



archiwum medycyny sądowej i kryminologii

Praca oryginalna
Original paper

Sebastian Rojek¹, Małgorzata Korczyńska-Albert², Joanna Kulikowska², Małgorzata Kłys¹

Współczesne wyzwania w toksykologii związane z nowymi substancjami psychoaktywnymi ilustrowane przypadkami zgonów po zażyciu UR-144 oraz UR-144 z pentedronem oznaczonych w próbkach krwi metodą LC-ESI-MS-MS

New challenges in toxicology of new psychoactive substances exemplified by fatal cases after UR-144 and UR-144 with pentedrone administration determined by LC-ESI-MS-MS in blood samples

¹Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie, Polska

²Katedra i Zakład Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Polska

¹Chair and Department of Forensic Medicine, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

²Chair and Department of Forensic Medicine and Forensic Toxicology, Medical University of Silesia, Katowice, Poland

Streszczenie

Temat niniejszej pracy wpisuje się w nurt badawczy dotyczący przypadków przyjmowania nowych substancji psychoaktywnych (NSP) z grupy syntetycznych kannabinoidów i katynonów, rozpatrywanych z różnych punktów widzenia, w tym w aspekcie klinicznym i medyczno-prawnym. Analiza obejmuje trzy przypadki śmiertelne, w których obecność UR-144 oraz UR-144 z pentedronem w organizmie ofiar, wykazana w toku badań pośmiertnych, zaważyła na tragicznych konsekwencjach, stając się pośrednią przyczyną zgonu. Ofiarami byli mężczyźni w wieku 16, 22 i 40 lat przyjmujący narkotyki, w tym palący marihuanę lub jej zamienniki w postaci syntetycznych kannabinoidów, którzy dodatkowo mieli problemy behawioralne. W wyniku zaburzenia równowagi emocjonalnej spowodowanej zażyciem UR-144 (w jednym przypadku) lub mieszaniny UR-144 i pentedronu (w dwóch przypadkach) w dwóch przypadkach doszło do zamachów samobójczych w postaci skoku z wysokości i powieszenia, a w jednym do przypadkowego zatrucia śmiertelnego pentedronem zażyty w celu wzmocnienia efektu działania wcześniej przyjętego UR-144.

Oznaczenie UR-144 i pentedronu w badanym materiale sekcyjnym przeprowadzono metodą chromatografii cieczowej sprzężoną z tandemową spektrometrią mas z jonizacją poprzez rozpylanie w polu elektrycznym (LC-ESI-MS-MS).

Wyniki badań toksykologicznych analizowano w kontekście możliwych efektów ubocznych obecności UR-144 oraz UR-144 z pentedronem w organizmie człowieka.

Słowa kluczowe: syntetyczne kannabinoidy, UR-144, pentedron, nowe substancje psychoaktywne (NSP), samobójstwa, LC-ESI-MS-MS.

Abstract

The topic of this paper relates to the study of cases involving the use of new psychoactive substances (NPS) from the classes of synthetic cannabinoids and cathinones, analyzed from multiple viewpoints including clinical and medico-legal perspectives. The paper investigates three fatal cases in which UR-144 and UR-144 with pentedrone identified in the bodies of victims during post-mortem examinations were responsible for the tragic consequences and proved to be the indirect cause of death. The victims were men aged 16, 22 and 40 years who used drugs, for example they smoked marijuana or its substitutes in the form of synthetic cannabinoids. In addition, all of them had behavioural problems. On account of emotional imbalance attributable probably to the presence of UR-144 (in one case) and a mixture of UR-144 and pentedrone (in the other two cases), two men committed suicide by jumping from a height and hanging, and one man had fatal accidental poisoning with pentedrone which was used to enhance the effect of previously used UR-144.

The presence of UR-144 and pentedrone in the post-mortem material was analyzed by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS-MS).

The results of toxicological tests were analyzed with a focus on possible side effects caused by the presence of UR-144 and UR-144 with pentedrone in the body.

Key words: synthetic cannabinoids, UR-144, pentedrone, new psychoactive substances (NPS), suicides, LC-ESI-MS-MS.

Wprowadzenie

Jak wynika z własnej praktyki eksperckiej ostatnich lat oraz dostępnych źródeł informacji [1–6], obecnie syntetyczne kannabinoidy są najszerszej stosowanymi nowymi substancjami psychoaktywnymi (NSP), zwanymi popularnie „dopalaczami”. Od początku 2012 r. nastąpił wyraźny wzrost popytu na susze roślinne zawierające syntetyczne kannabinoidy przy równoczesnym obniżeniu popytu na proszki, tabletki i kapsułki zawierające głównie syntetyczne katynony [4, 5]. Wielu badaczy tego tematu przewiduje jeszcze większe zainteresowanie syntetycznymi kannabinoidami, nie tylko z uwagi na spodziewany efekt biologiczny, lecz także ze względu na dostępność oraz możliwość uniknięcia konsekwencji prawnych wynikających z trudności w ich detekcji w materiale biologicznym oraz braku standaryzowanych testów przesiewowych [7]. Musshoff [8] zwraca uwagę na ten fakt w odniesieniu do ruchu drogowego, podkreślając brak możliwości detekcji NSP u kierowców prowadzących pojazdy, co stwarza warunki do unikania przez nich odpowiedzialności z tego tytułu.

Badanie dostępnych produktów w świetle ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii [9], w zakresie produkcji, posiadania i rozprowadzania narkotyków, wskazywało na syntetyczny kannabinoid UR-144, który był

Introduction

Based on own expert practice in recent years and the available literature [1–6], synthetic cannabinoids are currently the most commonly used new psychoactive substances (NPS) popularly referred to as “legal highs”. Since early 2012, there has been a sharp rise in demand for dried plant blends containing synthetic cannabinoids, with a concurrent decrease in demand for powders, tablets and capsules containing primarily synthetic cathinones [4, 5]. A number of specialists in the field anticipate an even greater interest in synthetic cannabinoids not only on account of their expected biological effects but also easy availability and possibility to avoid legal consequences because of difficulties with their detection in biological material and absence of standardized screening tests [7]. Musshoff [8] highlights this fact with respect to road traffic, pointing to NPS nondetectability in drivers, which makes it possible to evade liability for driving under the influence of these substances.

A study of available products in the light of the Polish Drug Abuse Prevention Act [9] with respect to the production, possession and distribution of drugs identified the synthetic cannabinoid

obecny w znacznym odsetku analizowanych produktów. W latach 2013–2014 aż 60% produktów badanych przez autorów niniejszej pracy zawierało UR-144 jako związek czynny w preparacie. Należy także dodać, że od 1 lipca 2015 r. syntetyczny kannabinoid UR-144 został objęty kontrolą prawną.

W tym samym czasie obok UR-144 na rynku narkotykowym popularność zdobył pentedron, środek należący do grupy syntetycznych katynonów. Podobnie jak UR-144 został on wprowadzony na listę substancji kontrolowanych. Jak wynika z analizy identyfikacyjnej preparatów „dopalaczy”, pentedron w latach 2012–2015 stanowił ich składnik w 33–59% [5].

Wraz z rozpowszechnieniem na rynku narkotykowym NSP pojawiają się przypadki, w których doszło do nieprzewidzianych dla użytkownika tragicznych konsekwencji ich stosowania. Przypadki te mogą być rozważane z różnych punktów widzenia, w tym w aspekcie klinicznym, psychiatrycznym, ale także w aspekcie konsekwencji rozpatrywanych przez wymiar sprawiedliwości. W ten nurt badawczy wpisuje się temat niniejszej pracy, poświęconej analizie trzech przypadków śmiertelnych, w których obecność UR-144 oraz UR-144 z pentedronem w organizmie ofiar, wykazana w toku badań pośmiertnych, zaważyła na tragicznych konsekwencjach, stając się pośrednią przyczyną zgonu. Zaburzenie równowagi psychicznej, najprawdopodobniej spowodowane obecnością narkotyku w organizmie, doprowadziło do zamachów samobójczych w dwóch przypadkach (skok z wysokości, powieszenie), a w jednym do zatrucia śmiertelnego pentedronem, pełniącym funkcję środka wzmacniającego efekt działania wcześniej zażytego UR-144. Wydaje się prawdopodobne, że wykazany we wszystkich trzech przypadkach UR-144 mógł być przyczyną negatywnych efektów dotyczących stanu psychicznego. Pentedron w drugim i trzecim przypadku mógł mieć działanie amfetaminopodobne, wynikające ze stymulacji ośrodkowego układu nerwowego. Konsekwencją tego działania jest wzmożona koncentracja, zwiększona aktywność psychoruchowa lub – jak w diskutowanych przypadkach – agresja skierowana przeciw otoczeniu.

Oznaczenie UR-144 w badanym materiale sekcyjnym przeprowadzono metodą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas z jonizacją poprzez rozpylanie w polu elektrycznym (LC-ESI-MS-MS). Wyniki badań toksykologicznych analizowano w kontekście możliwych efektów ubocznych działania na organizm człowieka nowych sub-

UR-144 as a compound that was present in a large proportion of all the products under analysis. In 2013–2014, as many as 60% of all products studied by authors of this paper contained UR-144 as the active ingredient. It should also be noted that the synthetic cannabinoid UR-144 was brought under legal control on 1 July 2015.

