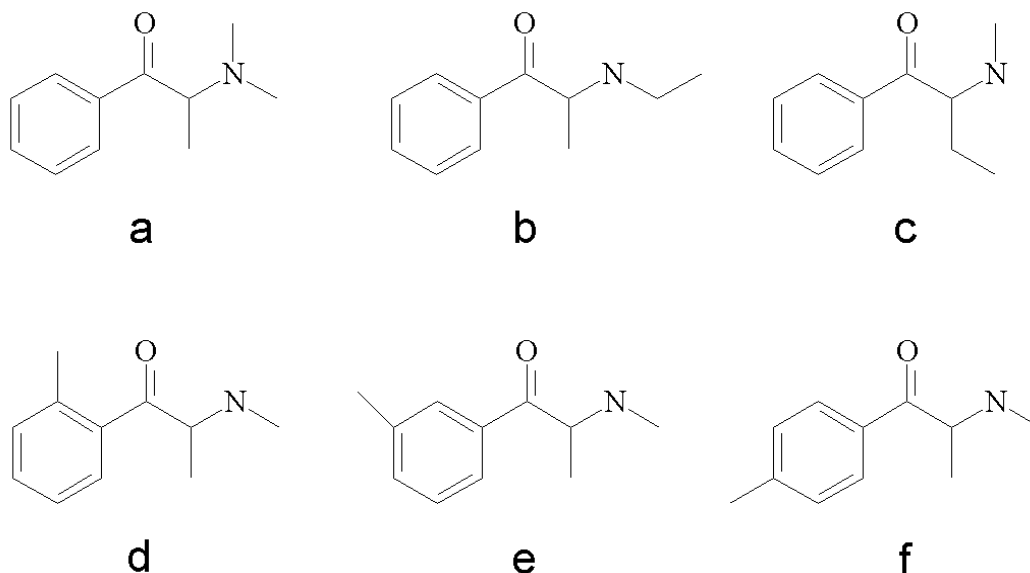
Spektrometr masowy pracował w trybie MRM lub dMRM. We wszystkich metodach, dla każdego z analitów monitorowano po trzy lub nawet cztery przejścia MRM. Pozostałe parametry detektora masowego są opisane w poszczególnych publikacjach [H1, H6-H15].

Rozdzielanie izomerów konstytucyjnych

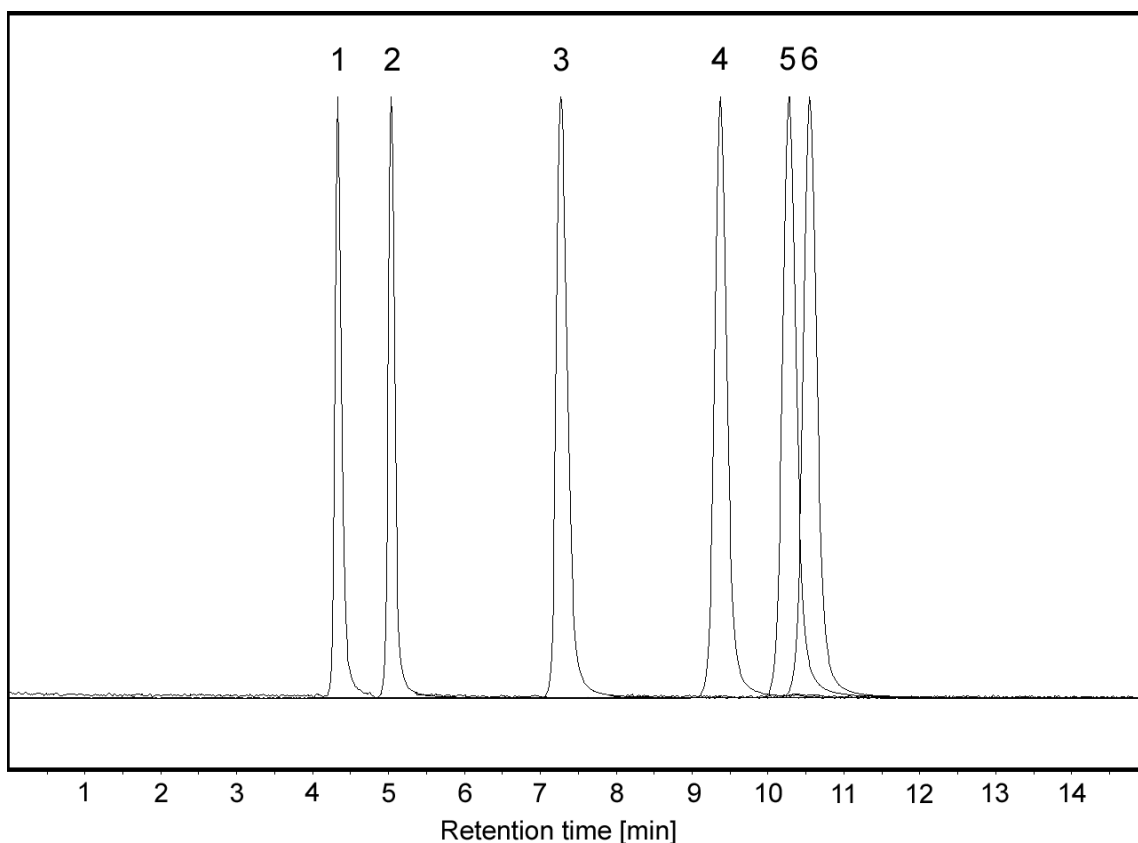
NSP należące do jednej grupy bardzo często charakteryzują się zbliżoną budową chemiczną, stanowiąc izomery strukturalne. Rozdzielenie oraz jednoznaczna identyfikacja izomerów strukturalnych są niezwykle ważne z kilku powodów. Związki te różnią się właściwościami farmakologicznymi i toksykologicznymi, działaniem i efektami, które wywołują oraz różnym statusem prawnym co skutkuje odmienną penalizacją za ich posiadanie. Opracowałem i przedstawiłem metody umożliwiające rozróżnienie mefedronu (4-MMC) i 3-MMC, a także izomerów 5-APB i 6-APB w publikacji [H8].

Do problematyki wróciłem w kolejnej pracy [H4]. Porównałem możliwości różnych metod analitycznych (GC-MS, HPLC-DAD, LC-MS/MS) do rozdzielania i odróżnienia mefedronu i jego izomerów: 3-MMC, 2-MMC, bufedronu, metamfepramonu i etkatynonu. Wszystkie te związki charakteryzują się identyczną masą molową wynoszącą 177,24 g/mol, a różnią się tylko miejscem przyłączenia grupy metylowej (rys. 3). Należy zaznaczyć, że wszystkie z nich mogą być stosowane w celu wprowadzenia się w stan odurzenia, ale tylko 2-MMC nie jest kontrolowany Ustawą o przeciwdziałaniu narkomanii, a pozostałe (prócz mefedronu) trafiły na listę substancji psychotropowych grupy I-P dopiero w połowie 2015 roku.

Wszystkie omawiane techniki umożliwiają rozróżnienie izomerów konstytucyjnych mefedronu. W metodzie GC-MS konieczne jest równoczesne wykorzystanie czasów retencji i widm masowych. W zastosowanych w metodzie HPLC-DAD warunkach nie można było rozróżnić poszczególnych izomerów na podstawie ich czasów retencji, ale umożliwiły to odmienne widma UV/VIS. Warunki rozdziału zoptymalizowano dla metody LC-MS/MS (rys. 4), w której identyfikacja była dodatkowo wspomagana poprzez różnice w intensywnościach jonów potomnych (dla analitów monitorowano 10 przejść MRM (m/z): 178,1 \rightarrow 72,1; 178,1 \rightarrow 77,1; 178,1 \rightarrow 91,1; 178,1 \rightarrow 105,1; 178,1 \rightarrow 117,1; 178,1 \rightarrow 131,1; 178,1 \rightarrow 133,1; 178,1 \rightarrow 144,1; 178,1 \rightarrow 145,1; 178,1 \rightarrow 160,1). Rozdział izomerów w tej metodzie następował na wcześniej opisanej kolumnie Kinetex. Faza ruchoma składająca się z mieszaniny 0,1% roztworu kwasu mrówkowego w wodzie (v/v) (A) i 0,1% roztworu kwasu mrówkowego w acetonitrylu (v/v) (B) była podawana na kolumnę w warunkach izokratycznych (7% fazy B) z szybkością 0,8 ml/min. Zoptymalizowane warunki chromatograficzne pozwoliły na bardzo dobre rozdzielanie sześciu analitów (mefedronu, 3-MMC, 2-MMC, bufedronu, metamfepramonu i etkatynonu), które były eluowane w zakresie od 4,3 min do 10,5 min [H4].



Rys. 3. Wzory strukturalne izomerów mefedronu: a – metamfepramon (dimetylokatynon), b – etkatynon, c – bufedron, d – 2-metylometkatynon (2-MMC), e – metafedron (3-MMC), f – mefedron (4-MMC).



Rys. 4. Chromatogram LC-MS/MS izomerów metylometkatynonu (1 – metamfepramon, 2 – etkatynon, 3 – bufedron, 4 – 2-MMC, 5 – mefedron, 6 – 3-MMC) [H4].

W pracy określono także LOD dla każdej z metod. W przypadku GC-MS (w trybie przemiatań zakresu mas) było to 1000-2500 ng/ml, co sprawia, że metoda ta nadaje się tylko do analizy materiału niebiologicznego. LOD dla metod HPLC-DAD i LC-MS/MS były znacznie niższe i wynosiły odpowiednio 1,4-2,7 ng/ml oraz 0,03-0,39 ng/ml, potwierdzając, że mogą one być wykorzystywane w analizie materiałów biologicznych, w tym krwi.

