



PRESIDENZA DEL CONSIGLIO DEI MINISTRI
Dipartimento Politiche Antidroga

Progetto

N.P.S. - Tox

Studio di Tossicologia in Modello Animale sulle
New Psychoactive Substances (N.P.S.) secondo procedure GLP nella
prospettiva di allestimento metodi per la valutazione dell'incidentalità stradale
associata a N.P.S.

Ente gestore (Centro Collaborativo DPA)



Università di Verona

Dipartimento di Sanità Pubblica e Medicina di Comunità

In collaborazione con

Università di Ferrara, Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie

Dipartimento delle Dipendenze, ULSS 20, Verona

European Institute for Health Promotion

Durata finanziata:

2 anni

Budget finanziato:

€ 170.920,00



Indice

- 1 Titolo del progetto
- 2 Riassunto – Sintesi
- 3 Referenti amministrativi
- 4 Problem analysis and setting
 - 4.1 Problema che si vuole risolvere e/o motivazione per la proposta di progetto
 - 4.2 Dimensionamento e rilevanza del problema
- 5 Obiettivo generale dell'intervento proposto e risultati attesi
- 6 Sotto obiettivi specifici
- 7 Premesse tecnico scientifiche (Il Razionale) dell'intervento proposto
- 8 Target (Destinatari)
- 9 Territorio ed ambienti di intervento
- 10 Valore aggiunto atteso dell'intervento proposto
- 11 Sotto obiettivi e indicatori
- 12 Sotto obiettivi, Work Package e Metodi
- 13 Risk Assessment e Risk Management
- 14 Organigramma generale del progetto
- 15 Governance – Assegnazione dei compiti principali
- 16 Percorso operativo
 - 16.1 Articolazione in macro fasi e attività
 - 16.2 Gantt Preventivo
 - 16.3 Agenda Reporting
- 17 Risorse e Piano Finanziario
 - 17.1 Quote di finanziamento previsto
- 18 Accreditementi Ente Gestore

Allegato 1: Report di Rendicontazione Finanziaria

Allegato 2: Report di Rendicontazione Tecnico-Scientifica



1

Titolo Progetto

Acronimo o sigla	Progetto N.P.S. - Tox
Titolo per esteso	Studio di Tossicologia in Modello Animale sulle New Psychoactive Substances (N.P.S.) secondo procedure GLP nella prospettiva di allestimento metodi per la valutazione dell'incidentalità stradale associata a N.P.S.
Ente committente	Presidenza del Consiglio dei Ministri – Dipartimento Politiche Antidroga Capo del Dipartimento: Dott. Giovanni Serpelloni
Gruppo di coordinamento tecnico-scientifico	Direzione tecnico-scientifica: Presidenza del Consiglio dei Ministri Dipartimento Politiche Antidroga Università di Verona, Dipartimento di Sanità Pubblica e Medicina di Comunità, Sezione di Medicina Legale Università di Ferrara, Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie
Ente gestore	Dipartimento delle Dipendenze, ULSS 20 Verona Università di Verona Dipartimento di Sanità Pubblica e Medicina di Comunità Sezione di Medicina Legale,
Responsabile per l'Ente Gestore	Prof. Domenico De Leo
Responsabile Operativo del progetto per l'Ente Gestore	Prof. Franco Tagliaro
Collaborazioni previste	NIDA/NIH Clinical Pharmacology and Therapeutics Research Branch, Baltimore, USA (Dr. Marilyn Huestis) Università di Ferrara, Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie Dipartimento delle Dipendenze, ULSS 20, Verona European Institute for Health Promotion
Gruppo di lavoro interdisciplinare previsto	UNITA' 1 <u>Sezione di Medicina Legale, Dipartimento di Sanità Pubblica e Medicina di Comunità, Università di Verona</u> Prof. Franco Tagliaro, professore ordinario, medicina legale e tossicologia Dr.ssa Federica Bortolotti, ricercatore confermato, medicina legale e tossicologia Dr.ssa Pamela Rodegher, contrattista di ricerca, istopatologia Dr.ssa Rossella Gottardo, assegnista di ricerca, tossicologia forense Dr.ssa Elisa Trapani, dottoranda di ricerca, scienze forensi Sig. Riccardo Calza, tecnico di istopatologia Dr.ssa Patrizia Cristofori, tossicologa farmaceutica (consulente) Dr.ssa Paola Albertini, contrattista di ricerca, Quality Assurance UNITA' 2 <u>Università di Ferrara, Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie</u> Dott. Matteo Marti, ricercatore farmaco-tossicologo UNITA' 3 <u>Sistema Nazionale di Allerta Precoce, Coordinamento Operativo presso Dipartimento delle Dipendenze, ULSS 20, Verona</u> Dr.ssa Claudia Rimondo, Unità di coordinamento operativo, N.E.W.S. Dr.ssa Catia Seri, Sistema Nazionale di Allerta Precoce, DPA

2.0 Titolo del Progetto

Progetto N.P.S. – Tox. Studio di Tossicologia in Modello Animale sulle New Psychoactive Substances (N.P.S.) secondo procedure GLP nella prospettiva di allestimento metodi per la valutazione dell'incidentalità stradale associata a N.P.S.

2.1 Premesse

Il razionale del presente progetto si inquadra nell'urgente esigenza di investigare e comprendere gli effetti farmacotossicologici delle nuove droghe note con l'acronimo N.P.S. (New Psychoactive Substances), recentemente apparse nel mercato mondiale delle nuove sostanze "ricreative", con potenziali effetti negativi sulla salute (EMCDDA 2009; The first International Conference on Novel Psychoactive Substances, 2012).

Queste molecole, a causa della suddetta recente comparsa nel mercato, nonché del rapido cambiamento della loro disponibilità in commercio, presentano problemi di inclusione nelle tabelle delle sostanze stupefacenti in molti Paesi e pertanto possono essere liberamente vendute nei cosiddetti "Smart Shops" o tramite internet. Per le medesime ragioni, è poco nota la loro tossicologia sia nell'animale da esperimento, sia nell'uomo.

Nonostante la creazione di un sistema di "Early Warning" all'interno dell'EU, basato essenzialmente su dati riferiti, risultano ancora inadeguate le tecnologie analitiche per la determinazione di N.P.S. in preparazioni commerciali e in fluidi biologici. Infatti, i comuni sistemi di screening mediante immunoassay non sono in grado di rivelare questi nuovi composti, mentre i metodi più sofisticati basati su GC-MS o HPLC-MS risentono dell'assenza di informazioni sulla farmacocinetica e sul metabolismo di tali sostanze, mancando di conseguenza di standard puri e di pattern di frammentazione.

Tali carenze di conoscenze potrebbero facilmente essere colmate dall'esecuzione di studi di farmaco-tossicologia controllati sull'animale, orientati alle N.P.S. più diffuse in un certo lasso cronologico, come proposto dal Progetto NS-Drugs, che tuttavia manca di una fase di analitica morfologica eseguita secondo i moderni standard della tossicologia farmaceutica. Manca inoltre di una sistematica valutazione analitica dei metaboliti di tali composti che possano essere utilizzati come marker biologici di consumo di N.P.S. nell'ipotesi di studiare l'associazione tra assunzione di questi composti e incidentalità stradale.

2.2 Obiettivo

Valutare gli effetti tossicologici acuti, subacuti (ed eventualmente cronici) indotti dalle N.P.S. in un sistema sperimentale controllato, certificato (ove richiesto) secondo le normative GLP (Good Laboratory Practices), come richiesto per la registrazione farmaceutica e sviluppare in un contesto controllato modalità analitiche idonee a studiare i possibili effetti tossicologici di questi composti sui conducenti di autoveicoli

2.3 Metodo

Il metodo si avvale di un team di 3 unità, di cui una mutuata dal progetto NS-Drugs, che garantirà:

- 1. l'identificazione rapida delle principali N.P.S. presenti sul mercato in un determinato momento (Unità 1);*
- 2. l'esecuzione di trattamenti sull'animale da esperimento in tempi rapidi secondo modelli di somministrazione acuta e subacuta (ed eventualmente cronica) (Unità 2);*
- 3. l'esecuzione di controlli chimico-clinici, anatomo-patologici e isto-patologici secondo procedure GLP e di tossicologia analitica sui liquidi biologici e tessuti (Unità 3).*

Onde pervenire in tempi contenuti in 6 mesi alla definizione del profilo tossicologico delle sostanze selezionate in partenza.

In particolare, il progetto nella fase 1 si avvarrà della collaborazione del Sistema Nazionale di Allerta Precoce del Dipartimento Politiche Antidroga, che fornirà le informazioni e le indicazioni sulle N.P.S. di maggiore interesse in un dato momento, sulla base dei reports di allerta nazionali e europei (EMCDDA) e delle segnalazioni di casi di tossicità acuta nell'uomo. Saranno anche utilizzati i dati provenienti dal progetto SMART Search 2 che, oltre ad analizzare con metodiche analitiche di screening e conferma, basate sulla spettrometria di massa ad alta risoluzione, la composizione dei reperti di N.P.S., si propone attraverso l'analisi tossicologica dei capelli di investigare la reale diffusione delle N.P.S. nella popolazione dei consumatori cronici.

