

УДК 615.9:57.08

©Коллектив авторов

## ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ АУТОАНТИТЕЛ К ОПИАТНЫМ РЕЦЕПТОРАМ В КРОВИ БОЛЬНЫХ ОПИЙНОЙ НАРКОМАНИЕЙ.

Е.Р.БЫЧКОВ<sup>1</sup>, В.В.ВОСТРИКОВ<sup>2</sup>, Е.М.КРУПИЦКИЙ<sup>3</sup>, Г.Ф.КАРАНДАШОВА<sup>3</sup>,  
А.Я.ГРИНЕНКО<sup>4</sup>, С.А.ДАМБИНОВА<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Институт мозга человека РАН, 197376 Санкт-Петербург; ул. акад. Павлова, 9,  
факс (812)-234-32-47 Эл. почта: rsn@brain.nw.ru

<sup>2</sup>Ленинградский областной наркологический диспансер,  
Ленинградская область, п. Ново-Девяткино 19/1

<sup>3</sup>Региональный научно-исследовательский центр наркологии и  
психофармакологии при СПбГМУ им. И.П.Павлова, Санкт-Петербург,  
ул.Л.Толстого, 6/8, эл. почта: kru@ek3506.spb.edu

<sup>4</sup>Кафедра наркологии СПб МАПО, Санкт-Петербург, ул. Кировная, 41

Исследовали содержание аутоантител к опиатным рецепторам в сыворотке крови больных опийной наркоманией. Уровень аутоантител к опиатным рецепторам оценивали методом иммуноферментного анализа с синтетическим пептидным фрагментом, соответствующим общей аминокислотной последовательности для  $\mu$  и  $\delta$  опиатных рецепторов. Увеличение уровня аутоантител выше 150% обнаружено у 56% больных опийной наркоманией. Показана зависимость содержания аутоантител от продолжительности заболевания. Повышенный уровень аутоантител к опиатным рецепторам определялся у 71% наркоманов с длительностью заболевания более 1 года. Высокий уровень аутоантител выявлялся более часто при абстинентном синдроме, чем у больных в течение ремиссии. Повышенный уровень аутоантител к опиатным рецепторам обнаружен только у 38% наркоманов с продолжительностью ремиссии 3-8 месяцев. Таким образом, этот показатель может быть использован для диагностики и объективизации состояния больных опийной наркоманией.

**Ключевые слова:** аутоантитела, опиатные рецепторы, опийная наркомания

**ВВЕДЕНИЕ.** Проявление злоупотребления наркотическими веществами часто не имеет специфических черт и может быть принято за проявление соматических или психических заболеваний, к тому же больные нередко скрывают употребление наркотиков [1]. В связи с этим наличие объективных лабораторных тестов значительно упростило бы диагностику и создало бы возможность для широкого скрининга населения. В настоящее время

лабораторная диагностика наркомании основана на количественном определении присутствия наркотического средства в волосах, крови и других биологических жидкостях организма. Наиболее часто используются методы, основанные на иммунологическом и масс-спектроскопическом определении наркотиков в биологических жидкостях [2,3]. Однако токсикологическая экспертиза биологических жидкостей свидетельствует только об однократном применении наркотического вещества, а определение наркотиков в волосах, свидетельствующее о хронической интоксикации, требует дорогостоящего оборудования.

Другим методом, позволяющим объективизировать состояние длительной интоксикации у пациента, является иммунологическая диагностика, основанная на определении антител к наркотическим препаратам в крови. Разработан метод диагностики опийной наркомании на основе выявления в сыворотке крови антител к морфину, повышенный уровень которых определяется у 50% больных опийной наркоманией и сохраняется повышенным в течение 2 месяцев после отмены наркотика [4].