Walidacja

Wszystkie opracowywane metody poddawałem procesowi walidacji zgodnie z zaleceniami Naukowej Grupy Roboczej ds. Toksykologii Sądowej (*Scientific Working Group for Forensic Toxicology, SWGTOX*) [14]. Umożliwiło to zapewnienie rzetelnych, wiarygodnych i dokładnych wyników, co ma decydujące znaczenie w przypadku analizy toksykologicznej, której wyniki stanowią materiał dowodowy. W każdej z metod określano LOD, granicę oznaczalności (LOQ), zakres liniowości (LOL), a także selektywność, precyzję i dokładność. Krzywe kalibracyjne przygotowywano w zakresach, które obejmowały poziomy stężeń spotykane we krwi dla konkretnych związków. Dla kannabinoli najczęściej od 0,2 do 50 ng/mL (MDMB-CHMICA) lub od 0,5 do 50 i 100 ng/ml (UR-144) oraz dla pozostałych NSP od 1 do 100 ng/ml (mefedron) lub do 200 ng/ml (3-MMC i α -PVP), od 5 do 500 ng/ml (MDPV), w niektórych przypadkach do 1000 ng/ml (bufedron i 4-MEC), a nawet do 5000 ng/ml (3-MMC

i 5-APB). W przypadku moczu zakresy były inne, np. od 50 do 2000 ng/ml dla MXE [H12]. Liniowość metod była zachowana w całych testowanych zakresach. Współczynniki determinacji (R^2) mieściły się w zakresie od 0,9770 do 0,9997 i wskazywały na bardzo dobre dopasowania krzywych kalibracyjnych. Próbkę, w których wykazywano wyższe stężenia były ponownie analizowane po rozcieńczeniu wolną od analitów krwią (lub moczem), tak aby uzyskane wyniki mieściły się w zakresach liniowości. Jako LOD przyjmowano stężenia, dla których stosunek sygnał do szumu (S/N) był równy 3 dla przejścia MRM o najmniejszej intensywności z trzech monitorowanych. LOD mieściły się w zakresach od 0,02 do 1,8 ng/ml. Jako granicę oznaczalności najczęściej przyjmowano najniższy punkt krzywych kalibracyjnych (0,2-5 ng/ml). Wydajność ekstrakcji obliczano przez porównanie sygnału analitycznego (pole powierzchni analitu / pole powierzchni wzorca wewnętrznego, *IS*) dla związków ekstrahowanych z krwi do sygnału analitycznego dla związków dodanych do krwi po ekstrakcji w tym samym stężeniu. Wyznaczone wydajności ekstrakcji dla metod ukierunkowanych mieściły się w zakresie od 62,3% (dla UR-144 [H13]) do 110,0% (dla MDPV [H11]). Efekty matrycowe (szczególnie istotne w metodach LC-MS) obliczano poprzez porównanie intensywności pików pochodzących od nieekstrahowanego wzorca do tych zmierzonych dla wzorca dodanego do uprzednio ekstrahowanej matrycy (zgodnie ze sposobem Matuszewskiego [H3]). Objęte badaniami anality charakteryzowały się własnościami zarówno osłabiania (62% dla 3-MMC [H6]) jak i wzmacniania jonizacji (do nawet 287% dla MDMA-CHMICA [H15]). Precyzja metod mieściła się w zakresach akceptowalnych na forum międzynarodowym dla analizy materiału biologicznego (<16%) [14]. Wszystkie eksperymenty prowadzono w co najmniej pięciu powtórzeniach, a eksperymenty dotyczące powtarzalności w co najmniej trzech seriach pomiarowych, w kilku różnych dniach. Badania wydajności ekstrakcji i efektu matrycy prowadzono najczęściej na kilku poziomach stężeń. Stabilność analitów badano po przechowywaniu ekstraktów w temperaturze pokojowej (24 godziny), w +4°C (72 godziny) oraz poniżej -20°C (6 tygodni). Selektywność badano poprzez analizę prób krwi wolnej od analitów pobranych od 8-20 osób, jak i prób krwi pochodzących z ekspertyz opracowywanych w IES, w których wykazano inne (od testowanych) środki odurzające i substancje psychotropowe. W żadnej z opracowanych metod nie stwierdzono interferencji.

Nowe substancje psychoaktywne w materiale biologicznym

Katynony

Katynony są syntetycznymi pochodnymi katynonu, który jest jednym ze składników psychoaktywnych rośliny o nazwie khat (Czuwaliczka jadalna, łac. *Catha edulis*). Khat jest stosowany w celach leczniczych (m.in. jako środek antydepresyjny) oraz w celu wprowadzania się w stan odurzenia najczęściej przez mieszkańców Afryki i Półwyspu Arabskiego. Pochodne katynonu pod względem budowy chemicznej są pochodnymi fenetylaminy. Są substancjami o działaniu pobudzającym i empatogennym, używanymi zamiennie do amfetaminy i MDMA, a także kokainy. Wszystkie te związki działają podobnie na te same receptory adrenergiczne. Pomimo, że do niedawna były znane nieliczne związki z grupy katynonów to kilka lat temu zdominowały one rynek narkotykowy. W latach 2008-2010 najpopularniejszym katynonem w Europie był mefedron. Liczne przypadki zatruc spowodowane tą substancją spowodowały, że trafił

on na listę substancji kontrolowanych przez Ustawę o przeciwdziałaniu narkomanii w 2010 roku.

Śmiertelne zatrucie mefedronem opisałem w pracy [H1]. Był to pierwszy w Polsce przypadek zatrucia tą substancją, który został opublikowany w czasopiśmie o zasięgu światowym. W kurtce zmarłego mężczyzny ujawniono kilka woreczków foliowych zawierających biały proszek. W wyniku testów przeprowadzonych przez policję stwierdzono w nich obecność 2C-B. Do Instytutu nadesłano krew i płyn z gałki ocznej pobrane ze zwłok mężczyzny celem potwierdzenia w nich obecności 2C-B. Przeprowadzone badania nie potwierdziły obecności tego związku w materiale biologicznym, nawet w ilościach śladowych. Dopiero kilka miesięcy później udało się uzyskać zabezpieczone woreczki z proszkami, a przeprowadzone badania ujawniły w nich obecność mefedronu w stężeniu 80,4-87,3%. Mefedron wykazano także we krwi i płynie z gałki ocznej, w stężeniach odpowiednio 5,5 i 7,1 µg/ml. Do czasu publikacji tej pracy opisano wcześniej zaledwie dwa przypadki, w których przyczyną zgonu było zatrucie mefedronem. Wyznaczone w tych przypadkach stężenia we krwi wynosiły 3,3 i 22 µg/ml. Przeprowadzone przeze mnie badania wskazywały, że mężczyzna przyjął wysoką dawkę mefedronu, co skutkowało wysokim stężeniem tego związku we krwi, a w konsekwencji zgonem (w wyniku przeprowadzonej autopsji stwierdzono uszkodzenie pnia mózgu).

W ramach badań prowadzonych w powyższej pracy sprawdziłem także czy mefedron i 2C-B wywołują reakcje krzyżowe z popularnymi testami immunoenzymatycznymi ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Okazało się, że pomimo podobnej struktury testy przeznaczone do wykrywania pochodnych amfetaminy i metamfetaminy nie dają reakcji krzyżowych z mefedronem i 2C-B. Potwierdzono tym samym, że popularne testy stosowane w laboratoriach toksykologicznych mogą nie być w stanie ujawnić NSP. Jednocześnie przypadek ten pokazał jak ważne jest przesyłanie do jednego laboratorium wszystkich materiałów zabezpieczonych na miejscu zdarzenia, a także zainspirował do przyśpieszenia badań nad opracowaniem metody przesiewowej do wykrywania NSP w materiale biologicznym.

Po objęciu kontrolą prawną mefedronu na rynku pojawiły się jego niekontrolowane analogi, w tym izomery konstytucyjne – bufedron, etkatynon i 3-MMC. Były one sprzedawane jako „legalny mefedron”. Bufedron, podobnie jak i mefedron, był po raz pierwszy zsyntetyzowany w latach 20. ubiegłego wieku i podobnie jak wiele innych NSP trafił na rynek narkotykowy w wyniku przeszukiwań literatury naukowej i dawnych patentów pod kątem nie wprowadzonych do sprzedaży farmaceutyków. Kolejna praca [H9] była pierwszą na świecie, która dotyczyła oznaczania bufedronu we krwi przez co poznano stężenia tego związku występujące we krwi konsumentów. W pracy tej przedstawiono dwa przypadki. W pierwszym krew pobrano od kierowcy zmarłego w wyniku obrażeń poniesionych w wypadku samochodowym, a w drugim od osoby żywej, podejrzanej o posiadanie środków odurzających. W obu przypadkach ujawniono opakowania z proszkami, które również nadesłano do badań. W wyniku przeprowadzonych badań w proszkach wykazano obecność bufedronu w stężeniach od 58 do 68%. We krwi zmarłego kierowcy stwierdzono bufedron i MDPV w stężeniach odpowiednio 127 i 38 ng/ml, natomiast we krwi mężczyzny podejrzanego o posiadanie narkotyków wykazano bufedron w stężeniu 3 ng/ml. Przeprowadzone badania pozwoliły na stwierdzenie, że kierowca był pod działaniem bufedronu i MDPV w momencie wypadku, a związki te w wykazanych stężeniach wpływały upośledzająco

na jego sprawność psychomotoryczną. Z kolei niskie stężenie wykazane w drugim przypadku świadczyło o odległym w czasie przyjęciu tej pochodnej katynonu.