Su questa base saranno dunque selezionate le sostanze di maggiore interesse su cui orientare lo studio tossicologico. Di tali composti sarà perciò necessario procedere all'ottenimento dei principi attivi in forma pura per via di sintesi o di estrazione da reperti sequestrati. Di tali principi saranno controllati purezza e titolo mediante metodologie analitiche moderne, basate sulla HPLC e/o elettroforesi capillare accoppiate alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) mediante strumentazione TOF-MS (Unità 1).

La fase successiva consisterà nel trattamento di roditori da esperimento con modalità acuta e subacuta (e cronica, se compatibile con la tempistica e il finanziamento del progetto) da eseguirsi nell'ambito o collateralmente al progetto NS-Drugs presso l'Unità 2. Tali schemi di trattamento comprenderanno anche un gruppo di controllo negativo (non trattato) e un gruppo di controllo positivo (trattato con analogo di farmaco-tossicologia nota).

Durante il periodo di trattamento e/o alla fine dello stesso, saranno eseguiti controlli chimico-clinici sugli animali onde verificare eventuali alterazioni patologiche indotte dalle sostanze. Gli animali saranno anche studiati dal punto di vista



tossicologico analitico, con particolare riguardo alla formazione di metaboliti urinari. Al termine, gli animali saranno sacrificati senza sofferenza ed esaminati in ambito necroscopico sia sul piano morfologico-macroscopico, sia su quello isto-patologico, secondo procedure standardizzate di campionamento, inclusione, colorazione e preparazione di vetrini. La diagnostica isto-patologica sarà eseguita da personale esperto e qualificato in isto-patologia animale.

La procedura dello studio isto-patologico sarà eseguita in un laboratorio dell'unità 1, certificato GLP dal Ministero della Sanità. Se necessario, anche le fasi di trattamento e sacrificio potranno essere eseguite in ambito regolatorio presso strutture esterne.

I risultati dello studio tossicologico saranno messi a disposizione del progetto NS-Drugs del DPA, e del NIDA Clinical Pharmacology and Therapeutics Research Branch, al fine di supportare studi di trattamento con N.P.S. su volontari sani.

2.4 Risultato atteso

I principali risultati saranno la valutazione rapida e rigorosa (secondo standard GLP) degli effetti tossicologici delle N.P.S., sia dopo somministrazione acuta, sia dopo tempi più prolungati di esposizione (trattamento subacuto ed eventualmente cronico).

Questi studi permetteranno di caratterizzare il profilo tossicologico delle N.P.S. secondo i tipici criteri adottati nella registrazione farmaceutica.

Tali evidenze da un lato forniranno informazioni utili al riconoscimento e al trattamento delle intossicazioni acute e dell'uso ripetuto, dall'altro offriranno la base di conoscenze necessaria per intraprendere studi di somministrazione controllata nei volontari sani. Questi ultimi, a oggi non eseguibili per la mancanza dei dati di tossicologia animale, potranno chiarire per la prima volta farmaco-cinetica e farmaco-dinamica nonché metabolismo di queste sostanze nell'uomo, rappresentando dunque la base per la possibilità di identificare strumentalmente con adeguata sensibilità e specificità diagnostiche le condizioni di intossicazione acuta e di abuso ripetuto di N.P.S., nonché la loro diffusione nella popolazione. Questa ultima possibilità risulta di particolare importanza nello studio dell'associazione, ipotizzabile ma indimostrata per limiti tecnici, dell'associazione tra consumo acuto e/o cronico di N.P.S. e incidentalità stradale (analoghe considerazioni si possono proporre per l'incidentalità lavorativa).

3

Referenti amministrativi

Referenti	Coordinate
Per il DPA:	Tel: 06.67796350
Ufficio Contabile DPA	Fax: 06.67796843
	Email: ufficiocontabledpa@governo.it
Per l'Università di Verona	Tel: 045 8027677
Dr.ssa Susanna Montalto	Fax: 045 8027677
	Email: susanna.montalto@univr.it

4

Problem analysis and settings

4.1 Problema che si vuole risolvere e/o motivazione per la proposta di progetto

Il problema della diffusione e dell'uso nei Paesi sviluppati di nuove sostanze d'abuso (New Psychoactive Substances, N.P.S.) ricopre una rilevanza assoluta tra i comportamenti a rischio da monitorare nella collettività, in particolare giovanile.

Negli ultimi cinque anni il Sistema di Allerta Precoce (National Early Warning System, N.E.W.S) e l'Osservatorio Europeo sulle Droghe e le Tossicodipendenze (O.E.D.T.) hanno evidenziato un allarmante incremento della disponibilità delle N.P.S. sia nella distribuzione semiclandestina, sia nell'ambito dello e-commerce. In parallelo sono stati segnalati numerosi episodi di intossicazione acuta e di eventi avversi attribuiti all'assunzione di N.P.S., anche se in molti casi, a seguito di diagnosi meramente anamnestica, senza una dimostrazione oggettiva della presenza di questi composti nei campioni biologici.

In realtà, pur generalmente assimilabili come meccanismo d'azione a composti psicoattivi noti, le N.P.S. sono poco o affatto conosciute dal punto di vista farmacologico, in relazione alla loro recente comparsa e molteplicità di struttura. Per tale ragione, la disponibilità di una base di conoscenza farmaco-tossicologica non solo garantirebbe di riconoscere clinicamente le condizioni di intossicazione, ora dipendente meramente dall'intuito del medico e/o dalle dichiarazioni del paziente, ma anche di accertare gli effetti collaterali e, di particolare valore, la presenza di tali composti nei campioni biologici degli interessati, onde pervenire a una diagnosi oggettiva.

A questo proposito va rimarcata una grossolana non corrispondenza tra i nomi commerciali con cui questi prodotti sono distribuiti, e la natura del principio attivo in essi contenuto. Pertanto, frequentemente il dato anamnestico è fallace per l'ignoranza dell'utilizzatore stesso circa la sostanza che ha consumato. Solo la conduzione di ricerche controllate sulla



farmacocinetica, farmacodinamica e metabolismo di queste sostanze, inizialmente nell'animale e possibilmente anche nell'uomo, potrà fornire strumenti atti a dirimere la problematica in oggetto. A tali obiettivi mira il progetto NS-Drugs dell'Università di Ferrara, che propone un articolato studio farmacologico sull'animale da esperimento.

Sembra peraltro altrettanto importante valutare in condizioni controllate (in acuto e in condizioni di somministrazioni ripetute) e standard procedurali internazionalmente riconosciuti (GLP), la tossicologia di questi composti sia in termini di potenziale alterazione di parametri ematologici e chimico-clinici, sia di alterazioni isto-patologiche. Particolare attenzione sarà dedicata alla neurotossicità.

Tale approccio sistematico è anche fondamentale per porre la basi di conoscenza farmaco-tossicologica e di metodologia analitica tali da consentire adeguati studi nell'uomo relativamente all'"impairment" causato dalle N.P.S. sulle funzioni essenziali per la sicurezza della guida, nonché per porre le basi tossicologico-analitiche per una specifica e sensibile identificazione degli utilizzatori

Le informazioni derivanti da questi studi, quando prodotte con procedure GLP compliant, potranno essere utilizzate per condurre studi sui volontari sani, che da soli forniranno un corpo di risultati farmacologici completo idoneo alla valutazione della farmaco-tossicologia delle varie N.P.S.

4.2 Dimensionamento e rilevanza del problema (frequenza, grado di gravità, misure epidemiologiche ecc.)

Dal punto di vista epidemiologico, la dimensione del problema dell'uso delle N.P.S. è sfortunatamente sconosciuta a causa della quasi assoluta inidoneità dei laboratori di tossicologia dei servizi sanitari europei a determinare le sostanze in oggetto nei campioni biologici, fatto che, sommato alla scarsa conoscenza clinica della sintomatologia da intossicazione, conduce inevitabilmente ad una grande sottostima dei relativi casi clinici.

Ciononostante, sono state segnalate in Europa svariate decine di intossicazioni acute (da cannabinoidi sintetici, catinoni, ecc.) attribuite a N.P.S. In realtà questi dati, pur notoriamente parziali, rappresentano solo un elemento relativamente marginale della rilevanza del fenomeno. Infatti, sfuggono totalmente i sinistri stradali (ma anche del lavoro) che potrebbero essersi verificati sotto l'effetto di N.P.S. e che, ragionevolmente, dovrebbero rappresentare numeri ben maggiori, tenendo anche conto che di certo esiste un trend nella popolazione dei consumatori di droghe volto a shiftare dalle droghe tradizionali alle nuove droghe proprio perché queste ultime sfuggono ai controlli tossicologici, sulla strada e nell'ambiente di lavoro.