At the same time, in addition to UR-144, a growing popularity on the drugs market was noted for pentedrone, a synthetic cathinone. Similarly to UR-144, it was included in the list of controlled substances. As shown by the identification analysis of “legal high” formulations, pentedrone accounted for 33–59% of their content between 2012 and 2015 [5].

In parallel to the growing popularity of NSP on the drugs market, cases of tragic consequences, unforeseen by users, are reported. Such incidents can be studied from a variety of perspectives including clinical and psychiatric aspects, but also consequences which fall within the domain of the legal system. The present paper is consistent with this line of research, and investigates three fatal cases in which UR-144 and UR-144 with pentedrone detected in the bodies of victims during post-mortem examinations were responsible for the tragic consequences and proved to be the indirect cause of death. Mental imbalance resulting most likely from the use of drugs led to suicide in two cases (jumping from a height, hanging) and to fatal poisoning by pentedrone taken to enhance the effect of previously used UR-144 in one case. It is plausible to assume that UR-144, which was identified in all the three cases under study, could be responsible for the negative mental state of the victims. The presence of pentedrone in the second and third cases might have produced an amphetamine-like effect resulting from the stimulation of the central nervous system, the consequences of which include improved concentration capacity, increased psychomotor agitation or, as in the cases discussed here, outwardly directed aggression.

The analysis of UR-144 in the post-mortem material was conducted with the method of liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS-MS). The results of toxicological tests were discussed with a focus on the potential side effects on the human body

stancji o nie do końca poznanym profilu toksykologicznym.

Historia przypadków

Przypadek 1.

Szesnastolatek, uczeń szkoły średniej, palił marihuanę, a także zamienniki imitujące jej działanie. Rodzice nic nie wiedzieli o zażywaniu narkotyków przez syna. Krytycznego dnia, będąc na zabawie w gronie swoich rówieśników, chłopiec wraz z innymi kolegami palił „trawkę”. W trakcie kilkugodzinnej zabawy doszło jednak do niekontrolowanego zachowania młodzieży. Jak wynikało z późniejszych analiz, po wypaleniu papierosa z UR-144 u chłopca wystąpiły halucynacje i psychoza, czego efektem była utrata kontroli nad samym sobą i wyskoczenie przez okno z II piętra budynku. Akcja reanimacyjna okazała się nieskuteczna, po 4-godzinnej hospitalizacji stwierdzono zgon. W wyniku upadku chłopiec doznał skomplikowanych złamań kośćca (wielokrotne złamanie kości pokrywy i podstawy czaszki, złamanie kręgosłupa piersiowego, lędźwiowego, kości łonowej i kulszowej) oraz wielonarządowych uszkodzeń ciała. Za przyczynę śmierci przyjęto rozległe obrażenia ciała, które mogły powstać podczas upadku z wysokości. W czasie sekcji zwłok pobrano krew obwodową, którą poddano badaniom toksykologicznym.

Przypadek 2.

Mężczyzna, lat 22, miał problemy osobowościowe. Rodzice twierdzili, że wpadł w tzw. złe towarzystwo, związane ze środowiskiem osób uzależnionych od substancji psychoaktywnych. Ojciec twierdził, że syn zażywał narkotyki i pił alkohol. Jak wynika z zeznań świadków, jego świadomość zajmowały najprawdopodobniej wymyślone przez niego problemy rodzinne. Bliski kolega mężczyzny twierdził, że zmarły często mówił o samobójstwie. W dniu zdarzenia mężczyzna odwiedził swojego znajomego w ogródku działkowym. Świadek relacjonował, że mężczyzna zachowywał się dziwnie, miał dziwne oczy i ewidentne problemy z utrzymaniem równowagi psychicznej. Jego zachowanie eskalowało w kierunku agresji, najpierw wziął nóż leżący nieopodal i niebezpiecznie nim wymachiwał,

produced by new substances with an insufficiently studied toxicological profile.

Case histories

Case 1

The case involved a 16-year-old boy, a secondary school student. The boy smoked marijuana as well as marijuana substitutes imitating its effects. The parents did not know that their son used drugs. On the critical day, the boy met up with some friends of the same age and all of them smoked “dope”. During the get-together, which lasted for a few hours, the young people’s behaviour went out of control. The boy smoked a cigarette with UR-144 and, as established during the subsequent reconstruction of events, experienced hallucinations and psychosis. Consequently, he lost control of himself and jumped out of the window from the second floor of the building. The resuscitation effort was unsuccessful and after 4-hour hospitalization he was pronounced dead. During the fall, the boy sustained complex bone fractures (multiple fracture to the bones of the skull cap and base, fracture to the thoracic and lumbar spine, and pubic and ischial bones) and multi-organ injuries. The cause of death was given as extensive bodily injuries which could be attributed to the fall from height. During the post-mortem examination a sample of peripheral blood was taken for toxicological tests.

Case 2

A 22-year-old man had a personality disorder. The parents claimed that the man had fallen into “bad company” and had been around people addicted to psychoactive substances. The man’s father said that his son had used drugs and alcohol. According to witness statements, the man was preoccupied with family problems which, however, were probably imaginary. One of the man’s close friends said that the deceased had often talked about suicide. On the day of the incident, the man visited a friend in an allotment garden. The witness stated that the man’s behaviour at the time was bizarre. His eyes looked strange and he had problems with maintaining mental balance. His behaviour ultimately escalated to aggression. First, he grabbed a knife lying nearby and started waving it around. Then he took

a potem chwycił siekierę i dotkliwie poranił świadka, któremu udało się uciec i zawiadomić policję. Kiedy policjanci wkroczyli na działkę w poszukiwaniu mężczyzny, znaleźli go powieszono. Przyczyną śmierci, jak wynikało z przeprowadzonych badań pośmiertnych, było uduszenie wskutek powieszenia, innych obrażeń nie ujawniono. W czasie sekcji zwłok pobrano krew obwodową, którą poddano badaniom toksykologicznym.

Przypadek 3.

Mężczyzna, lat 40, bez obciążającego wywiadu chorobowego, stosował okazjonalnie różne substancje psychoaktywne. Był to człowiek z niestabilną psychiką, wchodzący wielokrotnie w konflikt z prawem, dla którego więzienie, jak sam mówił, było prawie domem. W dniu zdarzenia zachowywał agresywnie, był skrajnie pobudzony psychoruchowo. Wobec braku możliwości uspokojenia syna matka wezwała pogotowie ratunkowe. W czasie transportu do szpitala mężczyzna w dalszym ciągu był agresywny, dokonał zniszczeń w karetce pogotowia, pobił ratowników medycznych, w związku z czym wezwano policję, w której asyście został odwieziony do szpitala. Policja zabezpieczyła ponadto zabrane od niego „biały proszek”, który po przeprowadzeniu badań identyfikacyjnych okazał się pentedronem. Przy przyjęciu do szpitala mężczyzna był przytomny, w kontakcie logicznym, przyznał się do wypalenia „dopalacza” pod nazwą pomarańczowy płomień, który wprowadzony do kominka barwił płomień na pomarańczowo. W późniejszych badaniach substancję tę zidentyfikowano jako UR-144. Krwiaki i uszkodzenia ciała opisane przy przyjęciu do szpitala powstały w wyniku bójki, którą miał stoczyć, jak informował, dnia poprzedniego. Z powodu narastającego uszkodzenia nerek i wątroby pacjent był leczony objawowo. Klinicznie rozpoznano ostre toksyczne uszkodzenie wątroby, niewydolność nerek, rabdomiolizę, zespół rozsianego wykrzepiania śródnaczyniowego, krwotok do przewodu pokarmowego i krwiaki pourazowe. Wobec objawów nieodwracalnego zatrzymania krążenia stwierdzono zgon chorego. Za przyczynę śmierci uznano masywne uszkodzenia wielonarządowe spowodowane działaniem substancji toksycznych. W czasie sekcji zwłok pobrano krew obwodową do badań toksykologicznych.

hold of an axe and severely injured the witness who managed to run away and report the incident to the police. When police officers reached the allotment garden, searching for the man, they found him hanged. Post-mortem examinations revealed that the cause of death was asphyxia due to hanging. No other injuries were found. During the post-mortem examination a sample of peripheral blood was taken for toxicological tests.