W pracy omówiono także podobieństwa w działaniu i toksyczności (m.in. pobudzenie, euforia, podniecenie, zwiększona koncentracja, brak poczucia głodu, brak potrzeby snu, podwyższone tętno i ciśnienie krwi) bufedronu oraz amfetaminy i mefedronu. Ze względu na brak danych na temat farmakodynamicznych, farmakokinetycznych i toksykologicznych właściwości bufedronu tego typu porównania także stają się cennym źródłem informacji.

W tym samym czasie popularniejszym od bufedronu stawał się inny katynon – 4-MEC [H10]. Miało to swoje odzwierciedlenie w pracy eksperckiej w IES, gdzie był najczęściej wykrywanym substytutem mefedronu w preparatach ‘dopalaczy’. Związek ten stwierdzano także w materiale biologicznym. Publikacja [H10] była pierwszą, w której przedstawiono stężenia 4-MEC we krwi (46-152 ng/ml). Opisano w niej trzy przypadki, w których wykazano 4-MEC w materiałach biologicznych i niebiologicznych. Pierwszy z omawianych przypadków dotyczył wypadku samochodowego ze skutkiem śmiertelnym. Przy zwłokach kierowcy ujawniono woreczek z zapięciem strunowym zawierający biały proszek. Do badań nadesłano krew i mocz wraz z ww. woreczkiem. Drugi przypadek dotyczył zgonu mężczyzny, który podczas imprezy przyjmował ‘dopalacze’. Nad ranem został przez kolegów znaleziony nieprzytomny i przewieziony do szpitala, gdzie zmarł. Lekarz medycyny sądowej stwierdził, że przyczyną zgonu było „uszkodzenie ważnych ośrodków pnia mózgu”. Do badań nadesłano materiał pobrany podczas sekcji zwłok wraz z woreczkiem zawierającym śladowe ilości substancji. W trzecim przypadku krew pobrano od mężczyzny posiadającego biały proszek nieznanego pochodzenia.

W obu białych proszkach zabezpieczonych w ww. sprawach wykazano 4-MEC w stężeniu 51% i 78%. Natomiast w śladach z woreczka znalezionego przy zmarłym po imprezie mężczyźnie wykazano obecność para-metoksyamfetaminy (PMA), para-metoksymetamfetaminy (PMMA), 4-MEC, kofeiny i kreatyniny. W krwi i moczu kierowcy wykazano 4-MEC w stężeniach odpowiednio 152 i 122 ng/ml. W obu materiałach był także obecny alkohol etylowy. We krwi zmarłego mężczyzny stwierdzono obecność 4-MEC w stężeniu 56 ng/ml, ale nie była to jedyna obecna substancja. Wykazano również znaczne ilości PMA (>2 µg/ml), a także PMMA, amfetaminę, metamfetaminę, THC i jego metabolit 11-nor-9-karboksy-THC (THCCOOH). We krwi mężczyzny z ostatniej sprawy stwierdzono obecność 4-MEC w stężeniu 46 ng/ml.

3-MMC był najczęściej wykrywanym w materiale biologicznym katynonem od 2013 roku. W pracy [H8] przedstawiłem stężenia 3-MMC i 5-APB wykazane we krwi mężczyzny, który uległ śmiertelnemu zatruciu tymi związkami. Uzyskane wyniki oraz ustalenia pozwoliły na powiązanie stężeń z przyjętymi dawkami. 5-APB należy do grupy benzofuranów i aryloalkiloamin, a budową jest zbliżony do 3,4-metylenodioksyamfetaminy (MDA). 20-latek zakupił przez Internet ‘dopalacze’, które przyjął wraz z alkoholem. Ze względu na pobudzenie psychoruchowe, które wystąpiło po kilkunastu minutach, został przewieziony do szpitala, gdzie zmarł w czasie krótszym niż 4 godziny od użycia ‘dopalaczy’. Do badań nadesłano krew zmarłego i pięć opakowań ‘dopalaczy’, zawierających oddzielnie biały proszek i kryształki. Przeprowadzone badania ujawniły w kryształkach 3-MMC w stężeniach 85-93%, a w proszkach 5-APB w stężeniach 99% i 100%. We krwi wykazano obie NSP w stężeniach odpowiednio 1,6 i 5,6 µg/ml, a ponadto diazepam, nordiazepam, midazolam i śladowe ilości 7-aminoklonazepamu. Dodatkowo u mężczyzny stwierdzono

alkohol w stężeniu 1,4‰. Dzięki znajomości masy proszków i kryształów w zabezpieczonych opakowaniach (w tym tych oryginalnie zamkniętych) można było domniemywać, że mężczyzna przyjął około 500 mg 3-MMC i 400 mg 5-APB. Stanowiło to kilka typowych dawek, które wynoszą przeciętnie 75-175 mg dla 3-MMC i 50-100 mg dla 5-APB. Mężczyzna przyjął NSP wraz z 80 g alkoholu (250 ml wódki). Takie ilości substancji skutkowały szeregiem zaburzeń (zaobserwowanych w szpitalu), zarówno neurologicznych (pobudzenie, drgawki) jak i sercowo-naczyniowych (nadciśnienie, tachykardia, arytmia). Wystąpiły także hipertermia i bradykardia. Przyczyną zgonu była ostra zapaść krążeniowa, która nastąpiła po zatrzymaniu akcji serca wywołanym przyjęciem znacznej ilości NSP wraz z alkoholem. Wykazane pochodne benzodiazepiny były podane pacjentowi w szpitalu, natomiast 7-aminoklonazepam pochodził z odległego przyjęcia klonazepamu i nie miał znaczenia toksykologicznego. Praca ta była, podobnie jak powyżej omówione, pierwszą opublikowaną w czasopiśmie o zasięgu światowym, w której przedstawiono stężenia we krwi zarówno 3-MMC, jak i 5-APB. Opisany przypadek umożliwił powiązanie przyjętych dawek obu substancji ze stężeniami, które wystąpiły po 4 godzinach od przyjęcia oraz efektami jakie wywołały. W pracy omówiono także problematykę rozdzielania i identyfikacji izomerów (3- i 4-MMC oraz 5- i 6-APB).

Problematykę oznaczania 3-MMC i interpretację stężeń tego związku we krwi oraz efekty jakie wywołuje przedstawiłem w pracy [H6]. Dyskusję oparto na wynikach badań 95 przypadków z okresu od początku roku 2013 do połowy roku 2015, w których wykazano we krwi obecność 3-MMC. Objęty badaniami okres dotyczył czasu, kiedy związek ten był 'legalny', czyli od czasu pojawienia się na rynku do objęcia go kontrolą prawną (w dniu 1 lipca 2015 roku). Liczba przypadków, w których stwierdzano 3-MMC w kolejnych latach wzrastała, co świadczyło o coraz większej popularności tego katynonu. Zdecydowaną większością użytkowników (prawie 94%) byli mężczyźni, a przeciętny wiek konsumenta to 26 lat. W większości przypadków (76 z 95) 3-MMC nie był jedyną substancją, którą wykazano we krwi. Innymi obecnymi we krwi związkami były zarówno NSP (głównie inne katynony), jak i tradycyjne narkotyki (m.in. THC, amfetamina, MDMA, a także pochodne benzodiazepiny). Wykazane stężenia 3-MMC we wszystkich 95 przypadkach mieściły się w zakresie od śladowych (< 1 ng/ml) do 1,6 µg/ml (średnia 51,3 ng/ml, mediana 18,5 ng/ml). Biorąc pod uwagę poszczególne rodzaje zdarzeń, w których wykryto ten związek, jego stężenia wynosiły odpowiednio: u osób podejrzanych o prowadzenie pojazdów po ich przyjęciu 1-171 ng/ml, u kierowców biorących udział w wypadkach drogowych <1-29 ng/ml, u posiadających narkotyki 2-408 ng/ml, zatrutych (w tym śmiertelne) <1-1600 ng/ml i innych (m.in. gwałty, kradzieże, porwania) <1-61 ng/ml. W żadnym z przypadków zatruc śmiertelnych 3-MMC nie było jedyną substancją, która przyczyniła się do zgonu. Charakterystyczne były natomiast w wielu przypadkach jego stosunkowo niskie stężenia, które były zapewne wynikiem długich odstępów czasu pomiędzy przyjęciem NSP i zgonem, a także procedur ratunkowych wdrażanych podczas leczenia szpitalnego. Dodatkowo do takiego stanu rzeczy z całą pewnością przyczynił się krótki biologiczny okres półtrwania 3-MMC, który jest szacowany na 0,8 h. Z tego względu wykazanie niskich stężeń 3-MMC nie wyklucza możliwości zatrucia tym katynonem.

Istotną częścią pracy była próba określenia wpływu 3-MMC na sprawność psychomotoryczną oraz korelacji tego wpływu ze stężeniami związku we krwi. Zagadnienie to zostało omówione poniżej.