Gli unici dati oggettivi che abbiano una ragionevole affidabilità sono quelli relativi alle sostanze intercettate dal Sistema Nazionale di Allerta Precoce, che si sintetizzano in più di 150 molecole psicoattive, tra le quali: 30 catinoni sintetici come mefedrone (4-metilmecatino), MDPV (3,4-metilendioossiprovalerone) e butilone (bk-MBDB); 36 cannabinoidi sintetici (JWH-018, JWH-073, JWH-122, JWH-203, JWH-250 e analoghi strutturali) e analoghi benzoil indoli (RCS-4, AM-2201, AM-694, Eric-4); 25 derivati fenetilamminici (2C-B, 2C-I, 2C-T-2, 2C-T-7, Bromo Dragon Fly, 4 metilmetfetamina) ed oltre 50 molecole psicoattive di varia natura come Ketamina, cocaina, MDMA, LSD, marijuana, piperazine e triptamine (dal Report di attività 2012 del Sistema Nazionale di Allerta Precoce del DPA).

5

Obiettivo generale dell'intervento proposto e risultati attesi

Valutare gli effetti tossicologici acuti, subacuti (ed eventualmente cronici) indotti dalle N.P.S. in un sistema sperimentale controllato, certificato secondo le normative GLP (*Good Laboratory Practices*) come richiesto per la registrazione farmaceutica, agendo e utilizzando procedure comuni (ove possibile) in parallelo con il progetto NS-Drugs, anche con il fine di fornire strumenti per la valutazione dei possibili effetti anche sui conducenti di autoveicoli

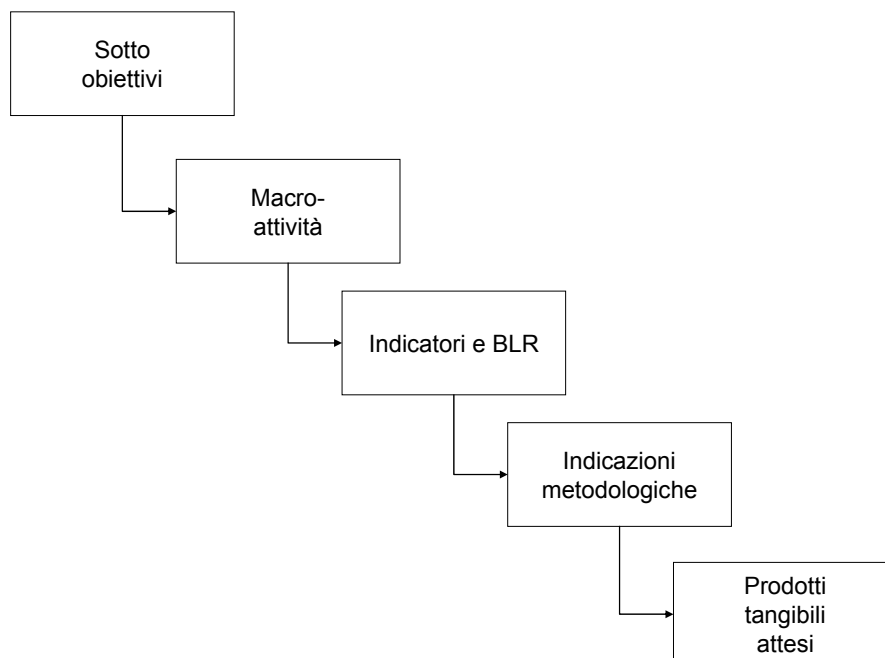
I risultati degli studi sull'animale si intendono anche propedeutici alla conduzione di sperimentazione sul volontario sano, in stretta collaborazione con NIDA/NIH, Clinical Pharmacology and Therapeutics Research Branch, Baltimore, MD.

Sotto obiettivi specifici

Vengono di seguito elencati i sotto obiettivi specifici, cioè i risultati attesi del progetto; in altre parole ciò che è necessario fare per realizzare l'obiettivo generale del progetto, scomponendo tale obiettivo in sotto obiettivi da raggiungere:

1. Identificazione delle N.P.S. da studiare sulla base di: report di allerta, analisi reperti, segnalazioni di intossicazioni acute, analisi capelli.
2. Ottenimento dei composti puri per via di sintesi o di estrazione. Controllo purezza e titolo mediante LC-TOFMS e/o LC-QQQMS.
3. Trattamento animali da esperimento. Esecuzione seriata di controlli macroscopici, chimico-clinici ed ematologici (eventualmente campionamento per studi di metabolismo) [in coordinazione con progetto NS-Drugs].
4. Sacrificio, valutazione macroscopica organi, campionamento standard per studi isto-patologici, indagini microscopiche.
5. Test preliminare, campionamento di liquidi biologici e tessuti di soggetti deceduti in incidenti stradali e ricerca in questi campioni dei metaboliti delle N.P.S. (scelti sulla base di quanto emerso negli studi su animali) [studio preliminare]
6. Trasferimento e scambio informazioni con il Sistema Nazionale di Allerta Precoce ed eventualmente con altri Centri di ricerca per inizio di studi nel volontario sano.

In seguito, questi sotto obiettivi vengono ulteriormente definiti nella componente operativa e chiariti, elencando una serie di specifiche e ulteriori informazioni necessarie per la loro realizzazione, utilizzando il framework logico sotto riportato.



Nell'ambito del ripreso interesse per i cosiddetti trattamenti “natural” indirizzati al benessere psicofisico, negli anni più recenti si è assistito alla diffusione di prodotti asseritamente estranei all'ambito farmaceutico, pubblicizzati come integratori dietetici piuttosto che come infusi o the, creme, sali da bagno, incensi, ecc., facilmente reperibili nella rete Internet, presso le erboristerie o i cosiddetti “*Smart Shops*”. Tali prodotti dichiarano una composizione “naturale”, escludendo componenti classificabili come farmaci o composti soggetti a restrizioni di legge.

In questo ambito, le autorizzazioni al commercio sono in molti Paesi poco restrittive, ammettendo così la diffusione di un'ambigua serie di preparazioni che si presentano al confine tra “prodotti per uso in ambienti”, “alimenti”, “farmaci” o “droghe”. D'altro canto, il fatto che tali prodotti vengano pubblicizzati come “natural”, non pericolosi per la salute e assumibili senza prescrizione e controllo medico, li rende particolarmente attraenti per il pubblico, soprattutto quello giovanile.

A questo si aggiunge la tradizione ben consolidata di presentare questi prodotti come finalizzati all'ottenimento del “benessere”, che in realtà però si traduce in stati psicologici alterati, effetti entactogeni, lievemente dissociativi, sino a situazioni simil-psichedeliche. L'offerta commerciale si estende anche a preparazioni “stimolanti”, di cui sono riferiti effetti simil-amfetaminici (resistenza alla fatica, aumento del tono dell'umore) e di potenziamento delle *performance* sessuali.

Esempio particolarmente molto noto di questo *trend* è la diffusione delle cosiddette “*Spice drugs*”, miscele erbacee vendute in bustine e commercializzate come incensi, che in realtà sono addizionati con analoghi sintetici di cannabinoidi, per ora non tabellati e quindi “non illeciti”. L'uso di “*Spice*” [1, 2] ha peraltro determinato non pochi casi di intossicazione umana. Modifiche delle strutture di base dei principi attivi, oltre che per *by-passare* le norme sugli stupefacenti, possono essere eseguite anche allo scopo di massimizzare gli effetti. Tra gli “*Spices*” ricordiamo i composti noti come JWH-018 [3], HU-210 [4], CP47,497 [5], JWH-073, JWH-398 e JWH-250 [6].

La creazione di nuovi analoghi modificati ha interessato anche le fenilettilammine con similarità strutturali sia con le amfetamine che con la mescalina, le triptammine con similarità strutturali con l'allucinogeno psilocina e con le fenilpiperazine.

Nel gruppo delle N.P.S. si comprendono anche prodotti vegetali che in altre culture sono tradizionalmente impiegati come psicotropi i cui i principi attivi, pur talora noti, sono scarsamente caratterizzati e sostanzialmente indisponibili in forma pura, e spesso non compresi nelle tabelle delle sostanze stupefacenti e psicotrope. Tra questi citiamo a titolo di esempio: Areca catechu, Ipomoea Violacea, Mitragyna speciosa, Hawaiian baby woodrose e Voacanga africana.

Tale situazione è veramente preoccupante, in relazione alla diffusione internazionale dell'uso personale di composti con caratteristiche farmaco-tossicologiche sostanzialmente ignote, ma verosimilmente dotati di non trascurabile tossicità e tendenza a generare dipendenza. Si deve inoltre ricordare come negli anni più recenti sia stato segnalato un numero rilevante di casi di intossicazione umana in assuntori di N.P.S. A questo riguardo si segnala che l'*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* (EMCDDA) riporta il fenomeno della diffusione delle N.P.S. nel suo report annuale [7], e che a livello di Unione Europea è stato creato l'“*Early-Warning System*” (EWS), deputato allo scambio di informazioni tra gli Stati membri circa la diffusione di nuove sostanze psicoattive che possono determinare problemi sociali e di salute pubblica. Scopo dell'EWS è anche quello di attivare un processo formale di valutazione del rischio che possa portare ad azioni politiche di controllo europeo delle sostanze identificate [8]. A livello italiano, all'istituzione dell'EWS Europeo è corrisposta la creazione del “Sistema Nazionale di Allerta Precoce”, in cui è formalmente inserito il laboratorio di tossicologia forense dell'Unità di Ricerca del coordinatore del presente progetto.