В лаборатории молекулярной нейробиологии Института мозга человека был предложен новый принцип диагностики опийной наркомании, основанный на определении аутоантител к опиатным рецепторам мозга в сыворотке крови пациентов [5]. Установлено, что в процессах развития зависимости и толерантности к морфину и героину участвуют  $\mu$  и  $\delta$  опиатные рецепторы [6,7]. Предполагается, что опийная зависимость связана с увеличением числа опиатных рецепторов, участвующих в процессах положительного подкрепления в мозге. Показано, что при хроническом введении опиатов увеличивается количество  $\mu$  и  $\delta$  опиатных рецепторов в стриатуме, ядрах гипоталамуса и миндалинах [8-10]. Возможно, что постоянный избыточный синтез и разрушение нейрорецепторов приводят к образованию фрагментов опиатных рецепторов, которые, попадая в кровоток, вызывают развитие иммунного ответа по типу: антиген-антитело.

Предварительные клинические исследования показали связь между уровнем аутоантител (УАА) к опиатному рецептору, выделенному из мозга человека, и степенью выраженности опийной зависимости [5]. Однако использование белкового фрагмента в качестве антигена в иммуноферментном анализе представляет определенные трудности (в частности - выделение и очистка опиатного рецептора из мозга человека, стандартизация метода). Поэтому в качестве антигена целесообразно использовать синтетический пептид, обладающий антигенными детерминантами опиатных рецепторов.

В настоящей работе в качестве антигенной детерминанты была использована аминокислотная последовательность консервативного цитоплазматического участка общего для  $\mu$  (259-281 а. к.) и  $\delta$  (238-259 а.к.) опиатных рецепторов человека длиной 23 аминокислоты, которая была рассчитана на основе индекса гидрофильности / гидрофобности [11,12].

Таким образом, целью работы явилось исследование УАА к синтетическому пептидному фрагменту  $\mu$  и  $\delta$  опиатных рецепторов в крови больных опийной наркоманией.

**МЕТОДИКА.** УАА к опиатным рецепторам определяли в сыворотке крови 71 мужчины, страдающих опийной наркоманией с различной степенью зависимости от наркотика. Возраст обследованных составлял 16-27 лет. В процессе обследования больные были разделены на несколько групп в зависимости от тяжести и длительности заболевания. Первую группу составили



больные, злоупотребляющие опиатами без физической зависимости, с частотой приема наркотиков 2-4 раза в месяц (10 человек). Вторая группа - больные опийной наркоманией с выраженной психической и физической зависимостью от опиатов, прекратившие употребление наркотика несколько дней назад и находящиеся в состоянии абстинентного синдрома (53 человека). Третью группу составили больные опийной наркоманией, находящиеся в ремиссии и не принимающие опиаты в течение 3-8 месяцев (8 человек). Контрольную группу составили 24 здоровых мужчины в возрасте 20-30 лет, не употребляющие наркотические вещества и седативные препараты. У всех испытуемых забор крови проводили из локтевой вены утром, натощак. Кровь центрифугировали при комнатной температуре и полученную сыворотку хранили до анализа при температуре -20°C -70°C (не более 6 месяцев).

Иммуноферментный анализ УАА к синтетическому пептидному фрагменту опиатных рецепторов проводили на иммунологических планшетах высокой сорбционной емкости «Biohit». Анализ осуществляли по следующей методике [13]. Синтетический пептидный фрагмент  $\mu$ - $\delta$  опиатного рецептора наносили в количестве 0,5 мкг на ячейку в фосфатном буфере и инкубировали при комнатной температуре в течение 24 ч. После трех промывок фосфатным буфером, содержащем 0,05% Твин-20, 200 мкл по 10 мин планшет инкубировали с сыворотками крови - 100 мкл в течение 1 часа на шейкере. При анализе сыворотку крови разводили в фосфатном буфере с 0,05% Твин-20 в соотношении 1:50. После трех промывок фосфатным буфером с 0,05% Твин-20 наносили вторые антитела к иммуноглобулинам G в объеме 100 мкл, конъюгированные с пероксидазой хрена, и инкубировали в течение 1 часа на шейкере. Оптимальное разведение вторых антител определяли опытным путем; обычно оно составляло 1:10000 - 1:30000. После окончания инкубации планшет промывали фосфатным буфером с 0,05% Твин-20 три раза по 10 мин в объеме 200 мкл. Для развития окраски на планшет наносили по 100 мкл раствора *орто*-фенилендиамина (0,5 мг/мл) на 0,05 М фосфат-цитратном буфере (pH 5,0), содержащем 0,014% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и инкубировали в течение 20 мин в темноте. Развитие окраски останавливали добавлением 30 мкл 50%-ной серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 490 нм с использованием многоканального спектрофотометра «Dinatech».