Case 3

A 40-year-old man with unremarkable medical history occasionally used a variety of psychoactive substances. The man was mentally unstable and frequently had conflicts with the law. As he himself claimed, prison had become almost like a second home to him. On the day of the incident, the man behaved aggressively and was in a state of powerful psychomotor agitation. Unable to calm him down, the man's mother called the ambulance. While being transported to hospital, the man behaved aggressively. He caused damage to the interior of the ambulance and hit the paramedics. Consequently, the police were called and, escorted by police officers, the man was taken to hospital. The police also confiscated and secured "white powder" from the man. Based on subsequent identification tests, the powder was revealed to be pentedrone. On admission to hospital, the man was conscious and maintained normal verbal contact. He admitted to smoking a legal high called Orange Flame. Put into the fireplace, the product caused the flame to become orange. Based on later tests, the substance was identified as UR-144. As the patient stated, the haematomas and injuries noted on admission arose during a fight he was involved in on the preceding day. The patient received symptomatic treatment for progressive kidney and liver damage. The clinical diagnosis included acute toxic liver damage, kidney failure, rhabdomyolysis, disseminated intravascular coagulation, bleeding into the gastrointestinal tract and traumatic haematomas. In view of the symptoms of irreversible cardiac arrest the patient was pronounced dead. The cause of death was massive multi-organ failure due to the effect of toxic substances. During the post-mortem examination a sample of peripheral blood was taken for toxicological tests.

Material i metody

Material biologiczny

- Materiał biologiczny w postaci próbek krwi pobranej z żyły udowej w trakcie sekcji zwłok ofiar opisanych w przypadkach 1.–3. Próbkę do czasu wykonania badań toksykologicznych przechowywano w temperaturze -20°C .
- Materiał ślepy do opracowania i walidacji metody analitycznej stanowiły próbki krwi zakupione w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Krakowie oraz próbki krwi sekcyjnej pobrane w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej UJ CM w Krakowie, wolne od substancji psychoaktywnych.

Wzorce i odczynniki chemiczne

Roztwory wzorcowe UR-144 [(1-pentyl-1H-indol-3-yl)(2,2,3,3-tetramethylcyclopropyl) methanone] i pentedronu (1-fenyl-2-(methylamino)pentan-1-one) oraz JWH-073-D₉ (1-butyl-D₉-1H-indol-3-yl)(naphthalen-1-yl) methanone) i 4-methylmethcathinone-D₃ (4-MMC-D₃, 2-methylamino-1-(4-methyl-D₃-phenyl)propan-1-one) stosowanych jako wzorce wewnętrzne (IS) zakupiono w firmie LGC Standards (Łomianki, Polska).

Mrówczan amonu, kwas mrówkowy, kwas octowy, acetonitryl, metanol, octan etylu, n-heksan (czystości LC-MS) oraz węglan amonu, wodorowęglan sodu i chlorek sodu (czystości ACS) zakupiono w firmie Sigma-Aldrich (Poznań, Polska).

Przygotowano metanolowe roztwory kalibracyjne UR-144 w stężeniach odpowiednio 0,001, 0,01 i 0,1 ng/μl oraz metanolowe roztwory wzorca UR-144 do kontroli jakości (QC) w stężeniach odpowiednio 0,001, 0,01 i 0,1 ng/μl. Dodatkowo przygotowano metanolowy roztwór roboczy IS – JWH-073-D₉ o stężeniu 0,01 ng/μl.

Przygotowano metanolowe roztwory kalibracyjne pentedronu w stężeniach odpowiednio 0,1, 1 i 10 ng/μl oraz metanolowe roztwory QC wzorca pentedronu w stężeniach odpowiednio 0,1, 1 i 10 ng/μl. Dodatkowo przygotowano metanolowy roztwór roboczy IS – 4-MMC-D₃ o stężeniu 1 ng/μl. Wszystkie roztwory robocze były przechowywane w temperaturze -20°C .

Material and methods

Biological material

- Biological material in the form of blood samples taken from the femoral vein during the post-mortem examination in cases 1–3. The samples were stored at -20°C until the performance of toxicological tests.
- Blank material for the development and validation of the analytical method included blood samples purchased from the Regional Centre for Blood Donation and Blood Treatment in Cracow and post-mortem blood samples containing no psychoactive substances collected at the Chair and Department of Forensic Medicine, Jagiellonian University Medical College in Cracow.

Standards and chemical reagents

Standard solutions of UR-144 [(1-pentyl-1H-indol-3-yl)(2,2,3,3-tetramethylcyclopropyl) methanone] and pentedrone (1-phenyl-2-(methylamino)pentan-1-one), JWH-073-D₉ (1-butyl-D₉-1H-indol-3-yl)(naphthalen-1-yl) methanone) and 4-methylmethcathinone-D₃ (4-MMC-D₃, 2-methylamino-1-(4-methyl-D₃-phenyl)propan-1-one) used as internal standards (IS), were purchased from LGC Standards (Łomianki, Poland).

Ammonium formate, formic acid, acetic acid, acetonitrile, methanol, ethyl acetate, n-hexane (LC-MS grade), ammonium carbonate, sodium hydrogen carbonate and sodium chloride (ACS grade) were purchased from Sigma-Aldrich (Poznań, Poland).

Methanolic calibration solutions of UR-144 were prepared at concentrations of 0.001, 0.01 and 0.1 ng/μl, respectively, together with methanolic solutions of the UR-144 standard for quality control (QC) at concentrations of 0.001, 0.01 and 0.1 ng/μl, respectively. Additionally, a methanolic working solution of the IS (JWH-073-D₉) at a concentration of 0.01 ng/μl, was prepared.

Methanolic calibration solutions of pentedrone were prepared at concentrations of 0.1, 1 and 10 ng/μl, respectively, together with methanolic QC solutions of the pentedrone standard at concentrations of 0.1, 1 and 10 ng/μl, respectively. Additionally, a methanolic working solution of the IS (4-MMC-D₃) at

Kolumnienki Bond Elut wypełnione niepolarnym złożem żelu krzemionkowego modyfikowanego fazą oktadecylową C18 o masie 500 mg firmy Agilent.

Wstępne badania przesiewowe

Badania przesiewowe obejmowały analizę próbek krwi metodą immunoenzymosorpcyjną (ELISA) w kierunku obecności opiatów, kokainy, amfetamin, kannabinoli, leków z grupy benzodiazepin, barbituranów oraz trójcyklicznych antydepresantów i syntetycznych kannabinoidów (JWH-018, JWH-250, UR-144/XLR-11) przy użyciu testów firmy Neogen (Ayr, Scotland, UK). Ponadto próbki krwi analizowano w kierunku obecności środków farmakologicznych o charakterze zasadowym, obojętnym i kwasowym metodą HPLC-DAD w systemie MTSS (Merck Tox Screening System) opracowanej przez firmę Merck (Darmstadt, Germany).

Uzyskano pozytywny wynik testu na obecność syntetycznych kannabinoidów (UR-144/XLR-11) we wszystkich trzech analizowanych próbkach krwi.

Ekstrakcja

Syntetyczne kannabinoidy

Próbki krwi ślepej o objętości 0,2 ml (próbka kalibracyjna i QC) oraz badanej wzbogacano dodatkiem 50 µl roztworu roboczego JWH-073-D₉ do uzyskania końcowego stężenia 2,5 ng/ml. Następnie próbki buforowano 0,2 ml nasyconego roztworu wodorowęglanu sodu (pH 9), a następnie mieszano poprzez wytrząsanie. Do tak przygotowanych próbek dodawano 0,2 ml nasyconego roztworu chlorku sodu, a następnie ponownie je mieszano i ekstrahowano 3 ml mieszaniny n-heksanu z octanem etylu (99 : 1, v/v). Próbki mieszano przez 2 minuty i odwirowywano w wirówce przez 5 minut z szybkością 14 000 rpm. Po odwirowaniu próbek warstwę organiczną odpipetowywano, a następnie odparowywano w strumieniu azotu w temperaturze 40°C. Przed analizą ekstraktki rozpuszczano w 0,1 ml fazy ruchomej do HPLC.

Próbkę kalibracyjną o objętości 0,2 ml wzbogacano dodatkiem metanolowego roztworu roboczego wzorca UR-144 do uzyskania stężeń 0,05, 0,10, 0,25, 0,50, 2,5 i 5,0 ng/ml w celu sporządzenia krzywej kalibracyjnej.

a concentration of 1 ng/µl, was prepared. All working solutions were stored at -20°C.

Bond Elut columns filled with a non-polar bed of silica gel modified by C18 octadecyl phase, with a weight of 500 mg, from Agilent.

Preliminary screening examinations

Screening examinations comprised testing of blood samples by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) to detect opiates, cocaine, amphetamines, cannabinoids, benzodiazepines, barbiturates, tricyclic antidepressants and synthetic cannabinoids (JWH-018, JWH-250, UR-144/XLR-11) based on assays marketed by Neogen (Ayr, Scotland, UK). Furthermore, the blood samples were tested for the presence of basic, neutral and acidic pharmacological agents by HPLC-DAD using MTSS (Merck Tox Screening System) developed by Merck (Darmstadt, Germany).

All the three blood sample tests turned out positive for synthetic cannabinoids (UR-144/XLR-11).