L'estrema varietà dei principi attivi delle N.P.S., che vanno da analoghi sintetici di composti noti, a composti di nuova sintesi, a prodotti naturali (comunque dotati di importante attività farmacologica psicotropa), rende l'identificazione delle stesse estremamente difficile, anche perché nella maggioranza dei casi mancano *standard* di riferimento, nonché informazioni sulle caratteristiche chimiche e cromatografiche dei composti e sui loro *pattern* di frammentazione.

Questo rende la ricerca delle N.P.S. estremamente aleatoria quando si impiegano i classici metodi della chimica tossicologica e della tossicologia forense, basati sull'impiego da un lato di tecnologie immunochimiche e dall'altro di tecniche cromatografiche in fase liquida o gassosa accoppiate a spettrometri di massa quali singoli o tripli quadrupoli o trappole ioniche.

Alla soluzione di questi problemi è stato indirizzato il progetto SMART Search (1 e 2) che, integrato nel Sistema Nazionale di Allerta Precoce, ha contribuito a mantenere un aggiornato catalogo delle sostanze psicotrope atipiche presenti sul territorio nazionale nel mercato clandestino.

Dal punto di vista epidemiologico, invece, la dimensione del problema dell'uso delle N.P.S. è sfortunatamente sconosciuta a causa della quasi assoluta inidoneità dei laboratori di tossicologia dei servizi sanitari europei a determinare le sostanze in oggetto nei campioni biologici, fatto che, sommato alla scarsa conoscenza clinica della sintomatologia da intossicazione, porta ad una grande sottostima dei relativi casi clinici. Ciononostante, sono state segnalate in Europa svariate decine di intossicazioni acute (da cannabinoidi sintetici, catinoni, ecc.) attribuite a N.P.S. In realtà questi dati, notoriamente parziali, rappresentano solo un elemento relativamente marginale della rilevanza del fenomeno. Infatti, sfuggono totalmente i sinistri stradali (ma anche quelli sul lavoro) che potrebbero essersi verificati sotto l'effetto di N.P.S. e che, ragionevolmente, dovrebbero rappresentare numeri ben maggiori, tenendo anche conto che di certo esiste un *trend* nella popolazione dei consumatori di droghe volto a *shiftare* dalle droghe tradizionali alle nuove droghe proprio perché queste ultime sfuggono ai controlli tossicologici, sulla strada e nell'ambiente di lavoro. Gli unici dati oggettivi che abbiano una ragionevole affidabilità sono quelli relativi alle sostanze intercettate dal Sistema Nazionale di Allerta Precoce, che si sintetizzano in più di 150 molecole psicoattive, tra cui: 30 catinoni sintetici come mefedrone (4-metilmetcatinone), MDPV (3,4-metilendioossipirovalerone) e butilone (bk-MBDB); 36 cannabinoidi sintetici (JWH-018, JWH-073, JWH-122, JWH-203, JWH-250 e analoghi strutturali) e analoghi benzoil indoli (RCS-4, AM-2201, AM-694, Eric-

4); 25 derivati fenetilamminici (2C-B, 2C-I, 2C-T-2, 2C-T-7, Bromo Dragon Fly, 4 metilamfetamina) ed oltre 50 molecole psicoattive di varia natura come Ketamina, cocaina, MDMA, LSD, marijuana, piperazine e triptamine (dal Report di attività 2012 del Sistema Nazionale di Allerta Precoce del DPA).

In realtà, pur generalmente assimilabili come meccanismo d'azione a composti psicoattivi noti, le N.P.S. sono poco o affatto conosciute dal punto di vista farmacologico, in relazione alla loro recente comparsa e molteplicità. Invece, la disponibilità di una base di conoscenza farmacologica non solo garantirebbe di poter riconoscere clinicamente le condizioni di intossicazione, ora dipendente meramente dall'intuito del medico e/o dalle dichiarazioni del paziente, ma anche di accertare gli effetti collaterali e, di particolare valore, la presenza di tali composti nei campioni biologici degli interessati, onde pervenire a una diagnosi oggettiva.

A questo proposito va rimarcata la grossolana non corrispondenza tra i nomi commerciali con cui questi prodotti sono distribuiti e la natura del principio attivo in essi contenuto. Pertanto, frequentemente il dato anamnestico è fallace per l'ignoranza dell'utilizzatore circa la sostanza che ha consumato.

Solo la conduzione di ricerche controllate sulla farmacocinetica, farmacodinamica e metabolismo di queste sostanze, inizialmente nell'animale ma eminentemente nell'uomo, potrà fornire strumenti atti a dirimere la problematica in oggetto. A tali obiettivi mira il progetto NS-Drugs dell'Università di Ferrara, che propone un articolato studio farmacologico sull'animale da esperimento.

Sembrano altrettanto poco conosciuti la farmacologia, il metabolismo e in particolare la tossicologia di questi composti, sia in termini di potenziale alterazione di parametri ematologici e chimico-clinici, sia in termini di alterazioni istopatologiche. Particolare importanza riveste la carenza di informazioni relativa alla neurotossicità, direttamente collegata all'impairment dell'idoneità alla guida

- [1] Understanding the Spice Phenomenon, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), Lisbon, Portugal, 2009;
- [2] <http://www.emcdda.europa.eu>;
- [3] B.K. Atwood et al. JWH018, a common constituent of 'Spice' herbal blends, is a potent and efficacious cannabinoid CB(1) receptor agonist. Br J Pharmacol. 2010 (in press);
- [4] A. Ottani and D. Giuliani. HU 210: a potent tool for investigations of the cannabinoid system, CNS Drug Reviews. 7, 2001, 131–145;
- [5] J.W. Huffman et al. Synthesis and pharmacology of 1-Deoxy Analogs of CP-47,497 and CP-55,940. Bioorg Med Chem 16, 2008, 322–335;
- [6] M.M. Aung et al. Influence of the N-1 alkyl chain length of cannabimimetic indoles upon CB1 and CB2 receptor binding. Drug and Alcohol Dependence. 60, 2000, 133–140;
- [7] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Annual report 2009: the state of the drugs problem in Europe, Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2009 — 99 pp. ISBN 978-92-9168-384-0;
- [8] Council Decision 2005/387/JHA of 10 May 2005 on the information exchange, risk assessment and control of new psychoactive substances (OJ L 127, 20.5.2005, p. 32).

8 Target (destinatari)

8.1 Target principale

Comunità scientifica nazionale e internazionale
Enti e Istituzioni operanti nel settore della salute e delle dipendenze

8.2 Target secondario

Consumatori di N.P.S.

9 Territorio ed ambienti di intervento

9.1 Aree geografiche coinvolte

Territorio nazionale
Europa, USA

10 Valore aggiunto atteso nell'intervento proposto

Il presente progetto si propone di integrarsi con altro progetto (NS-Drugs), orientato a una valutazione multidisciplinare degli effetti farmaco-tossicologici e fisiopatologici delle N.P.S. (in tale progetto denominate *Novel Synthetic Drugs*, NS-Drugs).

il progetto NS-Drugs prevede, secondo un'articolazione in 4 slot di 6 mesi, per una durata complessiva di 2 anni, le seguenti fasi:

1. identificazione delle sostanze da studiare nel roditore;



2. studi comportamentali e di *neuroimaging* nel roditore;
3. identificazione dei meccanismi coinvolti negli effetti tossici;
4. identificazione nell'animale da esperimento di terapie per il trattamento degli effetti tossici con possibilità di trasferimento all'uomo.

Risulta dunque chiaro che lo schema di sopra riassunto si presta ad integrarsi con lo schema proposto dal presente progetto, sia che si tratti di studio "contestuale" (integrato negli stessi cicli di trattamento animale), sia di studio "satellite" (condotto in parallelo su animali differenti). In questo contesto il presente progetto permette la produzione di dati certificati GLP di tossicologia istopatologica e chimico-clinica e di metabolismo, che potranno corroborare le informazioni dello studio NS-Drugs di carattere essenzialmente comportamentale e di *neuroimaging*. Inoltre, grazie alla certificazione GLP, tali dati permetteranno il coinvolgimento in studi sul volontario sano dell'importante struttura a questo dedicata, rappresentata dalla NIDA/NIH, *Clinical Pharmacology and Therapeutics Research Branch*, Baltimore, MD, con il quale sono già in atto contatti preliminari.