Istotne znaczenie na scenie NSP miał również α -PVP, którego stężeniami we krwi oraz wpływem na sprawność psychomotoryczną, efektami jakie wywołuje oraz ich zależnością od stężenia zajęto się w kolejnych badaniach [H7]. Kwestie te omówiono w dalszym podrozdziale. α -PVP wykazano w 66 opracowywanych w IES ekspertyzach w okresie od początku 2014 roku do połowy 2015 r. Związek ten jest pochodną katynonu o budowie zbliżonej do pirowaleronu. α -PVP został opracowany w 1963 roku, ale na rynku 'dopalaczy' pojawił się kilka lat temu i stał się jednym z najczęściej wykrywanych NSP w Polsce (wykazano go w prawie 7% z 948 próbek analizowanych w kierunku NSP). Podobnie jak w przypadku 3-MMC, popularność tego związku intensywnie wzrastała, aż do czasu objęcia go kontrolą prawną. Wyznaczone stężenia α -PVP we wszystkich 66 przypadkach mieściły się w zakresie od śladowych (< 1 ng/ml) do 6,2 μ g/ml (średnia 140 ng/ml, mediana 27 ng/ml). Biorąc pod uwagę poszczególne rodzaje zdarzeń, w których wykryto ten związek, jego stężenia wynosiły odpowiednio: u osób podejrzanych o prowadzenie pojazdów po ich przyjęciu 6,4-991 ng/ml, u kierowców biorących udział w wypadkach drogowych 10,2-30 ng/ml, u posiadających narkotyki <1-98 ng/ml, zatrutych 1,2-56 ng/ml, zmarłych 1,1-6200 ng/ml i innych (m.in. gwałty i kradzieże) 2,6-136 ng/ml. Podobnie jak w przypadku 3-MMC zdecydowaną większością użytkowników α -PVP (prawie 88%) byli mężczyźni, a przeciętny wiek konsumenta był identyczny – 26 lat. W większości przypadków (43 z 66) α -PVP nie był jedyną substancją, którą wykazano we krwi. U osób hospitalizowanych z powodu zatrucia nie zaobserwowano żadnych efektów, a tylko u jednej wystąpiły zaburzenia widzenia, zawroty głowy oraz naprzemienne odczucie ciepła i zimna. Charakterystycznym efektem obserwowanym u użytkowników α -PVP była także agresja. Z 12 przytoczonych przypadków zgonów tylko w jednym α -PVP bezpośrednio przyczyniło się do zgonu (wykazane we krwi stężenie – 6,2 μ g/ml). Pomimo tego użycie tego katynonu wiąże się z dużym ryzykiem utraty zdrowia i życia. Przeprowadzona w publikacji dyskusja może pomóc w interpretacji stężeń α -PVP i przewidywaniu wywołanych efektów.

Oznaczanie i interpretacja stężeń MDPV (innej pochodnej katynonu i pirowaleronu o budowie zbliżonej do MDMA) we krwi była tematyką publikacji [H11]. W pracy przedstawiono cztery przypadki, w których wykazano tą substancję. W dwóch przypadkach śmiertelnych (wypadek samochodowy, zgon po imprezie) wyznaczone stężenia MDPV były znacznie niższe (38 i 17 ng/ml) niż w przypadkach, w których krew pobrano od osób żywych (306 i 124 ng/ml odpowiednio u kobiety podejrzanej o posiadanie narkotyków i kierowcy). We wszystkich badanych próbach krwi obecne były także inne substancje. W dwóch przypadkach wykazano pochodne benzodiazepiny co sugeruje, że są one przyjmowane w celu złagodzenia negatywnych efektów wywoływanych przez MDPV. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że biorąc pod uwagę rodzaje zdarzeń, które zaistniały z udziałem NSP, wyznaczone stężenia tego związku były w zakresach typowych wartości wcześniej opisywanych w literaturze.

Syntetyczne kannabinoidy

Największą, najbardziej zróżnicowaną i najszybciej rozwijającą się grupę NSP stanowią obecnie syntetyczne kannabinoidy. Mają one zdolność oddziaływania w organizmie na receptory kanabinoidowe, naśladując efekty wywoływane przez THC, czyli główną substancję psychoaktywną konopi. Jednakże produkty zawierające

syntetyczne kannabinoidy najczęściej nie zawierają marihuany. Są one sprzedawane jako preparaty roślinne i reklamowane jako „legalna” i „bezpieczna” alternatywa marihuany. Należy jednak podkreślić, że stosowane w stosunku do tych preparatów określenie „dopalacze roślinne” jest bardzo mylące. W rzeczywistości materiał roślinny jest tylko nośnikiem, na który nanoszone są substancje syntetyczne o słabszym lub silniejszym działaniu od THC. W ostatnim czasie pojawiły się także nowe produkty w postaci płynów zawierające syntetyczne kannabinoidy do użytku w elektronicznych papierosach [15].

Pierwszy syntetyczny kannabinoid – JWH-018 – pojawił się w Polsce w 2008 roku. Od tego czasu obserwowany jest ciągły wzrost liczby tych substancji wprowadzanych na rynek. W latach 2013-2015 najczęściej wykrywanym w produktach ‘dopalaczy’ syntetycznym kannabinoidem w Polsce był UR-144 [16]. Jego popularność spowodowała moje zainteresowanie tym związkiem, które zaowocowało dwoma publikacjami [H13 i H14].

W pierwszej z nich [H13] omówiono zagrożenia dla zdrowia i życia, które jest związane z przyjmowaniem UR-144. W pracy zaprezentowano przypadek zatrucia mężczyzny, który wypalił papierosa z nieznaną substancją. U mężczyzny wystąpiły drgawki, po czym stracił przytomność. Przy przyjeździe zespołu ratownictwa medycznego wciąż był nieprzytomny, ale po 15 minutach odzyskał przytomność. Miał wtedy halucynacje i twierdził, że „widzi surykatki”. Mężczyzna został zabrany do szpitala, gdzie po dniu hospitalizacji wrócił do zdrowia. W pracy opisano występujące u pacjenta objawy oraz parametry życiowe rejestrowane w szpitalu, a także zastosowane leczenie. Przedstawiono również obserwacje świadków i ratowników medycznych. Od mężczyzny pobrano krew i mocz, które nadesłano do badań wraz z zabezpieczonym woreczkiem foliowym z pozostałościami proszku. Ślady substancji poddano badaniom metodą GC-MS. W wyniku tych badań uzyskano dwa piki o zbliżonych czasach retencji i widmach. Pierwszy z nich zidentyfikowano jako UR-144. Obecność drugiego piku wytłumaczono termiczną degradacją pierścienia cyklopropylowego, która następowała w komorze nastrojkowej. Ze względu na fakt, że syntetyczne kannabinoidy są przyjmowane poprzez palenie rozważono możliwość powstawania tego samego produktu również podczas przyjmowania UR-144. Dlatego próba krwi była analizowana nie tylko w kierunku związku macierzystego, ale także produktu pirolizy (1-(1-pentylo-1H-indolo-3-ylo)-3-metylo-2-(propano-2-ylo)but-3-en-1-onu). Badania prowadzone przy użyciu aparatu LC-QQQ-MS potwierdziły obecność we krwi obu związków. Monitorowano 6 par MRM, z których 4 były wspólne dla obu związków. Piki poszczególnych par MRM różniły się intensywnościami oraz czasami retencji. W przypadku tej metody związek macierzysty został zidentyfikowany jako drugi pik na chromatogramie. Wyznaczone we krwi stężenie UR-144 wynosiło 6,1 ng/ml. Obecność obu związków we krwi sprawiła, że zdecydowano się analizować mocz w kierunku ich metabolitów. Badania moczu prowadzono za pomocą aparatu LC-QTOF-MS. Przeprowadzone eksperymenty ujawniły w moczu obecność pięciu metabolitów, podczas gdy związki macierzyste były nieobecne. Potwierdziło to hipotezę, że UR-144 jest intensywnie metabolizowany i wydalany z moczem w formie metabolitów. Dane dotyczące czasu zdarzenia i czasu pobrania prób materiału pozwoliły na porównanie stężeń tego syntetycznego kannabinoidu z innymi (AM-2201, JWH-018, a także THC). Występujące u mężczyzny objawy – utrata przytomności, drgawki, afazja, tachykardia, halucynacje – mogły być jednoznacznie skojarzone z obecnością UR-144 w organizmie

i powiązane z wyznaczonym stężeniem. Opisany przypadek wskazywał zagrożenia dla zdrowia i życia, które jest związane z przyjmowaniem UR-144.

Kolejna praca [H14] również związana była z obecnością syntetycznego kannabinoidu UR-144 we krwi. W pracy opisano objawy wskazujące na upośledzenie sprawności psychomotorycznej, które wystąpiły u sprawcy wypadku samochodowego i zostały zaobserwowane przez funkcjonariuszy policji oraz lekarza. Mężczyzna nie odniósł w nim obrażeń, ale ze względu na uszkodzenia samochodu nie mógł się z niego wydostać. Policja przybyła na miejsce i uwolniła mężczyznę, ale miała z nim utrudniony kontakt. Spowodowało to zabranie go na badania i pobranie krwi. Badania przeprowadzone przez lekarza wskazywały, że mężczyzna może być pod działaniem narkotyków. Dokonana przez mnie analiza krwi ujawniła obecność UR-144 w stężeniu 14,6 ng/ml (jak również produktu pirolizy). Uzyskane dane dotyczące wchłaniania oraz wywoływanych efektów porównano z tymi dla innych syntetycznych kannabinoidów (m.in. AM-2201 i JWH-018) oraz THC. Zagadnienia związane z wpływem UR-144 na sprawność psychomotoryczną omówiono poniżej.