Extraction

Synthetic cannabinoids

0.2 ml portions of the blank blood sample (calibration and QC sample) and test sample were enriched through the addition of 50 µl of the JWH-073-D₉ working solution, so that the final concentration of 2.5 ng/ml was obtained. The samples were buffered with 0.2 ml of a saturated solution of sodium hydrogen carbonate (pH 9) and then mixed by shaking. In the next step, 0.2 ml portions of a saturated sodium chloride solution were added to the samples thus prepared, after which the samples were stirred again and extracted with 3 ml of n-hexane/ethyl acetate mixture (99 : 1, v/v). The samples were stirred for 2 minutes and spun in a centrifuge at 14,000 rpm for 5 minutes. After the centrifugation of samples the organic layer was pipetted off and then evaporated in nitrogen stream at 40°C. The extracts were dissolved in 0.1 ml of HPLC mobile phase before analysis.

0.2 ml portions of the calibration sample were enriched through the addition of a methanolic working solution of the UR-144 standard to achieve the concentrations of 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 2.5 and 5.0 ng/ml in order to plot a calibration curve.

Próbkę QC o objętości 0,2 ml wzbogacano dodatkiem metanolowego roztworu roboczego wzorca UR-144 do uzyskania stężeń 0,075, 0,75 i 2,25 ng/ml w celu wyznaczenia precyzji i dokładności metody analitycznej.

Syntetyczne katynony

Próbkę krwi ślepej o objętości 1 ml (próbka kalibracyjna i QC), jak również próbkę badaną wzbogacano dodatkiem 100 µl metanolowego roztworu wzorca wewnętrznego 4-MMC-D₃ do uzyskania końcowego stężenia 100 ng/ml. Następnie do próbek dodawano 5 ml buforu węglanowo-amonowego o pH 9,3. Tak przygotowane próbki mieszano poprzez wytrząsanie, odwirowywano przez 15 minut z szybkością 4500 rpm. Supernatant przenoszono na skondycjonowane za pomocą 1 ml metanolu, 1 ml wody i 1 ml buforu węglanowo-amonowego (pH 9,3) kolumnienki SPE. Supernatant przepuszczano przez złożę, a następnie przemywano dwiema porcjami buforu węglanowo-amonowego (pH 9,3) o objętości 1 ml. Złożę suszono przez 30 minut pod zmniejszonym ciśnieniem, po czym elucji dokonywano 2 porcjami metanolu o objętości 1 ml, zakwaszonego 1 M roztworem kwasu octowego w stosunku 9 : 1 (v/v). Ekstrakty odparowywano do sucha przy użyciu koncentratora próżniowego. Suchą pozostałość rozpuszczano w 0,1 ml fazy ruchomej do HPLC.

Próbkę kalibracyjną o objętości 1 ml wzbogacano dodatkiem metanolowego roztworu roboczego wzorca pentedronu do uzyskania stężeń 10, 50, 100, 200, 500 i 1000 ng/ml w celu sporządzenia krzywej kalibracyjnej.

Próbkę QC o objętości 1 ml wzbogacano dodatkiem metanolowego roztworu roboczego wzorca pentedronu do uzyskania stężeń 15, 75 i 750 ng/ml w celu wyznaczenia precyzji i dokładności metody analitycznej.

Rozdzielenie chromatograficzne

Zastosowano chromatograf cieczowy, model 1200 firmy Agilent (Santa Clara, CA, USA), wyposażony w pompę binarną model G1312 A i autosampler, model G1329 A. Rozdzielenie chromatograficzne analizowanych związków prowadzono w kolumnie Poroshell 120 C18 (100 mm × 3 mm,

0.2 ml portions of the QC sample were enriched through the addition of a methanolic working solution of the UR-144 standard to achieve the concentrations of 0.075, 0.75 and 2.25 ng/ml for the purpose of determining the precision and accuracy of the analytical method.

Synthetic cathinones

1 ml portions of the blank blood sample (calibration and QC sample) and test sample were enriched through the addition of 100 µl of a methanolic solution of the 4-MMC-D₃ internal standard to achieve the final concentration of 100 ng/ml. Next, 5 ml portions of the ammonium carbonate buffer (pH 9.3) were placed in the test tubes. The samples thus prepared were mixed by shaking and centrifuged at 4500 rpm for 15 minutes. The supernatant was transferred to SPE columns conditioned with 1 ml of methanol, 1 ml of water and 1 ml of ammonium carbonate buffer (pH 9.3). The supernatant was passed through the bed and then washed with two 1 ml portions of ammonium carbonate buffer (pH 9.3). The bed was dried for 30 minutes under reduced pressure, after which elution was performed with two 1 ml portions of methanol acidified with 1 M solution of acetic acid at a ratio of 9 : 1 (v/v). The extracts were evaporated to dryness using a vacuum concentrator. The dry residue was dissolved in 0.1 ml of HPLC mobile phase.

1 ml portions of the calibration sample were enriched through the addition of a methanolic working solution of the pentedrone standard to achieve the concentrations of 10, 50, 100, 200, 500 and 1,000 ng/ml in order to plot a calibration curve.

1 ml portions of the QC sample were enriched through the addition of a methanolic working solution of the pentedrone standard to achieve the concentrations of 15, 75 and 750 ng/ml for the purpose of determining the precision and accuracy of the analytical method.

Chromatographic separation

Agilent 1200 series liquid chromatograph (Santa Clara, CA, USA), equipped with G1312 A binary pump and G1329 A autosampler, was employed. Chromatographic separation of the compounds under analysis was conducted in Poroshell 120 C18

2,7 μm) firmy Agilent. Faza [A] składająca się z mieszaniny 0,2-procentowego kwasu mrówkowego i 2 mM mrówczanu amonu w wodzie i [B] składająca się z 0,2-procentowego kwasu mrówkowego i 2 mM mrówczanu amonu w acetonitrylu przepływały przez kolumnę chromatograficzną w układzie gradientowym (95% [A] i 5% [B] przy natężeniu przepływu 0,5 ml/min, następnie liniowo zmieniał się na 10% [A] i 90% [B] przy natężeniu przepływu 1 ml/min w 10. minucie). Objętość nastrzyku – 10 μl .

Detekcja

Zastosowano tandemowy spektrometr mas (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) wyposażony w źródło do jonizacji poprzez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI). Parametry źródła ESI: temperatura odparownika 350°C, ciśnienie gazu nebulizującego 40 psi, natężenie przepływu gazu suszącego 9 l/min; napięcie na kapilarze 3,5 kV. W tabeli I zestawiono parametry fizykochemiczne analizy UR-144 i pentedronu oraz IS – JWH-073-D₉ i 4-MMC-D₃.

Walidacja metody

Parametry walidacyjne metod analitycznych oznaczania syntetycznych kannabinoidów i katynonów w próbkach krwi spełniały ogólne wytycz-

(100 mm \times 3 mm, 2,7 μm) column from Agilent. Phase [A], containing a mixture of 0.2% formic acid and 2 mM ammonium formate in water, and phase [B] consisting of 0.2% formic acid and 2 mM ammonium formate in acetonitrile, flowed through a chromatography column in the gradient mode (95% [A] and 5% [B] at a flow rate of 0.5 ml/min, which then changed in a linear manner to 10% [A] and 90% [B] at a flow rate of 1 ml/min in the 10th minute). The sample injection volume was 10 μl .

Detect

Tandem mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled with electrospray ionization (ESI) source was applied. ESI source parameters: evaporator temperature 350°C; nebulizing gas pressure 40 psi; drying gas flow rate 9 l/min; capillary voltage 3.5 kV. Table I lists the physicochemical parameters of the test performed for UR-144 and pentedrone, and the IS – JWH-073-D₉ and 4-MMC-D₃.

Validation of the method

The validation parameters of the analytical methods used for the detection of synthetic cannabinoids and cathinones in blood samples met the general

Tabela I. Parametry fizykochemiczne analizy UR-144, pentedronu i wzorców wewnętrznych metodą LC-ESI-MS-MS

Table I. Physicochemical parameters of the LC-ESI-MS-MS analysis of UR-144, pentedrone and internal standards

Analit/IS Analyte/IS	RT (min.) ^a	[M+H] ^{+b}	Fragmentor [V]	Produkt Product	CID ^c [V]
UR-144	10,8	312,3	117	214,2 125,1	25 21
Pentedron Pentedrone	4,7	192,2	65	174,2 131,1	9 25
JWH-073-D ₉	9,3	337,3	94	155,1 127,1	26 45
4-MMC-D ₃	4,4	181,1	50	163,1 91	9 41

^a czas retencji

^b jon pseudomolekularny

^c dysocjacyjna energia zderzeniowa

^a retention time

^b pseudo-molecular ion

^c collision-induced dissociation energy

Tabela II. Parametry walidacyjne metody LC-ESI-MS-MS
Table II. Validation parameters for the LC-ESI-MS-MS method

Analityt Analyte (ng/ml)	LOQ ^a (ng/ml)	Liniowość ^b Linearity ^b (ng/ml)	R ^c (n = 3)	Precyzja Precision % R.S.D.	Dokładność Accuracy (%)
UR-144	0,05	0,05–5	0,996		
0,075				18,9	85
0,75				12,1	110
2,25				5,5	100
Pentadron Pentadrone	10	10–1000	0,995		
15				11,1	89
75				9,5	115
750				4,7	108

^a granica oznaczalności metody

^b liniowość

^c współczynnik korelacji

^a method quantification limit

^b linearity

^c correlation coefficient

Tabela III. Wyniki analizy toksykologicznej
Table III. Results of toxicology analysis

Numer przypadku Case number	Stężenie ksenobiotyku w próbce krwi (ng/ml) Concentration of xenobiotic in the blood sample (ng/ml)
1	UR-144 – 2,1
2	UR-144 – 1,4 Pentadron/Pentadrone – 2300
3	UR-144 – 4 Pentadron/Pentadrone – 290

ne normy laboratoryjnej ISO/IEC 17025 dla metod analitycznych i zostały szczegółowo przedstawione we wcześniejszych pracach autorów [10–12].