Come già segnalato dal progetto NS-Drugs, ulteriore valore aggiunto sarà rappresentato dalla tempistica sollecitata tra l'identificazione continuativa su una base multidisciplinare delle nuove sostanze di interesse (tramite report di allerta, analisi reperti, segnalazioni di intossicazioni, analisi capelli) e la conduzione degli studi di tossicologia e la comunicazione dei risultati. Questi aspetti garantiranno al DPA informazioni preziose per la valutazione preclinica degli effetti avversi tipici e atipici causati dall'assunzione acuta o ripetuta delle più importanti N.P.S. e forniranno strumenti analitici per l'identificazione dei consumatori.



11 Sotto obiettivi e indicatori

N°	Sotto obiettivi	Indicatori	Base line result	Prodotto tangibile atteso	Note
1	Identificazione delle N.P.S. da studiare sulla base di: report di allerta, analisi reperti, segnalazioni di intossicazioni acute, analisi capelli.	n° molecole identificate n° segnalazioni casi di tossicità	n°≥6 n°≥6	Informazioni strutturali su dette molecole	
2	Ottenimento dei composti puri per via di sintesi o di estrazione. Controllo purezza e titolo mediante LC-TOFMS e/o LC-QQQMS.	n° composti ottenuti	n°≥4	Composti puri in quantità sufficienti per gli studi	
3	Trattamento animali da esperimento. Esecuzione seriata di controlli macroscopici, chimico-clinici ed ematologici (eventualmente campionamento per studi di metabolismo) [in coordinazione con progetto NS-Drugs].	n° animali trattati e seguiti nei controlli	n° 5-6 per gruppo GRUPPI: 1) controllo veicolo 2) controllo basso dosaggio 3) controllo alto dosaggio 4) controllo positivo (composto di riferimento)	Trattamenti completati	
4	Sacrificio, valutazione macroscopica organi, campionamento standard per studi istopatologici, indagini microscopiche.	n° studi completati	n°≥2	Report di studio	
5	Campionamento di liquidi biologici e tessuti di soggetti deceduti in incidenti stradali e ricerca in questi campioni dei metaboliti delle N.P.S. (sulla base di quanto emerso negli studi su animali) [studio preliminare]	n. casi raccolto	n°≥100	Report di studio	
6	Trasferimento e scambio informazioni con il Sistema Nazionale di Allerta Precoce ed eventualmente con altri Centri di ricerca per inizio di studi nel volontario sano.	n° segnalazioni farmacotossicologiche al NEWS n° studi sottoposti a Centri di ricerca	n°≥2 n°≥1	Segnalazioni formali al Sistema Report sottoposti a Centri di ricerca	



12 Sotto obiettivi, Work package e metodi

N	Sotto obiettivi	Work Package (pacchetti di attività)	Metodi
1	Identificazione delle N.P.S. da studiare sulla base di: report di allerta, analisi reperti, segnalazioni di intossicazioni acute, analisi capelli.	WP 1.1 Analisi dei reports provenienti dal NEWS	Screening del database del NEWS LC/GC-QQQMS LC/TOFMS
		WP 1.2 Individuazione nei reperti	
		WP 1.3 Individuazione in campioni di capelli	
		WP 1.4 Scelta delle molecole	
2	Ottenimento dei composti puri per via di sintesi o di estrazione. Controllo purezza e titolo mediante LC-TOFMS e/o LC-QQQMS.	WP 2.1 Sintesi delle molecole scelte per i test	Sintesi farmaceutica Metodi di estrazione liquido-liquido e solido-liquido LC/GC-QQQMS LC/TOFMS
		WP 2.2 Estrazione da prodotti clandestini	
		WP 2.3 Controllo purezza e titolo	
3	Trattamento animali da esperimento. Esecuzione seriata di controlli macroscopici, chimico-clinici ed ematologici (eventualmente campionamento per studi di metabolismo) [in coordinazione con progetto NS-Drugs].	WP 3.1 Definizione del protocollo di studio in modelli animali (dosi, tipologie di trattamento, ecc.)	Operazione da eseguirsi in accordo con Progetto NS-Drugs Vedi schema allegato
		WP 3.2 Attuazione trattamenti e controlli	
4	Sacrificio, valutazione macroscopica organi, campionamento standard per studi istopatologici, indagini microscopiche.	WP 4.1 Attuazione procedure secondo GLP	Vedi sezione 13
		WP 4.2 Attuazione procure analitiche per ricerca metaboliti	
		WP 4.3 Valutazione risultati	
5	Campionamento di liquidi biologici e tessuti di soggetti deceduti in incidenti stradali e ricerca in questi campioni dei metaboliti delle N.P.S. (sulla base di quanto emerso negli studi su animali) [studio preliminare]	WP 5.1 Raccolta campioni di sangue/umor vitreo	Attuazione procure analitiche per ricerca metaboliti Valutazione risultati
		WP 5.2 Raccolta campioni di capelli	
		WP 5.3 Analisi secondo i metodi allestiti nell'ambito del Progetto Smart search 2 per gli analiti scelti sulla base del W.P. 4.2 di questo progetto	
6	Trasferimento e scambio informazioni con il Sistema Nazionale di Allerta Precoce ed eventualmente con altri Centri di ricerca per inizio di studi nel volontario sano.	WP 5.4 Inserimento dati nei reports del NEWS	Metodi di trasmissione richiesti da NEWS Metodi di trasmissione richiesti dai Centri di ricerca
		WP 5.5 Produzione report per NIDA	



13.1 Schema Protocollo di Studio Tossicità per trattamento ripetuto in ratto (CrI:CD®(SD) or Wistar Hannover CrI:WI(Han)). Durata complessiva 6 mesi

Parametri Valutati	Commenti	Durata trattamento: 14 giorni	
Numero animali/gruppo	Controllo (Veicolo)	5-6 animali/gruppo	
	Gruppo basso dosaggio N.P.S.(dosaggio farmalogico)	maschio	
	Gruppo alto dosaggio N.P.S.(dosaggio tossicologico)		
	Controllo positivo (composto attivo di riferimento)		
Osservazioni cliniche	Tutti gli animali verranno controllati nello stato di benessere ed eventuali segni clinici registrati per tutta la durata del trattamento	Giornaliera	
Peso corporeo	Baseline (pre-treatment) e durante trattamento : tutti gli animali	Due volte alla settimana	
Consumo di cibo	Baseline (pre-treatment) e durante trattamento : tutti gli animali	Due volte alla settimana	
Ematologia	Baseline (pre-treatment) e al termine del trattamento:tutti gli animali Batteria standard Non richiesto per animali moribondi	Ematocrito, emoglobina, conta totale globuli rossi, globuli bianchi, reticolociti e piastrine, conta differenziale, MCV e altri parametric calcolati.	Striscio sangue periferico
Chimica clinica	Baseline (pre-treatment) e al termine del trattamento:tutti gli animali Batteria standard Non richiesto per animali moribondi	ALT,AST,ALP, TBilitubina, Glucosio, Albumina, TPtoteine, Urea, Creatinina, Colesterolo, Trigliceridi, Sodio,Potassio, Cloro	
Analisi urine	Al termine trattamento: tutti gli animali Batteria standard	Aspetto,volume, ph,osmolarita', glucosio,protein, creatinina	
Necroscopie	Al termine trattamento: tutti gli animali Animali sacrificati moribondi o trovati morti Lista completa di tessuti prelevati	Osservazione macroscopica	Striscio sangue periferico e midollo da definire
Peso organi	Al termine trattamento: tutti gli animali Animali sacrificati moribondi o trovati morti	Cuore, Fegato, Rene, Cervello*, timo, milza, surrenali	
Esame istologico	Al termine trattamento: tutti gli animali Animali sacrificati moribondi o trovati morti	Cuore, Polmoni, Fegato, Rene, Cervello*, timo, milza, linfonodi, surrenali, intestino	*selezione estesa con Brain matrix come richiesto da linee guida OECD/FDA per sostanze neuroattive Ematossilina ed Eosina, colorazioni speciali a richiesta del patologo



13.2 Schema Protocollo di Studio preliminare su deceduti in sinistri stradali. Durata complessiva 24 mesi (4 slots di 6 mesi)

Parametri Valutati	Commenti	Metodi
Campioni sangue/umor vitreo/urina/ capelli soggetti deceduti in incidenti	Campioni biologici prelevati in corso di autopsia o ispezione esterna su deceduti per sinistro stradale: Ispezioni esterne: umor vitreo e capelli Autopsie: sangue, urina, capelli	Procedure standardizzate medico forensi di autopsia Procedure standardizzate medico forensi di ispezione esterna
Campioni della popolazione generale	Raccolta capelli in forma anonima (solo classificazione in base al sesso) tramite parrucchieri Raccolta urine in forma anonima dal leftover dei controlli tossicologici sulla mansioni a rischio	Procedure standardizzate di raccolta e conservazione campioni Procedure concordate con parrucchieri dell'area veronese di raccolta random di capelli Raccolta urine da lavoratori ex procedure standardizzate in applicazione provvedimento n. 99/cu 30 ottobre 2007 (G.U. n. 266 del 15 novembre 2007) Procedure standardizzate di raccolta e conservazione campioni
Dati anagrafici	Campioni anonimizzati, mantenendo informazioni su età, sesso	Mantenendo solo informazioni su età, sesso
Dati incidente	Data, ora, tipologia incidente	Anonimizzazione
Concentrazioni N.P.S./metaboliti/altre droghe/alcol	Ricerca composti/metaboliti scelti sulla base del WP 4.2 del presente progetto	I metodi utilizzati si baseranno sulla LC/GC-QQQ MS seguendo procedure sviluppate nello Smart Search 2



14 Risk Assessment e Risk Management

Elenco sintetico delle principali "Attività o condizioni critiche" alle quali prestare particolare attenzione per garantire il corretto svolgimento del progetto.

