

ЛАТЕКСНЫЕ МИКРОСФЕРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОРФИНА В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ЧЕЛОВЕКА

Н.М. Солодухина, аспирант, *Т.В. Абраменко, старший научный сотрудник,

*М.А. Мяжкова, профессор, И.А. Грицкова, профессор

кафедра Химии и технологии высокомолекулярных веществ им. С.С. Медведева

МИТХТ им. М.В. Ломоносова

*Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка

e-mail: naaya@mail.ru

Разработана и апробирована диагностическая тест-система полимерная микросфера – биолиганд для качественного и полуквантитативного определения морфина в физиологической жидкости человека с помощью метода латексной агглютинации. Метод позволяет быстро (3-5 минут), надежно и с минимальными затратами реагентов определить наличие морфина в моче человека.

A new diagnostic test-system based on the polymer microsphere – bioligand was developed for qualitative and semiquantitative analysis of morphine in human physiologic liquids by the latex agglutination method. The new reliable and quick method of analysis enables detecting morphine in human urine within 3–5 minutes without using any laboratory devices.

Ключевые слова: латексная агглютинация, полистирольные микросферы, морфин, методы диагностики опиатов в моче человека.

Key words: latex agglutination, polystyrene microspheres, morphine, techniques for diagnostics of opiates in human urine.

Для выявления наркотических веществ, в том числе опиатов, используют широкий набор методов. Среди них наиболее важное место занимают методы иммуноанализа, такие как иммунохроматографический анализ, иммуноферментный анализ, а также методы на основе хроматографических исследований, например, флуоресцентно-поляризационный иммуноанализ (ФПИА) [1], метод тонкослойной хроматографии [2].

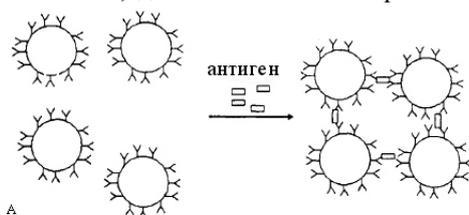
В последние годы для анализа наркотических веществ в крови и других физиологических жидкостях человека все более широкое применение находят иммунные методы [3–8], основанные на специфическом взаимодействии антигена с антителами.

Потребность в простом методе, основанном на визуальной детекции результата без необходимости использовать меченные золотом частицы, привела к возрождению интереса современных ученых к тест-системам, основанным на реакции латексной агглютинации.

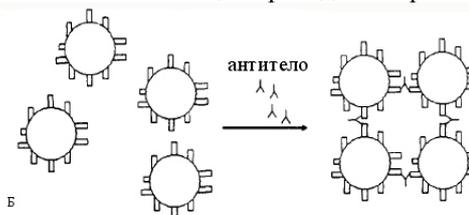
Метод иммунолатексной агглютинации, распространенный в 1970-х и в начале 1980-х годов, в частности, для выявления поверхност-

ного антигена вируса гепатита В (например, препарат «Latex-НАА-reagent» фирмы Pfizer, Behringwerke), был впоследствии почти полностью вытеснен из практики работы лабораторий из-за наличия значительного количества ложноположительных результатов, а также из-за массового внедрения иммуно-ферментного анализа. В настоящее время вновь возник интерес к данному методу [9–12], что, прежде всего, связано с появлением полимерных микросфер разной природы и размера, использование которых позволило снизить уровень неспецифических реакций, а также показать возможность получения диагностикумов с высокой чувствительностью в сочетании с оперативностью и простотой в проведении анализа.

Принцип работы диагностических тест-систем, основанных на методе иммунолатексной агглютинации, заключается в протекании высокоспецифичной иммунохимической реакции между антигеном и антителом. Антиген или антитело предварительно иммобилизуется на полимерный носитель. Схема прямой латексной агглютинации приведена на рис. 1.



Агглютинация полимерных частиц, на которые иммобилизованы антитела, с молекулами низкомолекулярного антигена.



Агглютинация полимерных частиц, на которые иммобилизован антиген, с молекулами антител.