Wyniki

Wyniki walidacji metod analitycznych zamieszczono w tabeli II. Wyniki badań toksykologicznych zaprezentowano w tabeli III. We wszystkich trzech przypadkach ujawniono obecność syntetycznego kannabinoidu UR-144 w stężeniach spotykanych u użytkowników tego kannabinoidu. W 2. i 3. przypadku ujawniono także drugi NSP – pentadron z grupy syntetycznych katynonów.

Na rycinie 1. przedstawiono chromatogramy MRM uzyskane w trakcie analizy próbki krwi śle-

guidelines included in the laboratory standard ISO/IEC 17025 for analytical methods and have been presented in detail in the authors' previous publications [10–12].

Results

The results of validation tests performed for the analytical methods are included in Table II. The results of toxicological tests are listed in Table III. All the three cases revealed the presence of the synthetic cannabinoid UR-144 at concentrations that are routinely detected in users of this cannabinoid. In the second and third cases, another NPS was also detected and identified as pentadron belonging to the class of synthetic cathinones.

pej wzbogaconej dodatkiem IS – JWH-073-D₉ do stężenia 2,5 ng/ml. Na rycinie 2. zaprezentowano chromatogramy MRM uzyskane w trakcie analizy próbki krwi ślepej wzbogaconej dodatkiem wzorca UR-144 i IS – JWH-073-D₉ do stężeń, odpowiednio, 5 ng/ml i 2,5 ng/ml. Na rycinie 3. znajdują się chromatogramy MRM uzyskane w trakcie analizy próbki krwi po przyjęciu dopłucnym „mieszanki ziołowej” zawierającej UR-144 (przypadek 1.).

Dyskusja

Struktura chemiczna UR-144 jest charakterystyczna dla substancji chemicznych o podstawowym szkielecie indolu (ryc. 4). Badania na zwierzętach wykazują podobieństwo działania tej substancji do JWH-018 i THC. Nie ma jednakże danych mówiących o bezpiecznym stosowaniu UR-144 przez ludzi. Informacje dotyczące wpływu tego związku na organizm ludzki ograniczają się w zasadzie do forum internetowego [13].

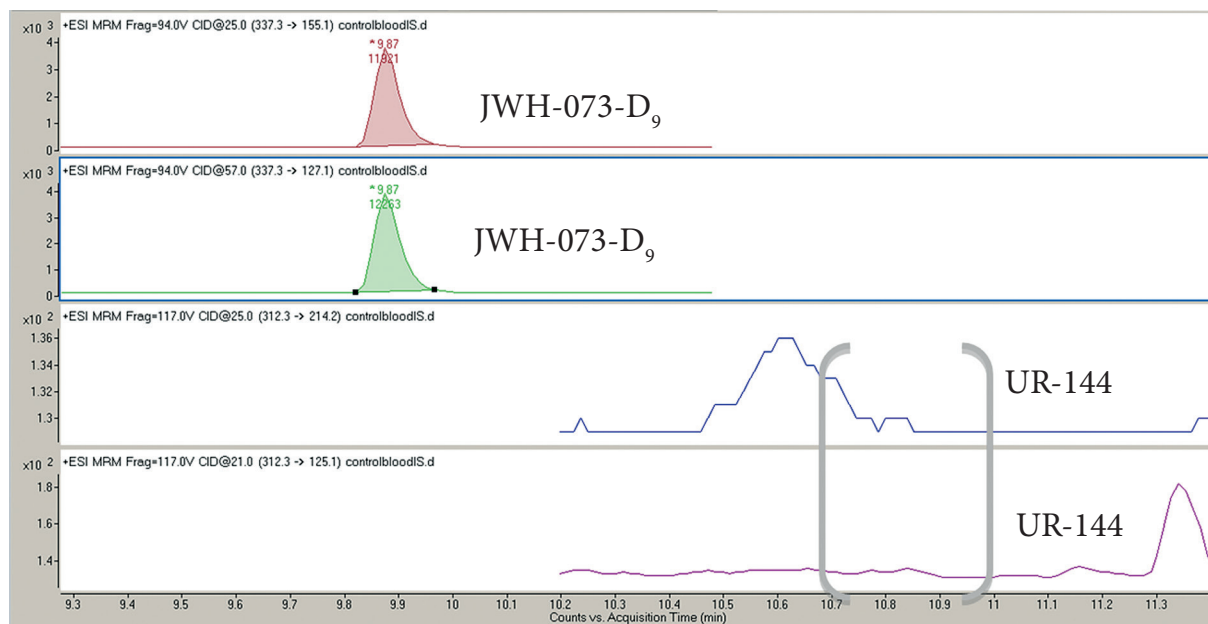
W badaniach *in vitro* wykazano, że UR-144 wiąże receptory w mózgu, wykazując wysokie powinowactwo do receptora CB₂ i niższe do CB₁ [14].

Figure 1 shows MRM chromatograms obtained in the analysis of a blank sample of blood enriched by adding the IS – JWH-073-D₉ to the concentration of 2.5 ng/ml. Figure 2 shows MRM chromatograms obtained in the analysis of a blank sample of blood enriched by adding the UR-144 standard and the IS – JWH-073-D₉, to the concentrations of 5 ng/ml and 2.5 ng/ml, respectively. Figure 3 shows MRM chromatograms obtained in the analysis of a sample of blood after the inhalatory intake of the “herbal blend” containing UR-144 (Case 1).

Discussion

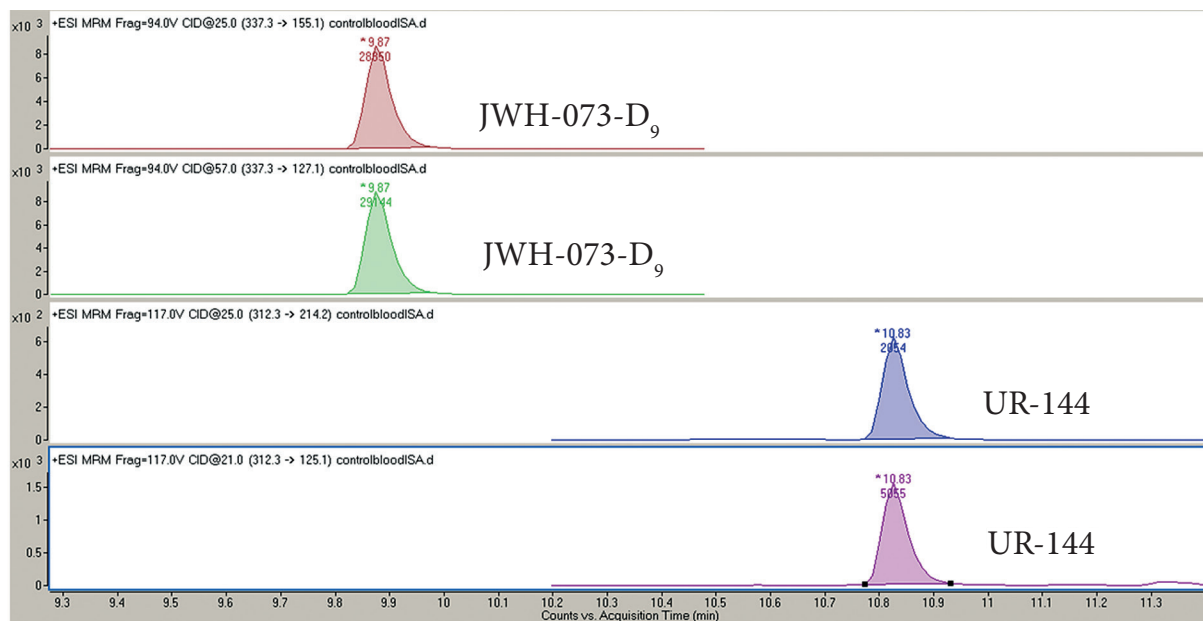
The chemical structure of UR-144 is typical of chemical substances with basic indole skeleton (Fig. 4). Animal studies point to the similarity of its effects to JWH-018 and THC. However, there are no reports on the safety of UR-144 use by humans. Data on the effects of the compound on the human body are essentially limited to information posted on Internet forums [13].

In vitro studies have shown that UR-144 binds to receptors in the brain, exhibiting high affinity to the CB₂ receptor and lower affinity to the CB₁ receptor [14].