Nowe syntetyczne kannabinoidy pojawiają się między innymi jako efekt ciągłej nowelizacji Ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii. Te, które stają się kontrolowane są natychmiast zastępowane przez nowe niekontrolowane substancje. Ostatnia zmiana ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii spowodowała zmianę statusu 114 substancji, w tym 30 syntetycznych kannabinoidów, które zostały wprowadzone na listę środków odurzających grupy I-N i są kontrolowane od 1 lipca 2015 roku. Zmiany te prawdopodobnie przyczyniły się do znaczących zmian w składzie preparatów roślinnych sprzedawanych na terenie naszego kraju. Na początku lipca 2015 roku media w Polsce informowały o wielu zatruciach 'dopalaczami'. W ciągu dwóch tygodni odnotowano kilkaset przypadków zatruc, w tym śmiertelnych, które w większości wiązano z przyjęciem preparatu „Mocarz”. Produkt o tej nazwie był obecny na polskim rynku co najmniej od 2010 [17]. Był to jeden z najbardziej popularnych preparatów roślinnych, ale jego skład chemiczny zmieniał się w czasie. Według danych IES i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie w kolejnych latach identyfikowano w nim JWH-203, JWH-081, JWH-019 (2010), UR-144, 5F-AKB48 (2014), UR-144, XLR-11 i MDMB-CHMICA (2015).

Pomimo tak wielu przypadków zatruc, rutynowe analizy materiału biologicznego pobieranego od hospitalizowanych pacjentów nie były prowadzone. W latach 2015-2016 nadesłano do badań do IES materiał pobrany od kilkunastu osób zatrutych syntetycznymi kannabinoidami. Jeden z przypadków, który opublikowałem w kolejnej pracy [H15] dowodzi, że wiele ostrych zatruc obserwowanych w Polsce w lipcu 2015 roku mogło być wynikiem użycia preparatu „Mocarz” zawierającego MDMB-CHMICA.

Przypadek dotyczył młodego mężczyzny, który wypalił zakupione przez Internet 'dopalacze'. Przyjęcie preparatu „Czeszący grzebień” (zawierającego prawdopodobnie UR-144 lub XLR-11), zgodnie z zeznaniami świadków, skutkowało odurzeniem, ale nie doprowadziło do tragicznych konsekwencji. Po kilku godzinach od przyjęcia tego 'dopalacza' mężczyzna zapalił drugi produkt – „Mocarz”. W następstwie tego mężczyzna upadł na podłogę, wymiotował i charczał, po czym utracił przytomność. Przy przyjęciu do szpitala, pacjent był głęboko nieprzytomny (Skala Glasgow 3), wiotki, niewydolny krążeniowo i oddechowo, bez głębokich odruchów ścięgnistych, bez oznak funkcjonowania OUN. Pomimo intensywnego leczenia, stan pacjenta się nie poprawiał. W czwartym dniu hospitalizacji doszło do zatrzymania krążenia i mężczyzna zmarł. W wyniku autopsji lekarz medycyny sądowej stwierdził wystąpienie niewydolności

oddechowej, krążenia, serca, nerek i wątroby, a także uszkodzenie OUN. Przyjętą przez lekarza przyczyną śmierci była niewydolność wielonarządowa. Krew, żółć i wycinki narządów wewnętrznych (mózgu, płuca, żołądka, wątroby, nerki) zostały pobrane podczas sekcji zwłok i przesłane do IES wraz z przyżyciowo pobraną próbką krwi (pobraną dwie godziny po przyjęciu preparatu „Mocarz”) celem przeprowadzenia analizy toksykologicznej.

W wyniku przeprowadzonych badań we krwi pobranej przyżyciowo wykazano obecność MDMB-CHMICA w stężeniu 5,6 ng/ml. Pomimo, że mężczyzna zmarł po czterech dniach hospitalizacji ślady tego związku wykazano także we krwi sekcyjnej oraz żółci, mózgu, żołądka, wątrobie i nerce. Bardzo duże powinowactwo MDMB-CHMICA do receptora CB₁ sprawia, że dawki działające tego związku są bardzo niskie (0,05-0,3 mg). W konsekwencji bardzo łatwo o przedawkowanie, a niewiedza co do składu przyjmowanego preparatu potęguje zagrożenia. Analiza wyników pozwoliła przyjąć, że MDMB-CHMICA wywołał szereg niekorzystnych skutków (nudności, utratę przytomności, niewydolność krążeniową, niewydolność oddechową, arefleksję). Niewydolność wielonarządowa doprowadziła w konsekwencji do zgonu. Wykazane stężenie MDMB-CHMICA we krwi przyżyciowej, jak i wywołane przez ten związek efekty, były podobne do tych obserwowanych w przypadkach ostrych zatruc po przyjęciu innych syntetycznych kannabinoidów. Stosunkowo wysokie stężenie MDMB-CHMICA w mózgu było zgodne z danymi dotyczącymi dystrybucji THC. Opisany przypadek pokazał jak duże zagrożenie dla zdrowia, a nawet utraty życia ich użytkowników stanowi przyjęcie substancji o nieznanym działaniu i nieznannej toksyczności.

Inne NSP

W publikacjach z wybranego jednotematycznego cyklu zajmowałem się głównie syntetycznymi katynonami i kannabinoidami. W pracy [H2] badaniami objąłem ponadto związki z grup tryptamin, fenetyloamin, aryloalkiloamin, arylocykloheksyloamin, aminoindanów, piperydyn, piperazyn i innych. Wśród NSP, które wykrywałem w materiale nadsyłanym do badań oznaczano, prócz katynonów i syntetycznych kannabinoidów, także fenetyloaminy, piperazyny, piperydyny i aryloalkilaminy [H5]. Większą uwagę skupiłem na aryloalkiloaminie 5-APB, która była tematem publikacji [H8] oraz MXE, którą można zaliczyć do arylocykloheksyloamin [H12].

MXE jest nową substancją, która została po raz pierwszy zidentyfikowana w ‘dopalaczach’ w 2010 roku. Budową jest zbliżona do fencyklidyny oraz ketaminy. Pomimo, że MXE była popularna wśród użytkowników ‘dopalaczy’ nie opublikowano zbyt wielu prac opisujących zatrucia tym związkiem, a te nieliczne dotyczyły zatruc złożonych. W publikacji [H12] przedstawiono wyniki badań moczu oraz suchych płam krwi w kierunku MXE. Opisane zatrucie śmiertelne MXE było pierwszym opublikowanym przypadkiem, w którym zgon mógł być jednoznacznie powiązany z przyjęciem tej substancji. Materiał do badań został pobrany ze zwłok mężczyzny, przy których znaleziono 28 opakowań z różnymi preparatami ‘dopalaczy’. Niestety pakiet z krwią został zniszczony podczas transportu, a krew wyciekła i wsiąknęła w tekturowe opakowanie. W związku z powyższym w pierwszej kolejności badaniom poddano mocz, w którym wykazano obecność MXE w stężeniu 85 µg/ml. Ze względu na wykazanie w moczu MXE w tak wysokim stężeniu zdecydowałem się poddać badaniom płamy krwi z opakowania. W tym celu określono kolejno gramaturę tektury, z której wykonane było opakowanie (400 g/m²), a następnie masę wyschniętej krwi (z 1 ml pozostawało 0,1795

$\pm 0,0173$ g). Te dane umożliwiły przygotowanie krzywej kalibracyjnej dla suchych plam krwi, a następnie oszacowanie stężenia MXE we krwi, które wynosiło 5,8 $\mu\text{g/ml}$. Takie stężenie MXE we krwi znacznie przekraczało stężenia występujące u osób, które stosowały tę substancję i nie uległy ostremu zatruciu.

Stężenia NSP we krwi

Określenie zakresów stężeń terapeutycznych (niskich, dla środków niemających zastosowania leczniczego), toksycznych i spotykanych w przypadkach zatruc śmiertelnych jest niezwykle istotne dla interpretacji uzyskanych wyników i orzecznictwa sądowego. Niestety w przypadku NSP brak jest danych, które umożliwiłyby określenie takich zakresów. Środki te najczęściej nie są stosowane terapeutycznie, a więc nie istnieje możliwość monitorowania stężeń po podaniu określonych dawek. Dlatego wyniki pochodzące z rutynowej pracy eksperckiej stanowią cenne źródło takich danych.

Wieloletnie badania pozwoliły na określenie stężeń NSP w różnych materiałach biologicznych, głównie we krwi. Dla popularnych NSP można było określić zakresy stężeń, które były obserwowane w różnych rodzajach zdarzeń. Takie dane odnoszące się do 3-MMC i α -PVP zebrałem, opracowałem i omówiłem w dwóch publikacjach [H6 i H7]. Zakresy, które przedstawiłem w obu pracach oparłem na odpowiednio 95 i 66 przypadkach analizowanych w ramach pracy eksperckiej w IES, w których wykazano powyższe katynony. W tabelach I i II przedstawiłem wyznaczone zakresy stężeń.