Синтетический пептид, соответствующий аминокислотной последовательности консервативного цитоплазматического участка общего для  $\mu$  (259-281 а. к.) и  $\delta$  (238-259 а.к.) опиатных рецепторов человека, был получен методом твердофазного синтеза в *Genemed Biotechnologies, Inc.* (США). Чистота пептида варьировала от 90 до 98 %.

Для оценки статистической достоверности межгрупповых различий использовали t-критерий Стьюдента. При статистической оценке данных ориентировались на уровень значимости  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** При определении УАА к синтетическому пептидному фрагменту  $\mu$  и  $\delta$  опиатных рецепторов в крови 71 больного опийной наркоманией установлен широкий размах этого показателя (от 43% до 300% по отношению к средней величине этого показателя у здоровых лиц, принятой за 100%). В связи со значительной межиндивидуальной вариабельностью УАА к опиатному рецептору, результаты исследований были проанализированы с учетом тяжести и длительности заболевания, динамики абстинентного синдрома и продолжительности ремиссии.

В таблице 1 представлены результаты исследования УАА к опиатным рецепторам в крови пациентов со злоупотреблением опиатами без явлений зависимости, больных опийной наркоманией и здоровых лиц. Наиболее высокие значения УАА к опиатным рецепторам ( $171,1 \pm 8,1\%$ ) обнаружены в крови больных опийной наркоманией, поступивших в клинику с выраженными проявлениями абстинентного синдрома. Этот показатель был достоверно выше у наркоманов, чем у лиц контрольной группы ( $p < 0,001$ ). УАА к опиатному рецептору более 150% определялся при опийной наркомании у 56%, при злоупотреблении опиатами у 30%, а в контрольной группе - только у 4% обследованных. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что УАА к опиатному рецептору зависит от степени тяжести заболевания, причем повышение УАА более 150% характерно для опийной наркомании и крайне редко встречается у здоровых лиц.

Таблица 1. Уровень аутоантител к опиатным рецепторам у больных опийной наркоманией с различной степенью заболевания.

Группы обследованных	УАА к опиатному рецептору	Всего обслед.	Число обследованных			
			УАА < 150%		УАА > 150%	
			абс.	%	абс.	%
1. Здоровые лица	$100,3 \pm 7,3$	24	23	(96%)	1	(4%)
2. Злоупотребление опиатами	$140,6 \pm 20,2$	10	7	(70%)	3	(30%)
3. Опийная наркомания в целом	$171,1 \pm 8,1^*$	53	23	(44%)	30	(56%)

Примечание: \*Значимость различий между показателями 1-3 группы  $p < 0,001$  (по критерию t Стьюдента). Здесь и далее приведен процент числа обследованных.

Уровень аутоантител к опиатному рецептору также зависит от длительности заболевания (табл. 2). Повышение УАА к опиатному рецептору более 150% было выявлено у 71% наркоманов с продолжительностью заболевания более 1 года и только у 47% больных с длительностью опийной наркомании до 1 года. Причиной более высокого УАА у лиц с более тяжелым и длительным течением заболевания, по-видимому, является развитие выраженных нейродегенеративных изменений в опиатергических системах мозга.

Таблица 2. Уровень аутоантител к опиатным рецепторам у больных опийной наркоманией с различной длительностью заболевания.

Группы обследованных	УАА к опиатному рецептору $X \pm m$	Всего (абс.)	Число обследованных			
			УАА < 150%		УАА > 150%	
			абс.	%	абс.	%
1. Опийная наркомания до 1 года	$159,7 \pm 10,6$	32	17	53	15	47
2. Опийная наркомания свыше 1 года	$188,5 \pm 11,5$	21	6	29	15	71
3. Опийная наркомания в целом	$171,1 \pm 8,1$	53	23	44	30	56



Как показали результаты исследований, на разных сроках развития абстинентного синдрома после отмены опиатов не выявлено существенных изменений УАА к опиатному рецептору. Его средняя величина колебалась в пределах от 183,9% до 174,9% (рис.). Однако у ряда больных выявляется незначительная тенденция к снижению УАА к опиатным рецепторам по мере купирования абстинентного синдрома. Отмечено отсутствие корреляции между тяжестью абстинентного синдрома и динамикой УАА к опиатным рецепторам в течение месяца после отмены наркотика, то есть на начальном этапе ремиссии.