Рис. 1. Схема протекания прямой латексной агглютинации.

В результате протекания реакции латексной агглютинации образуются комплексы, размеры

которых во много раз больше размеров исходных полимерных частиц. Наличие этих комплексов в растворе может быть зарегистрировано различными методами, например методом спектрофотометрии, нефелометрии или простым визуальным наблюдением.

Метод определения опиатов, основанный на системе полимерная микросфера – биолиганд, имеет ряд особенностей и преимуществ. Среди преимуществ метода латексной агглютинации можно указать следующие:

- Оперативность. Позволяет быстро, всего за 5-10 минут провести полуколичественное определение морфина в физиологической жидкости человека.
- Низкая стоимость исследования. Не требует дорогостоящего и громоздкого оборудования. Тест возможно проводить в полевых условиях.
- Тест прост в исполнении и в интерпретации результатов.
- Возможность длительного хранения диагностикума.

Слабой стороной метода считают недостаточно высокий процент надежности результатов.

Цель настоящей работы заключалась в разработке новой тест-системы для выявления морфина в моче человека, а также в оптимизации условий проведения латексной агглютинации и синтеза конъюгата полистирольный латекс – морфин – овалбумин.

Экспериментальная часть

В работе использовали полистирольные микросферы с диаметром 0.6 мкм, содержащие на поверхности карбоксильные группы. Полистирольные микросферы получены методом гетерофазной полимеризации в присутствии кремнийорганических ПАВ [13]. Антитела кроличьи, специфичные к морфину, с исходным разведением 1:3000 (в дальнейшем At_m), а также конъюгат морфин – овалбумин получены из лаборатории иммунохимии ИФАВ РАН.

Конъюгат полистирольная микросфера (латекс) – морфин – овалбумин (в дальнейшем L-M-Ov) был синтезирован с помощью стандартного карбодимидного метода. Раствор водорастворимого 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимида с конечной концентрацией в реакционной смеси 1 мг/мл выдерживали с раствором полимерной суспензии (концентрации варьировались от 2 до 8%) в течение 1 ч при перемешивании при комнатной температуре. Полученный раствор отфильтровывали с помощью нитроцеллюлозного одноразового фильтра с диаметром пор 0.2 мкм, фильтрат растворяли в дистиллированной воде и выдерживали с раствором конъюгата морфин – овалбумин (концентрация варьировалась от 1 до 0.01 мг/мл) в течение 1 ч при

умеренном перемешивании.

Выбор рабочего диапазона разведений для антител кроличьих, специфичных к морфину, проводили с помощью прямой латексной агглютинации, для чего на стеклянной пластинке смешивали по 15 мкл предварительно раститрованных At_m с конъюгатом L-M-Ov.

Эффективность каждого выбранного разведения At_m проверяли с помощью агглютинации по торможению, для чего на стеклянной пластинке смешивали по 5 мкл раствора морфина, предварительно раститрованного, и At_m в выбранном разведении, а также по 10 мкл конъюгата L-M-Ov.

Результаты прямой и обратной агглютинации определяли визуально по появлению творожистого белого осадка в каплях, что явно отличалось от картины, наблюдаемой в контрольной капле, где осадка не образовывалось. Фиксировали результат с помощью метода «четырёх плюсов», знак минус ставился в случае полного отсутствия образования осадка.

Результаты и обсуждение

Работа была направлена на создание конъюгата полистирольная микросфера (латекс) – морфин – овалбумин (L-M-Ov) для диагностической тест-системы, а также на поиск оптимальных условий проведения латексной агглютинации по торможению.

Был проведен выбор концентрации полистирольных микросфер с карбоксильными группами на поверхности для ковалентной иммобилизации антигена белковой природы – конъюгата морфин – овалбумин. Иммобилизацию проводили при концентрациях полистирольной суспензии 6, 4 и 2%. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Оценка эффективности латексной агглютинации.

| Рабочая концентрация полистирольной латексной суспензии | | |
|---|------|----|
| 6% | 4% | 2% |
| ++++ | ++++ | + |

Было показано, что оптимальная рабочая концентрация полистирольных частиц с диаметром 0.6 мкм составляет 4%, так как позволяет получить достоверный результат анализа при минимальном расходе вещества.