Tabela I. Zakresy stężeń 3-MMC wyznaczone dla różnych typów zdarzeń [ng/ml] ($n = 95$) [H6]

	Prowadzenie pojazdów ($n = 66$)	Wypadki drogowe ($n = 4$)	Posiadanie narkotyków ($n = 9$)	Zatrucia ($n = 6$)	Inne ($n = 10$)	Wszystkie ($n = 95$)
C min	1	<1	2	<1	<1	<1
C max	171	29	408	1600	61	1600
C średnie	35,8	8,8	51,6	276,2	23,9	51,3
C mediana	18,0	2,9	21,0	16	19,8	18,5

Tabela II. Zakresy stężeń α -PVP wyznaczone dla różnych typów zdarzeń [ng/ml] ($n = 66$) [H7]

	Prowadzenie pojazdów ($n = 24$)	Wypadki drogowe ($n = 4$)	Posiadanie narkotyków ($n = 10$)	Zatrucia nie śmiertelne ($n = 4$)	Zgony ($n = 12$)	Inne ($n = 12$)	Wszystkie ($n = 66$)
C min	6,4	10,2	<1	1,2	1,1	1,9	<1
C max	99	30,0	98	56	6200	136	6200
C średnie	38,3	22,8	25,3	20,0	629,1	28,9	140,0
C median	32,0	25,5	21,0	21,3	23,8	15,0	27,0

Stężenia wyznaczone w przypadkach prowadzenia pojazdu, spowodowania wypadku drogowego oraz posiadania narkotyków można traktować jako stężenia, które są typowymi dla przypadków odurzania się tymi substancjami. Do tej samej grupy

można zaliczyć także inne przypadki i zatrucia nie śmiertelne. Należy zaznaczyć, że często klasyfikacja zdarzeń była trudna, niejednokrotnie też brak danych uniemożliwiał lub utrudniał prawidłową ich klasyfikację. Jak łatwo zaobserwować w powyższych tabelach zakresy stężeń mogą nakładać się na siebie. Zarówno w przypadku 3-MMC jak i α -PVP spotkano się z przypadkami zgonów, w których wykazywano te substancje w bardzo niskich stężeniach około 1 ng/ml. Powodów takiego stanu rzeczy mogło być kilka. Zgon mógł nastąpić z przyczyn innych niż zatrucie, a z kolei w przypadku zatrucia te katynony mogły nie być jedynymi substancjami wykrytymi w materiale. Ponadto zgon mógł nastąpić po dłuższym czasie i intensywnych zabiegach ratowania życia, co może wpływać na obniżenie stężenia ksenobiotyku we krwi. Należy też mieć na uwadze, że efekt toksyczny może wystąpić także przy niskich stężeniach. Średnie i mediany stężeń dla zatruć (tabela I) i zgonów (tabela II) są jednak znacząco wyższe niż dla pozostałych typów zdarzeń.

Pomimo, że dane dotyczące stężeń 3-MMC i α -PVP we krwi są najliczniejsze to pozostałe moje publikacje również dostarczają wielu cennych informacji do interpretacji wyników analizy w odniesieniu do ciężkości zatrucia. W szczególności te, które szczegółowo opisują przypadki zatruć i wyznaczone stężenia we krwi, a ich przyczyna może być jednoznacznie skojarzona z przyjęciem konkretnej substancji. Przykładem mogą być zatrucia mefedronem (5,5 μ g/ml) [H1], MXE (5,8 μ g/ml) [H12], MDMB-CHMICA (5,6 ng/ml) [H15] oraz 3-MMC (1,6 μ g/ml) i 5-APB (5,6 μ g/ml) [H8]. Niektóre powyższe przypadki są cytowane m.in. w książce *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man* pod redakcją Randalla C. Baselta [18], która jest szczególnie przydatna dla osób interpretujących wyniki analiz toksykologicznych. Zakresy stężeń dla innych NSP przedstawiono w tabeli IV.

Rozpowszechnienie NSP

Badania materiału biologicznego nadsyłanego do IES pozwoliły na rozpoznanie rozpowszechnienia używania NSP, rodzaju przyjmowanych środków oraz schematów ich używania. W pracy [H5] podsumowałem trzyletni okres, obejmujący lata 2012-2014. W objętym analizie czasie przebadano ponad 1000 prób krwi w kierunku NSP. W 112 próbach wykazano obecność co najmniej jednej NSP, z których 75 dotyczyło roku 2014, wskazując na coraz większe ich rozpowszechnienie. Zestawiając NSP z klasycznymi narkotykami, rozpowszechnienie NSP jest porównywalne do tego obserwowanego dla amfetaminy (drugiej po THC wykrywanej we krwi substancji) i można je oszacować na poziomie kilkunastu procent spraw pozytywnych. Analizowane zdarzenia dotyczyły głównie przypadków prowadzenia pojazdów po użyciu środków odurzających, spowodowania wypadków drogowych po ich przyjęciu, posiadania lub używania narkotyków, kradzieży, zgwałceń, porwań, samobójstw oraz zatruć, w tym zatruć śmiertelnych. Wykryte NSP należały do grup: katynonów (88%), syntetycznych kannabinoidów (5%), fenetylamin (3%), piperazyn i piperydyn (3%), aryloalkiloamin (1%) i innych (1%). Najczęściej wykrywanymi substancjami były (w nawiasach podano liczbę identyfikacji): 3-MMC (50), α -PVP (23), pentedron (16), 3',4'-metylenodioksy- α -pirolidinobutyrofenon (MDPBP) (12), UR-144 (7), etkatynon (5), mefedron (5), MDPV (4), 4-MEC (3), bufedron (3), dezoksypipradrol (2-DPMP) (3), metylon (2) i 2C-B (2). W pojedynczych przypadkach wykazano 2-MMC, 2C-P, eutylon, 25I-NBOMe, meta-chlorofenylopiiperazynę (mCPP), efedron, metiopropaminę (MPA) i 5-APB. Należy zaznaczyć, że nie wszystkie związki były wykrywane przez cały trzyletni okres badań.

Jedne się pojawiały, a inne znikwały z rynku, co jest cechą charakterystyczną dla NSP. MDPV, 2C-B, 2C-P, bufedron i mCPP zostały wykryte tylko w 2012 roku, podczas gdy 5-APB, eutylon i MPA tylko w 2013 roku. α -PVP, 2-MMC, 25I-NBOMe oraz efedron wykazano w ekspertyzach tylko z 2014 roku. Niektóre substancje były obecne przez dwa lub trzy lata, ale częstość ich wykrywania się zmieniała. Pentedron, MDPBP i UR-144 były obecne przez trzy lata, ale wykrywano je coraz częściej. 3-MMC wykazano w 11 przypadkach z 2013 r. i w 39 z 2014 r. Częstość wykrywania poszczególnych NSP w kolejnych latach przedstawiono w tabelach III i IV.

Tabela III. Częstość wykrywania poszczególnych NSP w latach 2012-2014 [H5].

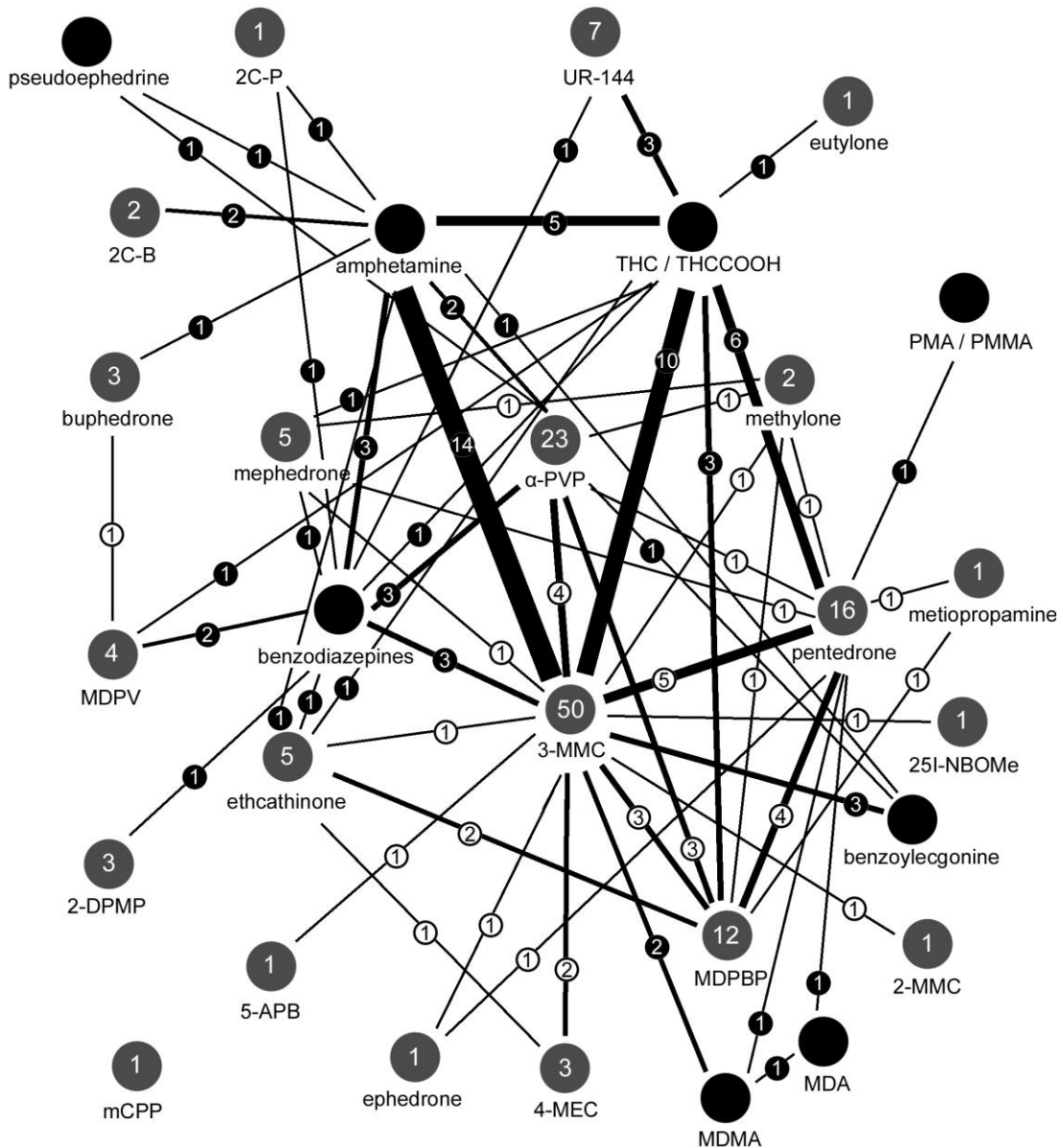
Substancja	Liczba identyfikacji w latach			
	2012	2013	2014	2012-2014
3-MMC		11	39	50
α -PVP			23	23
pentedron	1	5	10	16
MDPBP	1	4	7	12
UR-144	1	1	5	7
etkatynon		1	4	5
mefedron	2	1	2	5
MDPV	4			4
4-MEC	1		2	3
bufedron	3			3
2-DPMP	2	1		3
2C-B	2			2
metylon	1		1	2
25I-NBOMe			1	1
2C-P	1			1
2-MMC			1	1
5-APB		1		1
efedron			1	1
eutylon		1		1
mCPP	1			1
MPA		1		1

