

НОВЫЙ ПОДХОД К ДИАГНОСТИКЕ НАРКОМАНИИ И ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАРКОТИКОВ, ПСИХОТРОПНЫХ ВЕЩЕСТВ И АНТИТЕЛ К НИМ

*Мяжкова М.А., Копоров Д.С., Морозова В.И, Паршин А.Н.,
Абраменко Т.В., Панченко О.Н.*

В настоящее время в России, по данным МЗ РФ, около 7 миллионов человек в той или иной степени связаны с употреблением наркотиков. Существующее положение требует комплекса мер, направленных на решение этой проблемы. Одним из направлений является создание новых методов анализа для выявления лиц, злоупотребляющих наркотическими препаратами. Актуальной задачей медицинской диагностики является разработка высокочувствительных и специфичных методов анализа наркотических веществ в биологических жидкостях организма.

Установить факт злоупотребления наркотиками достаточно сложно, если человека не поймали во время процедуры его приема (инъекции, курение). Существует ряд особых клинических признаков, отмеченных в опыте наркологической практики, на основании которых человека можно отнести к категории наркоманов. Однако очень часто яркая клиническая картина проявляется лишь на поздних стадиях заболевания, когда стойкое пристрастие к наркотикам уже сформировалось, и человек нуждается в серьезном длительном лечении. Очень важно прекратить прием наркотиков как можно раньше, пока болезнь еще не приняла необратимый характер. Для выявления факта употребления наркотических препаратов на ранней стадии учеными разработаны иммунохимические методы диагностики, позволяющие обнаружить в организме человека их присутствие даже при полном выведении следовых количеств метаболитов наркотических веществ.

Хорошо известно, что наиболее широкое распространение в мировой практике для диагностики наркомании получили иммунохимические способы определения наркотических веществ. К ним относятся: гомогенный иммуноферментный, иммунофлуоресцентный, радиоиммунный анализы. В лаборатории иммунохимии ИФАВ РАН создана технология производства различных вариантов тест-систем для определения наиболее распространенных классов наркотиков: опиатов, каннабиноидов, барбитуратов, эфедрона и др., основанная на твердофазном иммуноферментном методе анализа (ИФА) [1,2,3,4]. Основной реагент – антитела к каждой из перечисленных групп веществ получали иммунизацией кроликов конъюгированными антигенами, синтезированными методом смешанных ангидридов из модифицированного производного наркотического соединения, содержащего спейсер со свободной карбоксильной группой и белка (БСА). Из иммунной кроличьей сыворотки с титром антител на гаптен не менее 1:6000 выделяли γ -глобулиновую фракцию и изучали ингибиторным ИФА специфичность содержащихся в ней антител. Установили, что полученные антитела обладают высокой степенью специфичности только для соединений, родственных анализируемой группе веществ (опиаты, каннабиноиды, барбитураты и эфедрон) и не дают перекрестных реакций с лекарственными соединениями других классов.

Технические параметры и характеристики предлагаемого метода анализа наркотических веществ: один набор реагентов рассчитан на проведение 36 определений. Набор укомплектован таким образом, что можно одновременно проводить 6, 12, 18 или 36 анализов в день. В состав набора входят все необходимые ингредиенты для проведения иммуноферментного анализа: антигены для иммобилизации на полистирольный планшет, специфические антитела к наркотикам, меченые пероксидазой из корня хрена, калибровочный материал, буферные растворы. Время проведения анализа 2,5-3 часа. Чувствительность метода составляет 300 нг/мл для опиатов и барбитуратов, а в случае каннабиноидов и эфедрона равна 100 нг/мл и 1 мкг/мл, соответственно. Коэффициент вариации при постановке анализа одной серией наборов не более 10%. Учет результатов производится на одно (много) канальном фотометре с вертикальным ходом луча при длине волны 492 нм. Срок годности набора реагентов не менее 6 месяцев при температуре хранения 7-8° С.

С помощью предлагаемого набора реагентов можно выявлять опиаты (морфин, героин, кодеин), барбитураты, каннабиноиды (марихуана, гашиш) и производные эфедрона в присутствии других классов наркотических веществ без предварительной обработки исследуемых образцов. Объектом анализа является биологическая жидкость или поверхностные смывы, а также экстракты, полученные из волос людей, подозреваемых в употреблении наркотиков.

В настоящее время разработаны и экспериментально апробированы новые методы определения наркотических веществ на основе использования полимерных носителей, латексных микросфер, макропористых пленок различной структуры. На основании большого практического опыта по созданию диагностикумов, сотрудниками лаборатории ИФАВ РАН выполнено комплексное исследование по разработке методов экспресс-анализа опиатов, барбитуратов, эфедрона на основе реакции латексной агглютинации [5,6], которые можно применить в полевых условиях при отсутствии специального оборудования и без предварительной подготовки анализируемого образца. Время анализа составляет 2-3 минуты, а чувствительность соответствует указанной выше.

Все перечисленные методы анализа, используемые для диагностики наркомании, основаны на определении в биологической жидкости человека продуктов метаболизма употребляемого наркотического препарата. Такой подход к диагностике наркомании имеет существенный недостаток, поскольку позволяет диагностировать наркотическую интоксикацию только в течение 24-48 часов с момента принятия препарата. Этот факт связан с быстрым выведением из организма наркотических соединений.