Следующим этапом работы было проведение серии экспериментов по иммобилизации конъюгата морфин – овалбумин на полистирольные микросферы. Прежде всего, необходимо было выбрать концентрацию белкового лиганда морфин – овалбумин. Исследования проводили в интервале концентраций 0.01 – 1 мг/мл. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2. Подбор оптимальной концентрации конъюгата морфин – овалбумин при иммобилизации на полистирольные частицы.

| Концентрация конъюгата морфин – овалбумин, мг/мл | 1 | 0.5 | 0.1 | 0.05 | 0.01 |
|--|----|-----|------|------|------|
| Оценка эффективности латексной агглютинации | ++ | ++ | ++++ | ++ | ++ |

В ходе эксперимента было установлено, что наиболее наглядно и четко агглютинация наблюдается при концентрации конъюгата морфин – овалбумин, равной 0.1 мг/мл.

Причина более интенсивного слипания частиц в реакции иммунной агглютинации при увеличении количества антигена (от 0.01 до 0.1 мг/мл), ковалентно иммобилизованного на полистирольные микросферы, связана с тем, что количество антигена пропорционально количеству образующихся связей в конечном конъюгате L-M-Ov.

Менее эффективный процесс слипания частиц в реакции латексной агглютинации при максимальном количестве антигена (1 мг/мл),

возможно, обусловлен тем, что кроличьи антитела, специфичные к морфину, не имеют возможности приблизиться к иммобилизованному на поверхности полистирольных латексных частиц антигену на расстояние, необходимое для образования ковалентной связи.

Следующей стадией работы был выбор рабочего диапазона разведений для кроличьих антител, специфичных к морфину. Такую процедуру проводили для каждого конъюгата L-M-Ov, содержащего различное количество морфин – овалбумина, связанного с полистирольными микросферами. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Подбор рабочего диапазона разведений для кроличьих антител, специфичных к морфину.

| Концентрация конъюгата морфин – овалбумин, иммобилизованного на полистирольные частицы, мг/мл | 1 | 0.5 | 0.1 | 0.05 | 0.01 |
|---|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| Рабочий диапазон разведений для кроличьих антител, специфичных к морфину | 1/64 – 1/256 | 1/64 – 1/128 | 1/8 – 1/512 | 1/32 – 1/128 | 1/16 – 1/512 |

Проведенный анализ показывает, что конъюгат, полученный при иммобилизации морфин – овалбумина, взятого в концентрации 0.1 мг/мл, работает в наиболее широком диапазоне разведений At_m .

Поскольку морфин является низкомолекулярным веществом, его невозможно выявить путем проведения реакции прямой латексной агглютинации. Для выявления морфина используют реакцию торможения латексной агглютинации, которая заключается в кон-

курении между латексным конъюгатом и морфином за связывание специфичных к морфину антител.

Заключительным этапом работы явилось проведение агглютинации по торможению для проверки эффективности разработанных диагностикумов. Для этого смешивали растворы морфина, конъюгаты L-M-Ov, At_m в выбранном разведении. Результаты серии экспериментов агглютинации по торможению приведены в табл. 4.

Таблица 4. Проверка эффективности диагностикумов*.

| Выбранные разведения для антител кроличьих, специфичных к морфину | Концентрация конъюгата морфин – овалбумин, иммобилизованного на полистирольные частицы, мкг/мл | | | | |
|---|--|-----|-----|------|------|
| | 1 | 0.5 | 0.1 | 0.05 | 0.01 |
| 1/8 | — | — | 125 | — | — |
| 1/16 | — | — | 125 | — | 250 |
| 1/32 | — | — | 125 | 250 | 250 |
| 1/64 | 250 | 250 | 125 | 250 | 125 |
| 1/128 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| 1/256 | 250 | — | 250 | — | 500 |
| 1/512 | — | — | 500 | — | 500 |

* Числа в таблице представляют собой количество морфина (мкг/мл), которое возможно определить с помощью выбранного разведения антител кроличьих, специфичных к морфину, и полистирольных частиц, содержащих указанное количество иммобилизованного конъюгата морфин – овалбумин.