N°	Descrizione del rischio / evento negativo possibile	Probabilità di evenienza del rischio (accadimento)	Gravità conseguenze in caso di accadimento (impatto sul progetto)	Azione preventiva prevista	Azione correttiva prevista
1	Mancanza di dati sulle N.P.S. da studiare	<input checked="" type="checkbox"/> Molto bassa <input type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input type="checkbox"/> Bassa <input checked="" type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	Analisi preventiva <i>reports</i> e dei dati da SMART Search 1 e 2	Studio molecole già in banca dati
2	Mancanza principio attivo N.P.S.	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input checked="" type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input type="checkbox"/> Bassa <input checked="" type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	Studio bibliografia	Acquisto di composti puri sul mercato
3	Morte prematura animali per tossicità	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input checked="" type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input type="checkbox"/> Bassa <input checked="" type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	Calcolo opportuno dosaggi	Ripetizione dello studio con dosaggi rivisti
4	Insufficiente numero di casi studiati in rapporto alla prevalenza del fenomeno uso N.P.S.	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input checked="" type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	<input type="checkbox"/> Molto bassa <input checked="" type="checkbox"/> Bassa <input type="checkbox"/> Media <input type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Molto alta	Questa evenienza indica una bassa prevalenza e dunque ha comunque un significato	Estendere la casistica studiata coinvolgendo anche altri istituti di medicina legale.



15 Organigramma generale del progetto

Il progetto N.P.S.-Tox si articola come segue.

- Il **Dipartimento Politiche Antidroga** (D.P.A., Presidenza del Consiglio dei Ministri) nella sua sezione operativa del **Sistema Nazionale di Allerta Precoce** (N.E.W.S.) fornirà le indicazioni tecniche per l'identificazione e la scelta delle N.P.S. da sottoporre allo studio sperimentale, alla luce anche dei risultati dello SMART Search 1 e 2, condotti da questa unità proponente.
- Successivamente, le informazioni e le scelte del N.E.W.S. saranno sottoposte al **Gruppo di coordinamento tecnico-scientifico** in modo da definire le procedure sperimentali, che saranno condotte in stretta integrazione tra:

UNITA' 1

Sezione di Medicina Legale, Dipartimento di Sanità Pubblica e Medicina di Comunità, Università di Verona;

UNITA' 2

Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, Università di Ferrara,

che faranno riferimento come unità di coordinamento tra loro e con N.E.W.S. e D.P.A. alla

UNITA' 3

Sistema Nazionale di Allerta Precoce, Coordinamento operativo presso Dipartimento delle Dipendenze, ULSS 20, Verona.

16 Governance – assegnazione dei compiti principali

Soggetto	Compiti principali
DPA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ente Committente ▪ Coordinamento generale ▪ Controllo e verifica del progetto generale sia per la rendicontazione di risultato che della rendicontazione finanziaria
Gruppo di coordinamento tecnico scientifico	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Indirizzamento delle attività di valutazione in progress ed ex post ▪ Fornitura di supporto tecnico al DPA ▪ Indicazioni sulle collaborazioni scientifiche ed operative da attivare
Università di Verona	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ente Gestore ▪ Coordinamento generale ▪ Analisi materiali sequestrati e capelli (Smart Search 2) ▪ Studi di purezza sui composti da impiegarsi nei trattamenti ▪ Esecuzione sperimentale studi GLP (autopsie e valutazione macroscopica, istopatologia, ematologia, chimica clinica, eventualmente analisi metaboliti) ▪ Controllo e verifica del progetto generale sia per la rendicontazione di risultato che della rendicontazione finanziaria all'Ente Committente
Sistema Nazionale di Allerta Precoce	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Centro Collaborativo ▪ Individuazione molecole da studiare ▪ Collaborazione scientifica con il gruppo di ricerca
Università di Ferrara	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ente Collaborativo ▪ Trattamento animali e sacrificio, inseriti in parallelo con il Progetto NS-Drugs ▪ Rendicontazione di risultato e Rendicontazione finanziaria all'Ente Gestore
NIDA/NIH Clinical Pharmacology and Therapeutics Research Branch, Baltimore, USA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ente Collaborativo ▪ Acquisizione e valutazione dati tossicologici ▪ Predisposizione studi su volontario sano

17 Percorso Operativo

17.1 Articolazione in macro fasi e attività

Data di inizio prevista: 01/10/2013 (tale data potrà essere ridefinita in base al ricevimento da parte del DPA della lettera ufficiale di avvio delle attività)

Durata totale prevista: 1 anno 2 anni 3 anni

Durata totale finanziata: I annualità I e II annualità I, II e III annualità

Fine prevista delle attività finanziate(salvo proroghe): 30/09/2015 (e comunque dopo 24 mesi dall'avvio delle attività)

Macro fasi temporali Macro attività previste

Sotto Obiettivo 1	Analisi dei reports provenienti dal NEWS Individuazione nei reperti Individuazione in campioni di capelli Scelta delle molecole
Sotto Obiettivo 2	Sintesi delle molecole scelte per i test Estrazione da prodotti clandestini Controllo purezza e titolo
Sotto Obiettivo 3	Definizione del protocollo di studio in modelli animali (dosi, tipologie di trattamento, ecc.) Attuazione trattamenti e controlli
Sotto Obiettivo 4	Attuazione procedure secondo GLP Attuazione procedure analitiche per ricerca metaboliti Valutazione risultati
Sotto Obiettivo 5	Raccolta campioni di sangue/ umor vitreo Raccolta campioni di capelli Analisi secondo i metodi allestiti nell'ambito del Progetto Smart Search 2 per gli analiti scelti
Sotto Obiettivo 6	Inserimento dati nei reports del NEWS Produzione report per NIDA

Possibilità di Proroga: SI NO

Possibilità di Rifinanziamento: SI NO

La possibilità di proroga della durata del progetto è regolamentata dall'Accordo di Collaborazione
 La possibilità di rifinanziamento è condizionata all'ottenimento di parere positivo da parte del DPA sulle attività svolte e alla disponibilità finanziaria.

17.2 GANTT preventivo – I Annualità

N	Attività	Mesi											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Identificazione delle N.P.S. da studiare sulla base di: report di allerta, analisi reperti, segnalazioni di intossicazioni acute, analisi capelli.												
2	Ottenimento dei composti puri per via di sintesi o di estrazione. Controllo purezza e titolo mediante LC-TOFMS e/o LC-QQMS.												
3	Trattamento animali da esperimento. Esecuzione seriata di controlli macroscopici, chimico-clinici ed ematologici (eventualmente campionamento per studi di metabolismo) [in coordinazione con progetto NS-Drugs].												
4	Sacrificio, valutazione macroscopica organi, campionamento standard per studi isto-patologici, indagini microscopiche.												
5	Campionamento di liquidi biologici e tessuti di soggetti deceduti in incidenti stradali e ricerca in questi campioni dei metaboliti delle N.P.S. (sulla base di quanto emerso negli studi su animali) [studio preliminare]												
6	Trasferimento e scambio informazioni con il Sistema Nazionale di Allerta Precoce ed eventualmente con altri Centri di ricerca per inizio di studi nel volontario sano.												
ATTIVITÀ DI VALUTAZIONE (MILESTONES)		R= Report											
REPORT DI RISULTATO													
RENDICONTAZIONE FINANZIARIA													

17.3 GANTT preventivo – II Annualità

N	Attività	Mesi											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Identificazione delle N.P.S. da studiare sulla base di: report di allerta, analisi reperti, segnalazioni di intossicazioni acute, analisi capelli.												
2	Ottenimento dei composti puri per via di sintesi o di estrazione. Controllo purezza e titolo mediante LC-TOFMS e/o LC-QQMS.												
3	Trattamento animali da esperimento. Esecuzione seriata di controlli macroscopici, chimico-clinici ed ematologici (eventualmente campionamento per studi di metabolismo) [in coordinazione con progetto NS-Drugs].												
4	Sacrificio, valutazione macroscopica organi, campionamento standard per studi isto-patologici, indagini microscopiche.												
5	Campionamento di liquidi biologici e tessuti di soggetti deceduti in incidenti stradali e ricerca in questi campioni dei metaboliti delle N.P.S. (sulla base di quanto emerso negli studi su animali) [studio preliminare]												
6	Trasferimento e scambio informazioni con il Sistema Nazionale di Allerta Precoce ed eventualmente con altri Centri di ricerca per inizio di studi nel volontario sano.												
ATTIVITÀ DI VALUTAZIONE (MILESTONES)		R= Report											
REPORT DI RISULTATO													
RENDICONTAZIONE FINANZIARIA													