Нами разработан новый метод анализа, позволяющий диагностировать наркотическую зависимость от препаратов опия, эфедрона, марихуаны в более отдаленные сроки после последнего приема наркотика, т.е. уже в отсутствие препарата и его метаболитов в биологической жидкости организма [7,8]. Метод прост в исполнении и его реализация основана на проведении основных стадий твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА): 1) сорбция антигена на полистирольный планшет; 2) нанесение анализируемых образцов; 3) выявление образовавшихся иммунных комплексов с помощью антивидовых антител с последующим проявлением ферментативной реакции. Далее проводят учет результатов, измеряя оптическую плотность при длине волны 492 нм на спектрофотометре с вертикальным ходом луча.

С целью достижения необходимых параметров разрабатываемых иммунохимических тест-систем на первом этапе проведены исследования, направленные на получение высокоспецифических реагентов, являющихся основой получения конъюгированных антигенов для иммуноферментного анализа (ИФА) и последующей наработки иммуноспецифических субстанций. Осуществлен синтез реакционно-способных иммунохимических реагентов - конъюгированных антигенов опиатов, барбитуратов и каннабиноидов для их дальнейшей иммобилизации на твердой фазе. На основе современных физико-химических методов анализа соединений разработаны новые подходы, позволяющие унифицировать процесс получения конъюгатов этих групп наркотиков с использованием различных макромолекулярных носителей. Исследованы способы получения и очистки конъюгатов наркотиков с белками на основе производного морфина, Δ^9 -тетраканнабинола и барбитуровой кислоты, содержащие спейсер от 4 до 6 метиленовых групп. Установлено, что наиболее активными являются конъюгаты производных наркотиков, содержащие в качестве спейсера аминокaproновую кислоту. Приготовлены для ИФА комплексы указанных веществ, ковалентно связанных как с белками, так и полимерами. В качестве эпитопа для связывания с антителами макромолекулярные носители содержали опиаты, каннабиноиды и барбитамил в соотношениях 10:1, 12:1 и 16:1, соответственно. На основе полученных реагентов осуществлена разработка методов иммуноферментного анализа для данной конкретной задачи – определения антител к опиатам, барбитуратам, каннабиноидам в сыворотке крови больных и доноров. Исследованы и определены условия оптимального взаимодействия приготовленных конъюгированных антигенов с антителами, присутствующими в сыворотке крови человека, что позволило установить статистически достоверные различия в уровнях иммуноглобулинов различных классов. Определены разведения анализируемой сыворотки и концентрации антигена, при которых сводятся к минимуму побочные эффекты взаимодействия сывороточных белков с различными модельными антигенами. На втором этапе работы выполнено сравнительное исследование содержания антител к опиатам, каннабиноидам и барбитуратам в сыворотке крови доноров и больных наркоманией. Установлено повышение уровня антител к указанным антигенам в сыворотке крови больных наркоманией на первой стадии заболевания. В результате расширенной клинической апробации разработанного варианта ИФА в наркодиспансере показана возможность использования разработанной методики для установления факта приема наркотиков на ранних стадиях при отсутствии клинических признаков.

Проведенные сравнительные исследования в группах больных наркоманией, здоровых лиц, больных алкоголизмом, инфекционными заболеваниями, показали высокую достоверность разработанного способа диагностики.

Основное преимущество нового подхода заключается в возможности объективно подтвердить факт хронического употребления наркотических веществ спустя 2-4 месяца с момента их последнего попадания в организм человека.

Данный метод может быть рекомендован при массовых обследованиях населения для выявления скрытой формы наркомании в отсутствии клинических признаков заболевания, а также для определения профессиональной пригодности людей, выполняющих особо важную работу, связанную с риском.

Кроме того, этот метод может быть рекомендован в качестве дополнительного теста для объективизации клинической оценки эффективности проводимой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мягкова М.А., Лушникова М.В. // Хим. - фарм. Журнал. – 1990. – № 6. – с. 76-82.
2. Мягкова М.А., Лушникова М.В., Полевая О.Ю. // Хим. - фарм. Журнал. – 1992. – № 7-8. – с. 101-103.
3. Мягкова М.А., Даньков Ю.В., Полевая О.Ю. и др. // Суд.- Мед. Экспертиза. – 1993. – № 1.– с. 39-42.
4. Мягкова М.А., Лушникова М.В., Полевая О.Ю. и др. // Суд. - Мед. Экспертиза. – 1990. – № 3. – с. 30-32.
5. Мягкова М.А., Запольская Е.К., Эмирова Т.Л. // Вопросы наркологии. – 1994. – № 2. – с. 58-62.
6. Мягкова М.А., Запольская Е.Б., Грицкова И.А. и др. // Суд.- Мед. Экспертиза. –1994. – т. 37. - № 3. – с. 23-25.
7. Мягкова М.А., Савицкая Ю.А., Трубачева Ж.Н. // Терап. Архив. – 1998. – № 4. – с.43-45.
8. Мягкова М.А., Брюн Е.А., Копоров С.Г. и др. // Суд. – Мед. Эспертиза. – 2001. – № 1. – с.18-20.