Полученные результаты показывают, что разработанная тест-система может быть использована для определения не менее 125 мкг/мл морфина.

Результаты, полученные с помощью тест-

системы полимерная микросфера – биолиганд, успешно подтверждены независимым методом, для чего были использованы тест-полоски «Иммуно-хром-морфин-экспресс», производство Россия.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Применение метода флуоресцентно-поляризованного иммуноанализа для выявления опиатов в крови / С. С. Катаев, Н. Б. Зеленина, Д. Б. Оборин, Т. Л. Малкова // Судебно-медицинская экспертиза. – 2006. – № 1. – С. 20–24.
2. Идентификация морфина и кодеина методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии в химико-токсикологических исследованиях / А. В. Воронин, И. Ф. Шаталаев, Т. В. Воеводина, П. П. Пурьгин // Вестник СамГУ. – 2007. – № 6 (56). – С. 385–392.
3. Asselin, W. M. Direct detection of drugs of abuse in whole hemolyzed blood using the EMIT d.a.u. urine assays / W. M. Asselin, J. M. Leslie, B. McKenley // J. Analyt. Toxicol. – 1988. – Vol.12. – P. 207–215.
4. Setting cutoff concentrations for immunoassay screening of post-mortem blood / I. B. Collison, V. R. Spiehler, S. Guluzian, P. R. Sedgwick // J. Forensic Sci. – 1998. – Vol. 43. – P. 390–394.
5. Kaferstein, H. Results of immunochemical and chromatographic investigations of blood samples in suspected drug abuse – Report: opiates, cocaine, cannabinoids, and amphetamines / H. Kaferstein, G. Sticht // Rechtsmedizin. – 1998. – Bd. 8. – P.173–177.
6. Group-selective antibodies based fluorescence immunoassay for monitoring opiate drugs / S. Gandh [et al.] // Analyt. & Bioanalyt. Chem. – 2008. – Vol. 392. – P. 215–222.
7. Lewellen, L. J. A novel procedure for the analysis of drugs in whole blood by homogeneous enzyme immunoassay (EMIT) / L. J. Lewellen, H. H. McCurdy // J. Analyt. Toxicol. – 1988. – Vol.12. – P.260–264.
8. Toennes, S. W. Immunochemical screening of serum samples: comparison of the cannabinoid and opiate assays Mahsan MTP and Abbott FPIA controlled by gas chromatography-mass spectrometry / S. W. Toennes, G. Kauert // Rechtsmedizin. – 2000. – Bd.10. – P. 71–75.
9. Latex particle agglutination test in the diagnosis of *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* A and C meningitis in infants and children / P. A. M. Camargos [et al.] // J. Clinical Epidemiol. – 1995. – Vol. 48, № 10. – P. 1245–1250.
10. Bryden, A. S. The evaluation of a combined ‘dry’ latex agglutination test for detecting rotaviruses and adenoviruses in faeces / A. S. Bryden // Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease. – 1995. – Vol. 7, № 3. – P. 129–131.
11. Enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination inhibition reaction test for morphine in urine / K. Aoki [et al.] // Forensic Sci. Int. – 1996. – Vol. 81, № 2-3. – P. 125–132.
12. Immunological agglutination kinetics of latex particles with physically adsorbed antigens / A. Kondo [et al.] // J. Immunol. Methods. – 1990. – Vol.135, № 1-2. – P. 111–119.
13. Прокопов, Н. И. Синтез монодисперсных функциональных полимерных микросфер для иммунодиагностических исследований / Н. И. Прокопов // Успехи химии. – 1996. – Т. 65, № 2. – С. 178–192.