W wielu analizowanych przypadkach stwierdzono obecność więcej niż jednej NSP, a często NSP wraz z konwencjonalnymi narkotykami, takimi jak amfetaminy, kannabinole, kokaina, a także lekami z grupy pochodnych benzodiazepiny, które bywają stosowane w celach niemedycznych. Obecność pojedynczej NSP wykazano w 35% przypadków, natomiast dwie lub więcej NSP w 19% pozytywnych przypadków. NSP łącznie z konwencjonalnymi narkotykami wykazano w 65% przypadków. Obecność więcej niż jednej nowej substancji w materiale biologicznym może być wytłumaczona na dwa sposoby – przyjęciem większej liczby substancji lub też przyjęciem preparatu

zawierającego więcej niż jeden składnik. Najczęściej obserwowano jednoczesną obecność związków z grupy katynonów – głównie 3-MMC, α -PVP, pentedronu i MDPBP. Z tradycyjnych środków obecnych w badanych materiałach wraz z NSP należy wymienić (z zachowaniem częstości ich identyfikacji): THC i/lub jego metabolit THCCOOH, amfetaminę, klonazepam i/lub jego metabolit 7-aminoklonazepam, diazepam, benzoiloeogoninę (metabolit kokainy), nordiazepam i MDMA. W pojedynczych przypadkach wykazano także MDA, PMA, PMMA i pseudoefedrynę. Szczegółowe połączenia pomiędzy poszczególnymi NSP i klasycznymi środkami przedstawiono na rysunku 5.

Tabela IV. Liczba identyfikacji NSP oraz wyznaczone we krwi stężenia (112 przypadków, 143 identyfikacje NSP, lata 2012-2014) [H5].

Substancja	Liczba identyfikacji	Zakres stężeń [ng/ml]	Średnie stężenie [ng/ml]	Mediana stężeń [ng/ml]
3-MMC	50	<1 – 1600	96	13
α -PVP	23	3,6 – 650	74,5	31
pentedron	16	8,6 – 360	98,4	27
MDPBP	12	2 – 7010	620	45
UR-144	7	0,6 – 19	8,3	6,1
etkatynon	5	9 – 114	43,4	23
mefedron	5	13 – 5500	1774	692
MDPV	4	17 – 306	117	72
4-MEC	3	28 – 208	104,7	78
bufedron	3	0,7 – 200	60,4	20,5
2-DPMP	3	22 – 57	33,7	22
2C-B	2	1,6; 14	7,8	7,8
metylon	2	1,6; 115	58,3	58,3
25I-NBOMe	1	3	-	-
2C-P	1	nie wyznaczone	-	-
2-MMC	1	1,4	-	-
5-APB	1	5600	-	-
efedron	1	200 (w moczu)	-	-
eutylon	1	33	-	-
mCPP	1	15	-	-
MPA	1	9,5	-	-



Rys. 5. Połączenia (wspólna obecność we krwi) pomiędzy NSP (szare kółka) i konwencjonalnymi narkotykami (czarne kółka). Liczbę identyfikacji i liczbę połączeń przedstawiono w kółkach [H5].

Wpływ na sprawność psychomotoryczną

NSP stają się coraz częściej używanymi substancjami psychoaktywnymi na całym świecie. Prowadzenie pojazdów pod ich wpływem jest coraz powszechniejsze i staje się problemem szczególnie istotnym w odniesieniu do bezpieczeństwa ruchu drogowego. Obecny stan wiedzy na temat wpływu NSP na sprawność psychomotoryczną jest bardzo ograniczony. Badania laboratoryjne są prowadzone w bardzo ograniczonym zakresie, a opisy przypadków rzadko publikowane. Sprawę komplikuje fakt dynamicznych zmian na rynku NSP, co sprawia, że ewentualne dane często dotyczą substancji już nie stosowanych. Z tego względu w kilku pracach [H6, H7, H9, H10, H11, H14]

podejmowałem próby określenia wpływu wybranych NSP na sprawność psychomotoryczną kierowców. Ograniczeniem uzyskanych przeze mnie danych jest brak standaryzacji oceny wpływu i obserwowanych efektów. Analizowane substancje często występowały niesamodzielnie, a więc obserwowane efekty mogły być wynikiem ich synergistycznego działania. Z kolei zaletą jest to, że są to dane pochodzące z autentycznych sytuacji, które miały miejsce na drodze, a takie dane są znacznie bardziej adekwatne do rzeczywistości niż testy eksperymentalne prowadzone w warunkach laboratoryjnych.

Najbardziej istotne wydają się prace, które dotyczyły najpopularniejszych w naszym kraju NSP, należących do grupy katynonów. Wcześniejsze publikacje wskazywały, że pochodne katynonu mogą upośledzać sprawność psychomotoryczną, a prowadzenie pojazdów po ich użyciu stwarza zagrożenie dla użytkowników dróg publicznych, pasażerów i pieszych [19]. W pracy [H7] analizowałem dane zebrane od 28 kierowców oraz 22 osób, które stosowały α -PVP. Pomimo, że najbardziej użyteczną grupą były osoby, u których wykazano tylko tą substancję, oddzielnie analizowano również osoby, u których wykazano α -PVP wraz z innymi środkami. Stężenia α -PVP wyznaczano w ramach rutynowej pracy eksperckiej, a zaobserwowane objawy pochodziły głównie z protokołów pobrania krwi wypełnianych przez lekarza podczas pobierania tych prób oraz innych ustaleń faktycznych w sprawach. Grupę kierowców, u których wykazano tylko α -PVP podzielono na dwie podgrupy – z objawami i bez objawów. W podgrupie bez postrzegalnych objawów wykazane stężenia mieściły się w zakresie 6,4-71 ng/ml (średnia 32,8 ng/ml, mediana 31,0 ng/ml), natomiast w podgrupie kierowców, u których wystąpiły objawy wykazane stężenia mieściły się w podobnym zakresie 8,2-68 ng/ml, ale średnia i mediana były wyższe, odpowiednio 40,1 ng/ml i 42,0 ng/ml. Istotniejsze objawy, które występowały u kierowców to dezorientacja, agresja, pobudzenie, niepewny i chwiejny chód, gadatliwość i zaburzenia mowy. U osób tych wielkość źrenic była zmienna (stwierdzano zarówno wąskie, jak i szerokie, słabo reagujące na światło). Podobna sytuacja była obserwowana dla kierowców, u których wykazano α -PVP wraz z innymi NSP i/lub klasycznymi narkotykami. Średnie i mediany dla kierowców bez objawów (28,3 ng/ml i 24,0 ng/ml) były niższe niż dla kierowców z postrzegalnymi objawami (51,3 ng/ml i 40,5 ng/ml). Dodatkowo przeanalizowane dane dla pozostałych użytkowników α -PVP potwierdziły powyższe wyniki. Sugeruje to, że α -PVP upośledza sprawność psychomotoryczną, a wystąpienie objawów koreluje z wyższymi stężeniami α -PVP we krwi. Do potwierdzenia tej hipotezy zastosowano test U Manna-Whitneya. Pomimo, że niektóre parametry były niskie, uzyskane dane wskazały na korelację stężeń i objawów. Można było także zaproponować stężenie 40 ng/ml, jako wartość odcięcia dla prognozowania istotnego wpływu na sprawność psychomotoryczną. Uzyskane dane wskazują więc, że stopień upośledzenia sprawności psychomotorycznej, a więc także i ryzyko spowodowania wypadku, może wzrastać wraz ze stężeniem α -PVP we krwi.

Podobne badania przeprowadzono dla 3-MMC, a uzyskane wyniki przedstawiono w pracy [H6]. Tak jak powyżej, kierowców podzielono na dwie grupy (cztery podgrupy). U kierowców, u których wystąpiły objawy, były one zbliżone do tych obserwowanych po użyciu α -PVP. Pomimo, że grupa badanych była stosunkowo duża i liczyła 70 osób, to uzyskane wyniki były niejednoznaczne. W żadnej z grup nie stwierdzono korelacji pomiędzy określonym poziomem stężeń 3-MMC a występowaniem objawów. Może istnieć kilka wyjaśnień takiej sytuacji. Po pierwsze, bardzo krótki biologiczny okres półtrwania 3-MMC (0,8 h) powoduje szybkie obniżanie się stężeń tego związku we krwi.