17.4 Agenda Reporting

Sigla Report	Data prevista	Tipo di rapporto
RR1	Dopo 6 mesi	Report in progress, dettagliato, sulla base degli obiettivi e degli indicatori pre-dichiarati riguardante i risultati tecnici ottenuti
RF1	Dopo 6 mesi	Rendicontazione finanziaria primo semestre
RR2	Dopo 12 mesi	Report in progress, dettagliato, sulla base degli obiettivi e degli indicatori pre-dichiarati riguardante i risultati tecnici ottenuti
RF2	Dopo 12 mesi	Rendicontazione finanziaria secondo semestre
RR3	Dopo 18 mesi	Report in progress, dettagliato, sulla base degli obiettivi e degli indicatori pre-dichiarati riguardante i risultati tecnici ottenuti
RF3	Dopo 18 mesi	Rendicontazione finanziaria terzo semestre
RR4	Dopo 24 mesi	Report finale dettagliato, sulla base degli obiettivi e degli indicatori pre-dichiarati riguardante i risultati tecnici ottenuti
RF4	Dopo 24 mesi	Rendicontazione finanziaria finale

18 Risorse e piano finanziario

Il budget totale previsto per le attività di progetto è stabilito a favore dell'Ente gestore un finanziamento omnicomprensivo di € 170.920,00 (centosessantamilanovecentoventieuro/00) per sostenere le spese di realizzazione così come previste e riportate nel piano finanziario del progetto, ripartito secondo le seguenti quote:

BENI E SERVIZI (Inventariabili e di consumo)	€ 104.000,00
PERSONALE A CONTRATTO	€ 50.000,00
PUBBLICAZIONI E MATERIALI INFORMATIVI	€ 1.000,00
MISSIONI E RIMBORSI	€ 4.000,00
OVERHEAD (8%)	€ 11.920,00
TOTALE	€ 170.920,00

I riparti tra le singole voci sono indicativi
Sono esclusi finanziamenti a favore di personale dirigente di ruolo.

17.1 Quote di finanziamento previste

Il finanziamento sarà erogato con le seguenti modalità:

I QUOTA: 50% dopo la registrazione da parte degli organi di controllo del decreto di approvazione della presente Convenzione e del relativo impegno di spesa e il ricevimento della lettera di "avvio attività"

II QUOTA: 40% a fronte della valutazione positiva da parte del Dipartimento dei risultati raggiunti e della rendicontazione finanziaria relativa alla prima tranche del finanziamento che dovrà dimostrare l'effettiva spesa sostenuta e il

completo utilizzo della stessa;

III QUOTA: 10% dopo la presentazione della rendicontazione finale di risultato e della rendicontazione finanziaria finale e a fronte della valutazione positiva da parte del Dipartimento.

18 Accredimenti ente gestore

18.1 Precedenti studi e interventi dell'ente gestore

Progetto SMART Search 1 e 2 (Prof. Franco Tagliaro)

Ricerca di composti farmacologicamente attivi e potenzialmente pericolosi in prodotti di libero commercio attraverso l'impiego di spettrometria di massa ad elevata risoluzione.

Anno di attuazione: 2010-2014

Partner nel **Progetto Toxtest** (Prof. Marcello Chiarotti)

Studio sperimentale su sistemi di *drug testing* rapidi.

Anno di attuazione: 2010-2012

Partner nel **Progetto Outcome Comunità** (Prof. Giovanni Pieretti)

Definizione e implementazione di un modello e di un sistema per la valutazione degli esiti dei trattamenti delle comunità terapeutiche.

Anno di attuazione: 2012-2013

ULTERIORI FINANZIAMENTI:

Il Dr. Tagliaro ha ottenuto finanziamenti istituzionali alla ricerca scientifica, tra cui si menziona:

- Progetto Finalizzato CNR "Medicina Preventiva e Riabilitativa", sottoprogetto SP 7 "Tossico-dipendenza" relativamente agli anni 1984 - 1987 (fine del progetto).
- Progetto UNICRI (United Nations Interregional Crime and Justice Research Institute) su "Identification of Toxicological Indicators and Standardization of Metodologies", nell'ambito delle attività su Cocaine Today: Its Effects on the Individual and Society, svoltosi negli anni 1992 - 1993.
- Progetto biennale "Sviluppo di tecnologie a basso costo ed alta produttività per indagini tossicologico-forensi e cliniche", finanziato nell'anno 1994 dalla Regione Veneto nell'ambito della ricerca sanitaria finalizzata.
- Progetto biennale "Sviluppo di metodologie a basso costo ed elevata produttività per ricerche in ambito biomedico e forense", finanziato nell'anno 1997 da Fondazione Cassa di Risparmio di Verona, Vicenza, Belluno e Ancona.
- Progetto biennale "Addotti proteici quali marker di abuso cronico di alcool", finanziato nell'anno 1997 dalla Regione Veneto nell'ambito della ricerca sanitaria finalizzata.
- Progetto biennale "Formazione teorico-pratica sulle tecniche di analisi TOF-MS applicate alle scienze biomediche e forensi", finanziato nell'anno 2006 da Fondazione Cassa di Risparmio di Verona, Vicenza, Belluno e Ancona.
- Progetto "Nuove tecnologie e metodologie tossicologico forensi applicate allo studio dell'associazione tra incidenti stradali e tipologie di uso/abuso alcolico con riguardo particolare alla popolazione giovanile veronese", finanziato nell'anno 2008 da Fondazione Cassa di Risparmio di Verona, Vicenza, Belluno e Ancona.
- Progetti afferenti al cofinanziamento MURST (ex 40%) e PRIN
 - 1999-2001, Applicazioni dell'elettroforesi capillare alle scienze forensi
 - 2001-2003, Nuove applicazioni dell'elettroforesi capillare alle scienze e alla medicina forensi (coordinatore nazionale)
 - 2003-2005, Nuovi markers e nuove tecnologie per l'identificazione oggettiva dell'abuso alcolico in ambito medico legale e clinico (coordinatore nazionale)
 - 2005-2007, Abuso alcolico: nuovi indicatori genetici, fenotipici e metabolici di predisposizione e dipendenza e loro applicazione nella diagnostica clinica e medico legale (coordinatore nazionale)
 - 2007-2009, Applicazioni della spettrometria di massa ad alta risoluzione alla medicina e alle scienze forensi (coordinatore nazionale)

18.2 Pubblicazioni

- 1 Favretto D, Pascali JP, Tagliaro F. New challenges and innovation in forensic toxicology. Focus on the "New Psychoactive Substances". J Chromatogr A. 2012 Dec 29. doi:pri: S0021-9673(12)01936-X. 10.1016/j.chroma.2012.12.049. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23332303.
- 2 Bortolotti F, Trevisan MT, Micciolo R, Canal L, Vandoros A, Palmbach TM, Tagliaro F. Re-assessment of the cut-off levels of Carbohydrate Deficient Transferrin (CDT) for automated immunoassay and multi-capillary electrophoresis for application in a forensic context. Clin Chim Acta. 2013 Feb 1;416:1-4. doi: 10.1016/j.cca.2012.11.015. Epub 2012 Nov 23. PubMed PMID: 23178745.