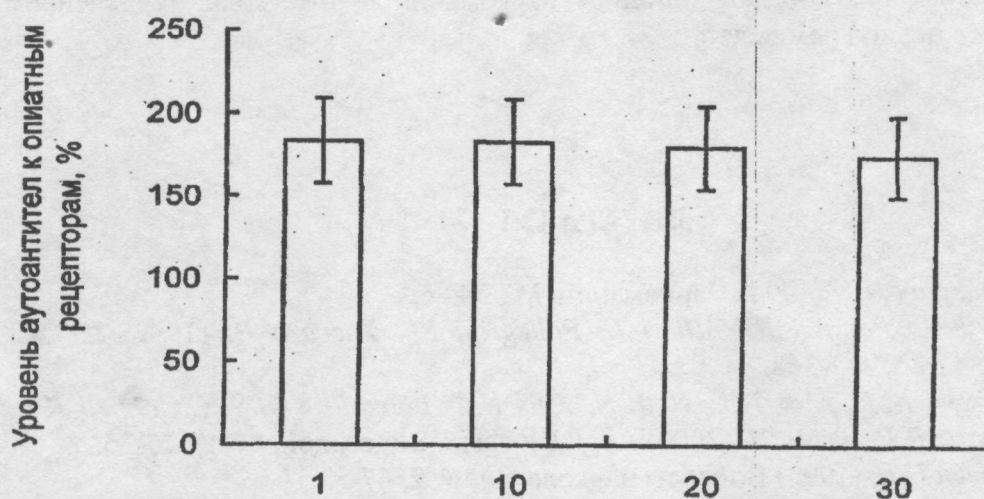


Рисунок.

Уровень аутоантител к опиатным рецепторам в сыворотке крови больных опийной наркоманией в течение абстинентного синдрома.

Установлено снижение УАА к опиатным рецепторам в крови больных опийной наркоманией в зависимости от продолжительности ремиссии (табл. 3). В первые два месяца ремиссии уровень аутоантител к опиатному рецептору менее 150% был выявлен только у 36% наркоманов, в то время как через 3-8 месяцев после отмены наркотика аналогичный уровень отмечался у 62% больных. Хотя средний УАА у больных через 3-8 месяцев после отмены наркотиков и снижался до  $139,9 \pm 10,0\%$ , однако он не достигал нормальных значений и был повышен по сравнению с аналогичным показателем в группе здоровых лиц ( $p < 0,05$ ).

Таблица 3. Уровень аутоантител к опиатным рецепторам у больных опийной наркоманией с различной длительностью ремиссии.

Группы обследованных	Величина УАА к опиатному рецептору	Всего (абс.)	Число обследованных			
			УАА < 150%		УАА > 150%	
			абс	%	абс	%
1. Здоровые лица	$100,3 \pm 7,3$	24	23	(96%)	1	(4%)
2. Длительность ремиссии 1-2 месяца	$168,9 \pm 13,9^*$	14	5	(36%)	9	(64%)
3. Длительность ремиссии 3-8 месяцев	$139,9 \pm 10,0^{**}$	8	5	(62%)	3	(38%)

Примечание: \* Значимость различий между показателями 1-2 группы ( $p < 0,001$ )

\*\* Значимость различий между показателями 1-3 группы ( $p < 0,05$ )

Представленные выше данные свидетельствуют об увеличении УАА к опиатным рецепторам у больных опишной наркоманией по сравнению с группой здоровых лиц. Повышение УАА к опиатному рецептору более 150% можно рассматривать как достаточно достоверный критерий наркотической зависимости от опиатов. Достоверность предлагаемого показателя достигала 71% и четко коррелировала с тяжестью, длительностью заболевания и продолжительностью ремиссии. Таким образом, накопление аутоантител в крови у наркоманов является новым иммунологическим показателем, способным существенно облегчить объективизацию диагностики опишной наркомании и контроль за течением заболевания в период ремиссии.