Kolejnym problemem jest brak stabilności 3-MMC, w szczególności, gdy materiał jest przechowywany w niewłaściwych warunkach. Istnieją badania wskazujące, że przechowywanie zamrożonej (-20°C) krwi nie powoduje degradacji mefedronu (izomeru 3-MMC), podczas gdy w $+4^{\circ}\text{C}$ i w temperaturze pokojowej zaobserwowano znaczne obniżenie się stężeń tego związku (już po kilku dniach) [20]. Pomimo, że w IES zapewnione są odpowiednie warunki przechowywania materiału biologicznego, to poza kontrolą pozostaje etap pomiędzy pobraniem próbek krwi, a dostarczeniem do badań. Po trzecie, brak korelacji między stężeniami 3-MMC i objawami może być wynikiem zjawiska tolerancji. Osoby, u których nie występują postrzegalne objawy, a posiadają wysokie stężenia NSP we krwi, mogą być częstymi użytkownikami tych środków. Dlatego skorelowanie stężenia 3-MMC z objawami i stopniem upośledzenia wymaga dalszych badań.

W kolejnych publikacjach wskazano, że także inne pochodne katynonu mogą upośledzać sprawność psychomotoryczną i w konsekwencji zwiększać ryzyko uczestniczenia w wypadku. Tak było w przypadku bufedronu, MDPV i 4-MEC, których obecność stwierdzono w próbach krwi pobranych od dwóch kierowców zmarłych w wyniku obrażeń odniesionych podczas wypadków samochodowych [H9 i H10]. W obu przypadkach wykazane stężenia były stosunkowo wysokie, ale jednoczesna obecność odpowiednio bufedronu i MDPV oraz 4-MEC i alkoholu etylowego uniemożliwia jednoznaczne powiązanie upośledzenia sprawności tylko z jednym konkretnym związkiem. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku kolejnego kierowcy zatrzymanego do kontroli drogowej, u którego zaobserwowano objawy mogące świadczyć o byciu pod działaniem środków odurzających (słabo reagujące na światło źrenice oraz bełkotliwa mowa). W pobranej krwi także wykazano obecność kilku substancji – MDPV, THC i jego metabolitu oraz metabolitu JWH-018 [H11].

W jednej z prac [H14] próbowałem określić wpływ syntetycznego kannabinoidu UR-144 na sprawność psychomotoryczną. Podstawą moich rozważań był wcześniej opisany wypadek samochodowy. Uczestniczył w nim mężczyzna, u którego we krwi wykazano obecność UR-144 w stężeniu $14,6\text{ ng/ml}$ oraz produktu jego pirolizy. Krew pobrano dwie godziny po zdarzeniu, a lekarz pobierający zaobserwował rozszerzone źrenice, słabo reagujące na światło, zaburzenia ruchu i chwiejny chód. Powyższe objawy wraz z tymi zaobserwowanymi przez funkcjonariuszy policji (pobudzenie i utrudniona komunikacja) świadczyły, że mężczyzna jest pod działaniem środka odurzającego. Jako, że nie istniały prace dotyczące wpływu UR-144 na sprawność psychomotoryczną w swoich rozważaniach opierałem się na danych dotyczących THC i innych syntetycznych kannabinoidów (m.in. JWH-018 i AM-2201). U kierowców stosujących inne syntetyczne kannabinoidy stężenia i objawy były zbliżone do opisanych przeze mnie. Dawki i wyznaczone stężenie UR-144 porównałem do dawek i stężeń THC, w szczególności w odniesieniu do ewentualnego czasu przyjęcia. Udało się znaleźć szereg podobieństw pomiędzy tymi dwoma substancjami. Rozważałem także wpływ właściwości farmakokinetycznych UR-144 na procesy jego wchłaniania oraz wpływ właściwości farmakodynamicznych (i oddziaływania z receptorami kannabinoidowymi) na wywoływane przez ten związek efekty. Dodatkowo rozważyłem wpływ nośnika, z którym jest palony UR-144 na wchłanianie i wywoływane efekty. Całościowe spojrzenie na te zagadnienia pozwoliło na stwierdzenie, że przyjęcie UR-144 może prowadzić do upośledzenia sprawności psychomotorycznej i stanowić zagrożenie dla bezpieczeństwa ruchu drogowego.

PODSUMOWANIE BADAŃ

Rynek narkotykowy NSP ma swoją specyfikę. Polega ona m.in. na dynamicznych zmianach szerokiego spektrum związków, a także równoczesnym przyjmowaniu wielu różnych substancji. Wymagało to opracowania nowego systemu, pozwalającego na identyfikację NSP przyjmowanych przez użytkowników. Aby to było możliwe, konieczne było opracowanie selektywnych i czułych metod analitycznych umożliwiających identyfikację i oznaczanie nowych substancji w materiałach biologicznych. Zastosowanie tych metod w praktyce miało istotne znaczenie zarówno poznawcze, jak i praktyczne. Skuteczność opracowanych metod została udowodniona poprzez ich zastosowanie w rutynowej pracy eksperckiej. Uzyskane wyniki badań dostarczyły szeregu danych toksykologicznych, farmakokinetycznych i farmakodynamicznych.

Podsumowując, głównymi osiągnięciami badań opisanych w pracach tworzących jednotematyczny blok publikacji było:

- opracowanie i optymalizacja czułej i specyficznej przesiewowej metody (LC-MS/MS) służącej do wykrywania i wstępnej identyfikacji NSP we krwi,
- opracowanie, optymalizacja i walidacja szeregu metod analitycznych służących do oznaczania NSP w materiale biologicznym,
- prowadzenie prekursorskich w skali kraju analiz materiału biologicznego na obecność NSP,
- określenie poziomów stężeń niskich, toksycznych i śmiertelnych dla NSP (wiele z prac wchodzących w skład cyklu były pierwszymi opublikowanymi w czasopiśmie o zasięgu światowym, w których oznaczono i przedstawiono stężenia wybranych NSP we krwi),
- ocenienie objawów działania NSP, przy wyznaczonym ich stężeniu w płynach ustrojowych,
- oszacowanie wpływu NSP na organizm, w tym na sprawność psychomotoryczną,
- dostarczenie danych epidemiologicznych odnośnie do rodzaju najczęściej przyjmowanych NSP w Polsce, w tym powodujących zatrucia ostre i/lub śmiertelne oraz schematów ich przyjmowania,
- dostarczenie wielu danych świadczących o realnym zagrożeniu zdrowia i życia związanym z przyjmowaniem NSP.

PIŚMIENNICTWO

1. Shulgin A., Shulgin A. PiHKAL: A Chemical Love Story. Transform Press, 1991.
2. Shulgin A., Shulgin A. TiHKAL: The Continuation. Transform Press, 1997.
3. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) reports. <http://www.emcdda.europa.eu/> (dostępne 9 marca 2016)
4. Gil D., Adamowicz P. Determination of 2C-B in biological material. *Probl Forensic Sci* 2011, 88, 316-323.
5. Council Decision 2005/387/JHA on the information exchange, risk-assessment and control of new psychoactive substances; Official Journal of the European Union Legislation 2005, 127, 32-37

6. The 1961 United Nations Single Convention on Narcotic Drugs
http://www.unodc.org/pdf/convention_1961_en.pdf (dostępne 9 marca 2016)
7. The 1971 UN Convention on Psychotropic Substances
www.unodc.org/pdf/convention_1971_en.pdf (dostępne 9 marca 2016)
8. Europejski Raport Narkotykowy, Tendencje i osiągnięcia, Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (EMCDDA), Lizbona, 2014.
http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_228272_PL_TDAT14001PLN.pdf (dostępne 9 marca 2016)
9. Wohlfarth A., Weinmann W. LC-MS/MS screening method for designer amphetamines, tryptamines, and piperazines in serum. *Anal Bioanal Chem* 2010, 396, 2403-2414.
10. Strano-Rossi S., Odoardi S., Fisichiella M., Anzillotti L., Gottardo R., Tagliaro F. Screening for new psychoactive substances in hair by ultrahigh performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2014, 1372, 145-156.
11. Tang M.H.Y., Ching C.K., Lee C.Y.W., Lam Y.H., Mak T.W.L. Simultaneous detection of 93 conventional and emerging drugs of abuse and their metabolites in urine by UHPLC-MS/MS. *J Chromatogr B* 2014, 969, 272-284.
12. Rose S.R., Poklis J.L., Poklis A. A case of 25I-NBOMe (25-I) intoxication: a new potent 5-HT_{2A} agonist designer drug. *Clin Toxicol (Phila)* 2013, 51(3), 174-177.
13. Gurney S.M., Scott K.S., Kacinko S.L., Presley B.C., Logan B.K. Pharmacology, toxicology, and adverse effects of synthetic cannabinoid drugs. *Forensic Sci Rev* 2014, 26, 53-78.
14. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *J Anal Toxicol* 2013, 37, 452-474.
15. Cunningham A., Gallegos A., Francis W., Evans-Brown M. Harms arising from the use of synthetic cannabinoid products. EMCDDA (2015).
http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_242518_EN_07_LXAddictions_ACU_cannabinoids_FINAL.pdf (dostępne 9 marca 2016)
16. Zuba D. New psychoactive substances – a contemporary challenge for forensic toxicologists, *Probl Forensic Sci* 2014, 100, 359-385.
17. Note on outbreak of intoxications suspected to be caused by legal high product name "Mocarz" in Poland (2015).
https://legal-high-inhaltsstoffe.de/sites/default/files/uploads/information_mocarz.pdf (dostępne 9 marca 2016)
18. Baselt R.C. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 10th edition, Biomedical Publications, Seal Beach, CA, 2014.
19. Maas A., Wippich C., Madea B., Hess C. Driving under the influence of synthetic phenethylamines: a case series. *Int J Legal Med* 2015, 129, 997-1003.
20. Johnson R.D., Botch-Jones S.R. The stability of four designer drugs: MDPV, mephedrone, BZP and TFMPP in three biological matrices under various storage conditions. *J Anal Toxicol* 2013, 37, 51-55.