- 3 Gottardo R, Bertaso A, Pascali J, Sorio D, Musile G, Trapani E, Seri C, Serpelloni G, Tagliaro F. Micellar electrokinetic chromatography: a new simple tool for the analysis of synthetic cannabinoids in herbal blends and for the rapid estimation of their logP values. *J Chromatogr A*. 2012 Dec 7;1267:198-205. doi: 10.1016/j.chroma.2012.08.085. Epub 2012 Sep 13. PubMed PMID: 23022243.
- 4 Merola G, Aturki Z, D'Orazio G, Gottardo R, Macchia T, Tagliaro F, Fanali S. Analysis of synthetic cannabinoids in herbal blends by means of nano-liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 2012 Dec;71:45-53. doi: 10.1016/j.jpba.2012.08.008. Epub 2012 Aug 16. PubMed PMID: 22944357.
- 5 Bortolotti F, Gottardo R, Pascali J, Tagliaro F. Toxicokinetics of cocaine and metabolites: the forensic toxicological approach. *Curr Med Chem*. 2012;19(33):5658-63. PubMed PMID: 22856660.
- 6 Strano-Rossi S, Castrignanò E, Anzillotti L, Serpelloni G, Mollica R, Tagliaro F, Pascali JP, di Stefano D, Sgalla R, Chiarotti M. Evaluation of four oral fluid devices (DDS®, Drugtest 5000®, Drugwipe 5+® and RapidSTAT®) for on-site monitoring drugged driving in comparison with UHPLC-MS/MS analysis. *Forensic Sci Int*. 2012 Sep 10;221(1-3):70-6. doi: 10.1016/j.forsciint.2012.04.003. Epub 2012 May 1. PubMed PMID: 22554872.
- 7 Liotta E, Gottardo R, Seri C, Rimondo C, Miksik I, Serpelloni G, Tagliaro F. Rapid analysis of caffeine in "smart drugs" and "energy drinks" by microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC). *Forensic Sci Int*. 2012 Jul 10;220(1-3):279-83. doi: 10.1016/j.forsciint.2012.03.015. Epub 2012 Apr 11. PubMed PMID: 22497701.
- 8 Gottardo R, Mikšík I, Aturki Z, Sorio D, Seri C, Fanali S, Tagliaro F. Analysis of drugs of forensic interest with capillary zone electrophoresis/time-of-flight mass spectrometry based on the use of non-volatile buffers. *Electrophoresis*. 2012 Feb;33(4):599-606. doi: 10.1002/elps.201100383. PubMed PMID: 22451052.
- 9 Oberacher H, Pitterl F, Siapi E, Steele BR, Letzel T, Grosse S, Poschner B, Tagliaro F, Gottardo R, Chacko SA, Josephs JL. On the inter-instrument and the inter-laboratory transferability of a tandem mass spectral reference library. 3. Focus on ion trap and upfront CID. *J Mass Spectrom*. 2012 Feb;47(2):263-70. doi: 10.1002/jms.2961. PubMed PMID: 22359338.
- 10 Gottardo R, Chiarini A, Dal Prà I, Seri C, Rimondo C, Serpelloni G, Armato U, Tagliaro F. Direct screening of herbal blends for new synthetic cannabinoids by MALDI-TOF MS. *J Mass Spectrom*. 2012 Jan;47(1):141-6. doi: 10.1002/jms.2036. PubMed PMID: 22282100.
- 11 Pascali JP, Bortolotti F, Tagliaro F. Recent advances in the application of CE to forensic sciences, an update over years 2009-2011. *Electrophoresis*. 2012 Jan;33(1):117-26. doi: 10.1002/elps.201100463. Review. PubMed PMID: 22213526.
- 12 Bortolotti F, Del Balzo G, Calza R, Valerio F, Tagliaro F. Testing the specificity of the diatom test: search for false-positives. *Med Sci Law*. 2011;51 Suppl 1:S7-S10. doi: 10.1258/msl.2010.010057. PubMed PMID: 22021634.
- 13 Bortolotti F, Pascali JP, Davis GG, Smith FP, Brissie RM, Tagliaro F. Study of vitreous potassium correlation with time since death in the postmortem range from 2 to 110 hours using capillary ion analysis. *Med Sci Law*. 2011;51 Suppl 1:S20-3. doi: 10.1258/msl.2010.010063. PubMed PMID: 22021629.
- 14 Tagliabracci A, Tagliaro F. Excerpts from 'SIMLA 2009 Ancona'. *Med Sci Law*. 2011;51 Suppl 1:S1. doi: 10.1258/msl.2011.010217. PubMed PMID: 22021625.
- 15 Gottardo R, Fanigliulo A, Sorio D, Liotta E, Bortolotti F, Tagliaro F. Monitoring compliance to therapy during addiction treatments by means of hair analysis for drugs and drug metabolites using capillary zone electrophoresis coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Forensic Sci Int*. 2012 Mar 10;216(1-3):101-7. doi: 10.1016/j.forsciint.2011.09.004. Epub 2011 Sep 25. PubMed PMID: 21945303.
- 16 Pascali JP, Bortolotti F, Sorio D, Ivanova M, Palmbach TM, Tagliaro F. Improved capillary electrophoresis determination of carbohydrate-deficient transferrin including on-line immunosubtraction. *Med Sci Law*. 2011 Jan;51(1):26-31. PubMed PMID: 21595418.
- 17 Tagliaro F, Bortolotti F, Viel G, Ferrara SD. Caveats against an improper use of hair testing to support the diagnosis of chronic excessive alcohol consumption, following the "Consensus" of the Society of Hair Testing 2009 [*Forensic Science International* 196 (2010) 2]. *Forensic Sci Int*. 2011 Apr 15;207(1-3):e69-70; author reply e71. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.10.005. Epub 2010 Oct 28. PubMed PMID: 21035285.
- 18 Merola G, Gentili S, Tagliaro F, Macchia T. Determination of different recreational drugs in hair by HS-SPME and GC/MS. *Anal Bioanal Chem*. 2010 Aug;397(7):2987-95. doi: 10.1007/s00216-010-3882-6. Epub 2010 Jun 27. PubMed PMID: 20582406.
- 19 Aturki Z, D'Orazio G, Rocco A, Bortolotti F, Gottardo R, Tagliaro F, Fanali S. CEC-ESI ion trap MS of multiple drugs of abuse. *Electrophoresis*. 2010 Apr;31(7):1256-63. doi: 10.1002/elps.200900629. PubMed PMID: 20209571.
- 20 Pascali JP, Sorio D, Bortolotti F, Tagliaro F. Rapid determination of lithium in serum samples by capillary electrophoresis.

- Anal Bioanal Chem. 2010 Apr;396(7):2543-6. doi: 10.1007/s00216-010-3537-7. Epub 2010 Feb 24. PubMed PMID: 20179911.
- 21 Tagliaro F, Pascali J, Fanigliulo A, Bortolotti F. Recent advances in the application of CE to forensic sciences: a update over years 2007-2009. *Electrophoresis*. 2010 Jan;31(1):251-9. doi: 10.1002/elps.200900482. Review. PubMed PMID: 19950357.
- 22 Liotta E, Gottardo R, Bonizzato L, Pascali JP, Bertaso A, Tagliaro F. Rapid and direct determination of creatinine in urine using capillary zone electrophoresis. *Clin Chim Acta*. 2009 Nov;409(1-2):52-5. doi: 10.1016/j.cca.2009.08.015. Epub 2009 Aug 29. PubMed PMID: 19720057.
- 23 Apostoli P, De Palma G, Catalani S, Bortolotti F, Tagliaro F. Multielemental analysis of tissues from Cangrande della Scala, Prince of Verona, in the 14th century. *J Anal Toxicol*. 2009 Jul-Aug;33(6):322-7. PubMed PMID: 19653935.
- 24 Pascali JP, Liotta E, Gottardo R, Bortolotti F, Tagliaro F. Rapid optimized separation of bromide in serum samples with capillary zone electrophoresis by using glycerol as additive to the background electrolyte. *J Chromatogr A*. 2009 Apr 10;1216(15):3349-52. doi: 10.1016/j.chroma.2009.01.078. Epub 2009 Jan 29. PubMed PMID: 19211104.
- 25 Aturki Z, D'Orazio G, Fanali S, Rocco A, Bortolotti F, Gottardo R, Tagliaro F. Capillary electrochromatographic separation of illicit drugs employing a cyano stationary phase. *J Chromatogr A*. 2009 Apr 24;1216(17):3652-9. doi: 10.1016/j.chroma.2008.12.041. Epub 2008 Dec 25. PubMed PMID: 19144341.
- 26 Gottardo R, Poletini A, Sorio D, Pascali JP, Bortolotti F, Liotta E, Tagliaro F. Capillary zone electrophoresis (CZE) coupled to time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) applied to the analysis of illicit and controlled drugs in blood. *Electrophoresis*. 2008 Oct;29(19):4078-87. doi: 10.1002/elps.200800087. PubMed PMID: 18958878.
- 27 Tagliaro F, Bortolotti F. Criticism to the article: "Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method". Authors: J.O Jeppsson et al. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45(4):558-562. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(5):725-6; author reply 727-8. PubMed PMID: 18839475.
- 28 Cristoni S, Crotti S, Zingaro L, Bernardi LR, Gottardo R, Politi L, Poletini A, Tagliaro F. On the coupling of ion-exchange chromatography to surface-activated chemical ionization in the analysis of highly polar metabolites in diluted urine samples. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2008 Jul;22(13):2134-8. doi: 10.1002/rcm.3590. PubMed PMID: 18523975.
- 29 Rainio J, De Giorgio F, Bortolotti F, Tagliaro F. Objective post-mortem diagnosis of chronic alcohol abuse--a review of studies on new markers. *Leg Med (Tokyo)*. 2008 Sep;10(5):229-35. doi: 10.1016/j.legalmed.2008.01.006. Epub 2008 Apr 1. Review. PubMed PMID: 18381246.
- 30 Poletini A, Gottardo R, Pascali JP, Tagliaro F. Implementation and performance evaluation of a database of chemical formulas for the screening of pharmaco/toxicologically relevant compounds in biological samples using electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*. 2008 Apr 15;80(8):3050-7. doi: 10.1021/ac800071n. Epub 2008 Mar 13. PubMed PMID: 18336013.
- 31 Tagliaro F, Bortolotti F. Recent advances in the applications of CE to forensic sciences (2005-2007). *Electrophoresis*. 2008 Jan;29(1):260-8. Review. PubMed PMID: 18058765.