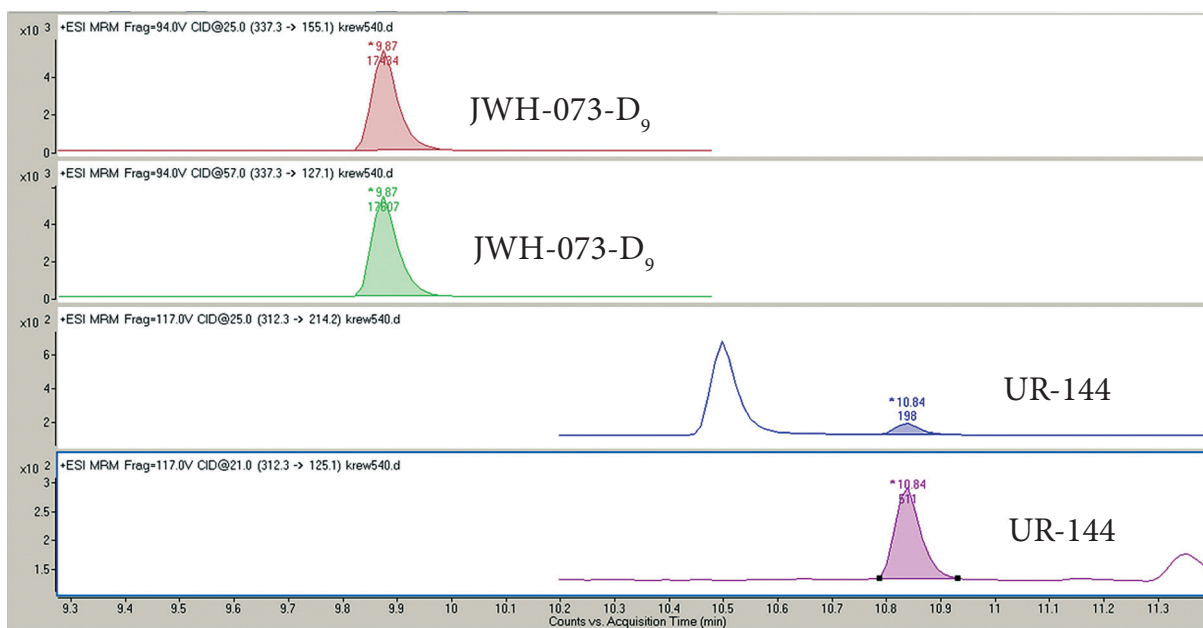
Ryc. 1. Chromatogramy MRM uzyskane w trakcie analizy próbki krwi ślepej wzbogaconej dodatkiem IS – JWH-073-D₉ do stężenia 2,5 ng/ml

Fig. 1. MRM chromatograms obtained during analysis of a blind blood sample enriched with IS-JWH-073-D₉ to 2.5 ng/ml



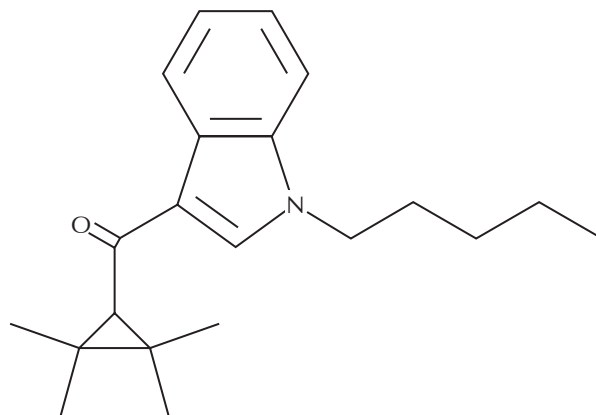
Ryc. 2. Chromatogramy MRM uzyskane w trakcie analizy próbki krwi ślepej wzbogaconej dodatkiem wzorca UR-144 i IS – JWH-073-D₉ do stężeń, odpowiednio, 5 ng/ml i 2,5 ng/ml

Fig. 2. MRM chromatograms obtained during analysis of blank blood sample supplemented with UR-144 and IS-JWH-073-D₉ standard for concentrations of 5 ng/ml and 2.5 ng/ml, respectively



Ryc. 3. Chromatogramy MRM uzyskane w trakcie analizy próbki krwi po przyjęciu dołtucnym „mieszanki ziołowej” zawierającej UR-144 w przypadku 1.

Fig. 3. MRM chromatograms obtained during analysis of blood sample after pulmonary intake of “herbal mixture” containing UR-144 in case report 1



Ryc. 4. Struktura chemiczna UR-144
Fig. 4. Chemical structure UR-144

Z nielicznych prac eksperymentalnych [15–17] wynika, że metabolizm UR-144 przebiega poprzez hydroksylację i dalsze sprzężanie z kwasem glukuronowym i siarkowym, inne drogi metaboliczne obejmują m.in. dehydratację, hydroksylację, dealkilację, karboksylację. Grigoryev i wsp. [16] określili w toku swoich badań w moczu pacjentów z podejrzeniem zatrucia UR-144 ponad 16 metabolitów oraz 21 produktów pyrolizy. Dane z piśmiennictwa wskazują, że syntetyczne kannabinoidy podlegają intensywnym procesom metabolicznym, macierzyste substancje rzadko są identyfikowane we krwi, ślinie, włosach czy moczu lub ich stężenia są niskie. Wiąże się to również ze słabą rozpuszczalnością w wodzie kannabinooidów, ich łatwą absorpcją przez błony lipidowe i szybką eliminacją z krwi krążącej. Z powodu spodziewanych małych stężeń w materiale biologicznym zarówno formy podstawowej, jak i metabolitów, detekcja tych związków w matrycy biologicznej może być trudna, zwłaszcza że ich metabolitów jeszcze wystarczająco nie zbadano i nie opisano [12].

Typowe dawki UR-144 stosowane przez użytkowników są określone w przedziale 2,5–20 mg (zawartość w preparatach rzędu 0,05–0,4%). Efekty zaczynają się już po 0,5–5 minutach od wypalenia i trwają do 1–2 godzin. Po dużych dawkach efekt może utrzymywać się nawet do 4 godzin. Podobieństwo w mechanizmie działania poszczególnych syntetycznych kannabinooidów sprawia, że istnieje również podobieństwo w efektach działania między UR-144 a JWH-122 i AM-2201 czy marihuaną. Obejmują one takie od-

Scarce experimental studies [15–17] demonstrate that UR-144 is metabolized by hydroxylation and further conjugation with glucuronic and sulphuric acids. Other metabolic routes include dehydration, hydroxylation, dealkylation and carboxylation. Grigoryev *et al.* [16] detected over 16 metabolites and 21 pyrolysis products in the urine of patients suspected of UR-144 poisoning. The literature data indicate that synthetic cannabinoids are intensively metabolized, and parent substances are rarely detectable in the blood, saliva, hair or urine, or their identified concentrations are low. This is also associated with the fact that cannabinoids are poorly dissolved in water, easily absorbed through lipid membranes and rapidly eliminated from circulating blood. In view of the expected low concentrations of the parent form and metabolites in biological material, the detection of these compounds in the biological matrix can be problematic, especially because of the fact that their metabolites have not been sufficiently studied and described yet [12].

Typical doses of UR-144 taken by users vary from 2.5 to 20 mg (the content in products being 0.05–0.4%). The onset of activity occurs already 0.5–5 minutes after smoking and the effects last for 1–2 hours. At high doses, the effect may persist for up to 4 hours. On account of the fact that different synthetic cannabinoids share a similar mechanism of action, the effects produced by UR-144, JWH-122 and AM-2201 or marijuana are also similar. They include sensations such as euphoria, mood eleva-

czucia, jak euforia, podniesienie nastroju, podniecenie, relaks, wesołość, zwiększony apetyt, a następnie senność i halucynacje. Mogą wystąpić także efekty uboczne – niepokój, zaburzenia równowagi, odczucia paranoiczne, depresja, halucynacje, które niekiedy utrzymują się nawet kilka dni [14, 17–19].

Kronstrand [18] uważa, że efekty uboczne występujące po paleniu marihuany są z reguły łagodne, natomiast efekty uboczne po paleniu syntetycznych kannabinoidów pojawiają się często i obejmują wzrost ciśnienia krwi, niepokój, podniecenie, halucynacje, psychozy, ataki paniki, a nawet utratę przytomności. U osób z niestabilną psychiką może dojść do komplikacji psychiatrycznych. Powodem może być to, że wiele syntetycznych kannabinoidów ma działanie agonistyczne wobec receptorów kannabinoidowych i aktywuje je z większym potencjałem niż Δ^9 -THC. UR-144 jest selektywnym, pełnym agonistą receptorów kannabinoidowych CB₂.

W piśmiennictwie jest kilka opisów przypadków raportowanych jako zatrucia, także UR-144 [17–20].