#### ЛИТЕРАТУРА.

1. Пятницкая И.Н. (1994) Наркомании. М., 544 с.
2. Pichini S., Pacifici R., Altieri I., Pellegrini M., Zuccaro P. (1999) J. Anal Toxicol., 23, 343-348.
3. Eldefrawi M.E., Azer N.L., Nath N., Anis N.A., Bangalore M.S., O'Connell K.P., Schwartz R.P., Wright J. (2000) Appl. Biochem. Biotechnol., 87(1), 25-35.
4. Гамалея Н.Б. (1994) Вопросы наркологии, № 2, 47-53.
5. Изыкенова Г.А., Суренко В.В., Дамбинова С.А. (1995) Вопросы наркологии, №1, 45-49
6. Иванец Н.Н., Анохина И.П., Стрелец Н.В. (1997) Журнал Неврологии и Психиатрии им. С.С.Корсакова, №9, 4-11.
7. Shippenberg T.S.; Elmer G.I (1998) Crit Rev Neurobiol., 12(4), 267-303.
8. Brady L. S., Herkenham M., Long J. B., Rothman R. B. (1989) Brain Res., 477, 382-386.
9. Rothman R.B., Long J.B., Bykov V., Xu H., Jacobson A.E., Rice K.C., Holaday J.W. (1991) Peptides, 12, 151-160.
10. Yoburn B. C.; Billings B.; Duttaroy A. (1993) J. Pharmacol. Exp. Ther., 265, 314 -320.
11. Hopp T.P., Woods K.R. (1981) Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 6, 3824-3828.
12. Welling G.W., Weijer W.J., van der Zee R., Welling-Wester S. (1985) FEBS Lett., 188, 215-218
13. Ngo T.T., Lenhoff H.M. (1980) Anal. Biochem., 105, 389-397

Поступила 27.02.01



**THE STUDY OF THE LEVEL OF AUTOANTIBODIES  
TO OPIATE RECEPTORS IN THE BLOOD  
OF HEROIN ADDICTS.**

**E.R.BYCHKOV<sup>1</sup>, V.V.VOSTRIKOV<sup>2</sup>, E.M.KRUPITSKY<sup>3</sup>,  
G.F. KRANDASHOVA<sup>3</sup>, A.YA.GRINENKO<sup>4</sup>,  
S.A.DAMBINOVA<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Institute of the Human Brain, 197376 St.Petersburg, Acad. Pavlova str., 9, fax (812)-234-3247,  
E-mail: rsn@brain.nw.ru

<sup>2</sup>Leninigrad Regional Dispensary of Narcology, Novo-Deviatkino 19/1, Leningrad Region  
188661, Russia

<sup>3</sup>St. Petersburg Regional Scientific-Research Center for Research in Addiction and  
Psychopharmacology, St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Tolstoy str., 6/8  
E-mail: kru@ek3506.spb.edu

<sup>4</sup>Department of Narcology, St. Petersburg Medical Academy of Postgraduate Education,  
St.Petersburg, Kirochnaya str., 41

The level of autoantibodies to opiate receptors was measured in serum of heroin addicts in withdrawal and in the period of long-term abstinence and in healthy volunteers as well. The level of autoantibodies was assessed with ELISA with synthetic peptide specific for subregions of mu and delta opiate receptors. The scores of the level of autoantibodies higher than 150% of the level noted in healthy volunteers was observed in 56% of heroin addicts. The dependence of autoantibodies level from duration of diseases was shown. Elevated level of opiate receptors autoantibodies were detected in the sera of 71% patients with opiate addiction who had been using heroin more than one year. High levels of opiate receptors autoantibodies were observed more frequently in patients with opiate withdrawal syndrome than in patients with long-term remission. Elevated level autoantibodies to opiate receptors were determined in the blood of 38% opiate abusers with remission for 3-8 months. The level of autoantibodies to opiate receptors may be used for diagnostics of heroin dependence and control of treatment efficiency.

**Keywords:** autoantibodies, opiate receptors, opiate abuse