Trzeba podkreślić, że syntetyczne kannabinoidy, które mają większą potencję i efektywność działania w porównaniu z Δ^9 -THC, w pewnym stopniu mogą przyczynić się pośrednio nawet do zgonów [21, 22].

W niniejszej pracy poruszono problem zgonów po zażyciu UR-144. Chociaż trudno jest ocenić, w jakim stopniu konsumpcja UR-144 przyczyniła się do śmierci w prezentowanych przypadkach, to z pewnością nie można negować ich znacznego udziału. Dłuższe zażywanie tego typu syntetyków może bowiem prowadzić do nieprzewidywalnych skutków, takich jak brak kontroli nad emocjami. Ponadto w przypadkach o ciężkim przebiegu klinicznym powodowanym przez syntetyczne kannabinoidy można mówić o efekcie abstynencyjnym w uzależnieniu od tego typu narkotyków [23]. Pod względem farmakologicznym i toksykologicznym UR-144 jest słabo poznany, jednak pewne informacje wskazują, że zażycie UR-144 może się wiązać z wystąpieniem różnego rodzaju zaburzeń psychicznych, często w postaci stanów lękowych, dysforycznych, depresyjnych, psychotycznych czy omamów, podczas których, jak wynika z wyżej cytowanych prac [17–19], istnieje ryzyko targnięcia się na własne życie.

Potwierdzeniem tej tezy może być analiza trzech przypadków prezentowanych w niniejszej pracy. Wszyscy trzej młodzi mężczyźni eksperymentowali z różnego typu „dopalaczami”, w ostatnim czasie

tion, agitation, relaxation, joy and increased appetite, followed by drowsiness and hallucinations. Side effects are also possible, such as restlessness, balance disorders, feelings of paranoia, depression and hallucinations which may be observed up to several days after exposure [14, 17–19].

Kronstrand [18] reports that side effects from smoking marijuana are usually mild in users, however side effects associated with the smoking of synthetic cannabinoids are common and include elevated blood pressure, restlessness, agitation, hallucinations, psychosis, panic attacks and, finally, loss of consciousness. Individuals with unstable mental health may develop psychiatric complications. This may be due to the fact that a considerable number of synthetic cannabinoids act as cannabinoid receptor agonists and activate them with a greater potential than Δ^9 -THC. UR-144 is a selective full agonist of the cannabinoid receptors CB₂.

A few cases, also involving UR-144, have been reported in the literature as poisoning [17–20].

It is also important to note that synthetic cannabinoids, which are more potent and effective than Δ^9 -THC, can indirectly contribute to some extent to fatal outcomes [21, 22].

The problem is addressed in this study which analyzes deaths occurring after the intake of UR-144. Although it is difficult to precisely assess the degree to which the intake of UR-144 contributed to the fatal outcome noted in the reported cases, its marked effect cannot be denied. Prolonged use of synthetic substances of this type is known to lead to unpredictable behaviours such as the loss of emotional control. Furthermore, cases with a severe clinical course caused by synthetic cannabinoids may involve a withdrawal syndrome associated with addiction to drugs of this type [23]. Although UR-144 is poorly understood in pharmacological and toxicological aspects, there are data suggesting that the intake of UR-144 may be linked to the development of a wide spectrum of mental disorders, often manifesting as anxiety, dysphoria, depression, psychosis or hallucinations. As shown in the studies cited above [17–19], a person affected by such symptoms may be involved in fatal suicide attempts.

The proof for the claim is the analysis of the three cases included in this study. All the three young men experimented with “legal highs” of various kinds – with UR-144 at about the time of the accidents. The

z UR-144. Analiza materiału skłania do twierdzenia, że obecność UR-144 w stężeniach odpowiednio 2,1, 1,4 i 4 ng/ml we krwi mogła wpłynąć na zachwianie równowagi emocjonalnej i psychicznej, co doprowadziło do zamachów samobójczych (przez skok z wysokości w przypadku 1. i powieszenie w przypadku 2.) oraz niepohamowanej chęci wzmocnienia efektu w przypadku 3. W doniesieniach cytowanych wyżej [17–20] wykazano obecność UR-144 w szerokim zakresie stężeń 0,05–25,9 ng/ml. Wyznaczone w niniejszej pracy stężenia UR-144 w analizowanych trzech przypadkach mieściły się w podobnym zakresie.

Jak wynika z dostępnych informacji i własnej praktyki medyczno-prawnej, palenie marihuany niesie ze sobą chęć wzmocnienia efektu, co powoduje sięgnięcie po coś „mocniejszego” – najczęściej jest to inny narkotyk [24–26]. Można przypuszczać, że syntetyczne kannabinoidy typu UR-144 także mogą powodować podobne reakcje. Ten problem ilustrują przypadki 2. i 3. Mężczyźni sięgnęli po pentedron – narkotyk z grupy katynonów, gdyż wypalenie UR-144, jak wynikało z wywiadu, najprawdopodobniej okazało się niewystarczające z punktu widzenia oczekiwanego efektu. Pentedron, przyjmowany najczęściej w postaci proszku drogą doustną lub donosowo, podobnie jak inne katynony, takie jak mefedron, 4-MEC, butylon czy metkatynon, charakteryzuje się działaniem stymulującym, entaktogennym i euforyzującym. Powoduje pobudzenie, wzrost samooceny, wzrost motywacji do działania, empatię, chęć kontaktu z ludźmi. Zażycie pentedronu, zwłaszcza w dużych dawkach, może jednak wiązać się z wystąpieniem działania kardiotoksycznego i nefrotoksycznego, co może stwarzać niebezpieczeństwo dla zdrowia, a w szczególnych przypadkach prowadzić do zgonu [27].

W 3. opisywanym przypadku, jak wynika z analizy skutków klinicznych udokumentowanych w karcie pacjenta, można rozważyć dwustopniowy przebieg choroby. Skrajne pobudzenia psychoruchowe i atak agresji, który wystąpił na początku choroby, można wiązać z wypaleniem pomarańczowego płomienia zawierającego UR-144. Dalszy etap choroby, obejmujący postępujące masywne uszkodzenia narządowe połączone z zespołem rozsianego wykrzepiania śródnaczyniowego oraz z krwotokiem do przewodu pokarmowego, był spowodowany najprawdopodobniej zażyciem drugiego rodzaju NSP – pentedronu z grupy syntetycznych katynonów, co spowodowało zgon mężczyzny. Obraz kliniczny uzyskany w toku obser-

analysis of the study material in cases 1–3 warrants the conclusion that the presence of UR-144 at blood concentrations of 2.1, 1.4 and 4 ng/ml, respectively, could have contributed to emotional and mental imbalance, ultimately leading to suicide (by jumping from a height in the case 1 and hanging in the case 2) and the irrepressible desire to enhance the stimulating effect in the case 3. In the reports cited above [17–20], the presence of UR-144 was demonstrated in a broad range of concentrations from 0.05 to 25.9 ng/ml. In the three cases examined in the present study the concentrations of UR-144 were within a similar range.

Available data and the authors' own medico-legal practice show that smoking marijuana is associated with the desire to enhance the effect of the substance, prompting the user to try something "stronger", usually another drug [24–26]. It can be presumed that synthetic cannabinoids such as UR-144 may provoke similar reactions. The problem is illustrated by cases 2 and 3. The men reached for pentedrone – a drug of the cathinone class – since, based on collected information, smoking UR-144 most likely failed to produce the expected effect. Pentedrone, which is most commonly used in the form of powder either orally or intranasally, similarly to other cathinones such as mephedrone, 4-MEC, butylone or methcathinone, is characterized by stimulatory, entactogenic and euphoric effects. It causes agitation, boosts self-esteem and the motivation to act, enhances empathy and stimulates interactions with people. However, pentedrone, especially when used at high doses, may also induce cardio- and nephrotoxic effects with a potential dangerous impact on health and, in some cases, even fatal outcomes [27].

In the third case discussed, a two-stage progression of the patient's disease may be considered, as shown by the analysis of clinical effects documented in the patient's medical records. Extreme psychomotor agitation and an attack of aggression which occurred at the beginning of the disorder can be linked to the smoking of Orange Flame containing UR-144. The next stage of the disease, involving progressive massive organ failure along with disseminated intravascular coagulation syndrome and bleeding into the gastrointestinal tract, was most probably caused by using the other NSP type – pentedrone from the class of synthetic cathinones – which led to the man's death. The clinical findings noted during the patient's clinical

wacji klinicznej pacjenta wykazuje podobieństwo do objawów opisywanych w piśmiennictwie w zatruciach pentedronem [27]. Nie można jednak kategorycznie wykluczyć skojarzonego wpływu obydwu związków na przebieg zatrucia.

Analizując materiał badawczy, można przyjąć hipotetycznie, że efekt behawioralny w postaci zaburzeń psychotycznych widocznych we wszystkich trzech przypadkach można by przypisać działaniu UR-144. Dodatkowe zażycie pentedronu przez ofiary w 2. i 3. przypadku mogło wpłynąć na skojarzone działanie przejawiające się podniesieniem progu agresji, co nastąpiło w tych przypadkach, jak wynika z ich opisu. Niepodważalny jest jednak fakt, że interpretacja efektów działania środków psychoaktywnych w przypadkach ich skojarzonego zażywania wiąże się z dużą niepewnością. Częstkowe obserwacje mogą się przyczynić do lepszego rozumienia działania NSP na organizm ludzki. Badania nowych substancji psychoaktywnych są częścią walki z producentami i dilerami narkotyków, która może trwać jeszcze długo, a klinicyści i eksperci muszą być ciągle przygotowani na nowe wyzwania [28]. Problemy związane z NSP, przed którymi stoi współczesna toksykologia sądowa, dotyczą wykorzystania nowoczesnych technologii instrumentalnych do opracowania i ciągłego doskonalenia metod analitycznych pozwalających na ich skuteczne oznaczenie w materiale biologicznym, jak również dokumentowania efektów działania tych substancji na organizm ludzki. Z uwagi na ograniczony zakres wiedzy na temat toksyczności syntetycznych kannabinoidów i katinonów oraz efektów klinicznych i behawioralnych ich działania na organizm ludzki duże znaczenie mają opisy przypadków związanych z zażywaniem nowych substancji psychoaktywnych.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

follow-up are similar to the symptoms of pentedrone poisoning described in the literature [27]. However, the combined effect of both compounds on the progression of poisoning cannot be ruled out outright.

Based on the study material, it can be hypothesized that the behavioural effect manifesting as psychotic disorders, which was observed in the three study cases, may be attributed to UR-144. The victims in the second and third cases also used pentedrone which might have produced a combined effect. Judging by the course of events, it was manifested as an increased tendency for aggression. However, it is incontestable that the interpretation of effects induced by psychoactive agents used in combination carries considerable uncertainty. Such partial observations, though, may still be important for improving the understanding of how NPS affect the human body. Although studies of new psychoactive substances resemble the proverbial “tilting at windmills” in the fight with drug makers and dealers, which may continue for a long time to come, clinicians and experts must be prepared to constantly face new challenges [28]. The range of problems confronted by contemporary forensic toxicology with respect to NSP comprises the application of advanced instrumental technologies for the development and ongoing refinement of analytical methods which make it possible to effectively detect NPS in biological material and document the effects of these substances on the human body. In view of the limited knowledge of the toxicity and clinical and behavioural effects produced by synthetic cannabinoids and cathinones on the human body, a great importance is attached to case reports on the use of new psychoactive substances.

The authors declare no conflict of interest.

Piśmiennictwo References

1. Favretto D, Pascali JP, Tagliaro F. New challenges and innovation in forensic toxicology: Focus on the „New Psychoactive Substances”. *J Chromatogr A* 2013; 1287: 84-95.
2. Harris CR, Brown A. Synthetic cannabinoid intoxication: a case series and review. *J Emerg Med* 2013; 44: 360-366.
3. Seely KA, Lapoint J, Moran JH, Fattore L. Spice drugs are more than harmless herbal blends: A review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012; 39: 234-243.
4. Zuba D, Byrska B, Maciów M. Comparison of “herbal highs” compositions. *Anal Bioanal Chem* 2011; 400: 119-126.
5. Maciów-Głęb M, Kłys M, Kula K, Rojek S. Nowe związki psychoaktywne (NPS) w dowodach rzeczowych w praktyce eksperckiej KiZMS UJ CM w latach 2010-2015. *Arch Med Sąd Kryminol* 2017; doi: <https://doi.org/10.5114/amsik.2017.71449>.



6. Andreeva-Gateva PA, Nankova VH, Angelova VT, Gatev TN. Synthetic cannabimimetics in Bulgaria 2010–2013. *Drug Alcohol Depend* 2015; 157: 200-204.
7. Fattore L, Fratta W. Beyond THC: The New Generation of Cannabinoid Designer Drugs. *Front Behav Neurosci* 2011; 60: 1-12.
8. Musshoff F, Madea B, Kernbach-Wighton G, Bicker W, Kneisel S, Hutter M, Auwärter V. Driving under the influence of synthetic cannabinoids (“Spice”): a case series. *Int J Legal Med* 2014; 128: 59-64.
9. Ustawa z dnia 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii (tekst jednolity: Dz.U. z 2017 r. poz. 783, 1458).
10. Rojek S, Kłys M, Maciów-Głąb M, Kula K, Strona M. Cathinones derivatives-related deaths as exemplified by two fatal cases involving methcathinone with 4-methylmethcathinone and 4-methylethcathinone. *Drug Test Anal* 2014; 6: 770-777.
11. Rojek S, Kłys M, Strona M, Maciów M, Kula K. “Legal highs” – toxicity in the clinical and medico-legal aspect as exemplified by suicide with bk-MBDB administration. *Forensic Sci Int* 2012; 222: e1-6.
12. Rojek S, Kłys M, Maciów-Głąb M, Kula K. New challenge in forensic toxicology exemplified by a case of murder under influence of synthetic cannabinoid AM-2201. *Leg Med* 2017; 27: 25-31.
13. U.S. Department of Justice, Drug Enforcement Administration (DEA), “Schedules of Controlled Substances: Temporary Placement of Three Synthetic Cannabinoids Into Schedule I,” 78 Federal Register 28735-28739, Washington – May 16, 2013. https://www.deadiversion.usdoj.gov/mtgs/non_dea_meetings/nasca102413.pdf.
14. UR-144 Critical-Review Report, Agenda item 4.8, 36th Expert Committee on Drug Dependence, World Health Organization, Geneva, 16-20 June 2014, http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/4_8_Review.pdf
15. Sobolevsky T, Prasolov I, Rodchenkov G. Detection of urinary metabolites of AM-2201 and UR-144, two novel synthetic cannabinoids. *Drug Test Anal* 2012; 4: 745-753.
16. Grigoryev A, Kavanagh P, Melnik A, Savchuk S, Simonov A. Gas and liquid chromatography – mass spectrometry detection of the urinary metabolites of UR-144 and its major pyrolysis products. *J Anal Toxicol* 2013; 37: 265-276.
17. Adamowicz P, Zuba D, Sekuła K. Analysis of UR-144 and its pyrolysis product in blood and their metabolites in urine. *Forensic Sci Int* 2013; 233: 320-327.
18. Kronstrand R, Roman M, Anderson M, Eklund A. Toxicological findings of synthetic cannabinoids in recreational users. *J Anal Toxicol* 2013; 37: 534-541.
19. Adamowicz P, Gieron J, Gil D, Lechowicz W, Skulska A, Tokarczyk B. The effects of synthetic cannabinoid UR-144 on the human body. A review of 39 cases. *Forensic Sci Int* 2017; 273: e18-e21.
20. Hermanns-Clausen M, Kneisel S, Hutter M, Szabo B, Auwärter V. Acute intoxication by synthetic cannabinoids – four case reports. *Drug Test Anal* 2013; 5: 790-794.
21. Shanks KG, Dahn T, Terrell AR. Detection of JWH-018 and JWH-073 by UPLC-MS-MS in postmortem whole blood casework. *J Anal Toxicol* 2012; 36: 145-152.
22. Schaefer N, Peters B, Bregel D, et al. A fatal case involving several synthetic cannabinoids. *Toxichem Krimtech* 2013; 80: 248-251.
23. Zimmermann US, Winkelmann PR, Pilhatsch M, Nees JA, Spanagel R, Schulz K. Withdrawal phenomena and dependence syndrome after the consumption of „Spice Gold. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106: 464-467.
24. Panlilio LV, Zanettini C, Barnes C, Solinas M, Goldberg SR. Prior exposure to THC increases the addictive effects of nicotine in rats. *Neuropharmacology* 2013; 38: 1198-1208.
25. Secades-Villa R, Garcia-Rodríguez O, Jin CJ, Wang S, Blanco C. Probability and predictors of the cannabis gateway effect: a national study. *Int J Drug Policy* 2015; 26: 135-142.
26. Rojek S, Bolechała F, Kula K, Maciów-Głąb M, Kłys M. Medicolegal aspects of PMA-related deaths. *Leg Med (Tokyo)* 2016; 21: 64-72.
27. Sykutera M, Cychowska M, Bloch-Bogusławska E. A fatal case of Pentedrone and α -Pyrollidinovaleronphenone Poisoning. *J Anal Toxicol* 2015; 39: 324-329.
28. Resenbaum CD, Carreiro SP, Babu KM. Here today, gone tomorrow... and back again? A review of herbal marihuana alternatives (K2, Spice), synthetic cathinones (bath salts), kratom, Salvia divinorum, methoxetamine, and piperazines. *J Med Toxicol* 2012; 8: 15-32.

Adres do korespondencji

Sebastian Rojek
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
ul. Grzegorzeczka 16
31-531 Kraków, Polska
e-mail: msrojek@cyf-kr.edu.pl

Address for correspondence

Sebastian Rojek
Chair and Department of Forensic Medicine
Jagiellonian University Medical College
Grzegorzeczka 16
31-531 Krakow, Poland
e-mail: msrojek@cyf-kr.edu.pl

