

Иммуноферментный анализ антител к опиатам в сыворотке крови больных наркоманией для оценки эффективности терапии препаратом "анар"

МЯГКОВА М.А.

д.б.н., профессор, зав. лаб. иммунохимии,
Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка

КОПОРОВ Д.С.

врач психиатр-нарколог МНПЦ наркологии Департамента здравоохранения, Москва

ДЕМЕРЧЯН С.А.

н.с., лаборатория иммунохимии, Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка

АБРАМЕНКО Т.В.

к.хим.н., с.н.с., лаборатория иммунохимии, Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка

ЭПШТЕЙН О.И.

ген. директор НПЦ "Материя Медика", Москва

БОХАН Н.А.

д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе НИИ психического здоровья
Томского научного центра СО РАМН, Томск

ВОЕВОДИН И.В.

к.м.н., с.н.с. НИИ психического здоровья Томского научного центра СО РАМН, Томск

Проведено определение эффективности лечения постабстинентных состояний и использования поддерживающей терапии в период формирования ремиссии у больных опийной наркоманией. При выполнении работы в ходе лечения больных сравнили два метода лечения — традиционный медикаментозной терапии и применение препарата "анар", который содержит потенцированные по правилам гомеопатии аффинно очищенные анти-тела к морфину в разведениях C30 и C200. В качестве инструмента исследования использовали иммуноферментный анализ определения антител к опиатам в сыворотке крови больных наркоманией и доноров. Полученные результаты позволяют сделать вывод об эффективности препарата "анар" при купировании постабстинентных расстройств, превышающей таковую при традиционной медикаментозной терапии, с 8-х по 20-е сутки пребывания больного в стационаре. Определение антител к опиатам в сыворотке крови больных наркоманией является дополнительным критерием, позволяющим объективно дополнить и оценить клинические показатели применения той или иной терапии. Нормализация показателей гуморального иммунитета — антител к морфину может иметь важное значение для увеличения периода ремиссии у больного наркоманией.

Введение

Развитие опийной зависимости сопровождается перестройкой биохимических и иммунологических процессов организма. Известно, что хроническое употребление психоактивных веществ ведет к образованию в кровотоке специфических антител [1]. Так, у больных опийной наркоманией, длительное время злоупотребляющих опиатными алкалоидами, были выявлены антитела к морфину [2].

В исследованиях, выполненных нами ранее, разработан метод выделения антител к опиатам из сыворотки крови больных наркоманией [3]. В ходе выполнения работы изучены иммунохимические свойства таких антител. Установлен диапазон изменения их аффинности, исследованы перекрестные реакции с другими классами структурнородственных соединений [3, 4]. Полученные результаты явились основой для разработки иммуноферментного метода анализа (ИФА) определения антител к морфину в сыворотке крови больных наркоманией. В ходе его клинической апробации показано, что уровень антител тесно связан с течением заболевания и может служить диагностическим маркером, характеризующим стадии наркомании и эффективность проводимой терапии [5, 6].

Арсенал лекарственных средств, используемых для лечения наркомании, улучшающий иммунологический статус больных, постоянно расширяется. В настоящее время для этой цели применяют препараты потенцированных специфических антител в сверхмалых дозах, приготовленных по специальной технологии [7]. Эти лекарственные средства составляют новую фармакологическую группу и

обладают оригинальным спектром биологического действия. К таким препаратам относится "анар", который благодаря иммуностропному действию нормализует функцию иммунной системы и используется для лечения наркомании [8]. Предпосылкой развития этого научного направления и создания лекарств нового поколения стали исследования, показавшие сохранение специфической биологической активности веществ в сверхмалых концентрациях [7, 8, 9]. Оценка терапевтической эффективности новых лекарственных препаратов является актуальной задачей, решение которой связано с изучением параметров основных гомеостатических систем. Для получения полной характеристики новых лекарственных средств необходимо использовать сочетание клинических критериев с разработкой высокочувствительных методов анализа, позволяющих объективно и достоверно исследовать все возможности применения данных препаратов в медицинской практике.

Целью настоящего исследования явилось определение иммунологических критериев оценки эффективности применения препарата "анар" на этапе формирования ремиссии у больных опийной наркоманией на основе использования иммуноферментного анализа антител к опиатам.

Экспериментальная часть

В работе использованы следующие биохимические реагенты: конъюгаты кроличьих антител против иммуноглобулинов человека, меченных пероксидазой хрена, о-фенилендиамин, перекись водорода 30%, твин-20 (Sigma). ИФА проводили на 96-луночных планшетах фирмы Nunc.

Результаты анализа учитывали на спектрофотометре Multiskan при 492 нм.

Планшет сенсибилизировали раствором конъюгата морфина (по 100 мкл в лунку) в концентрации 3 мкг/мл в 0,02 М карбонатном буфере (pH 9,5) в течение 18 ч при температуре 4°C.

После сорбции планшет отмывали трижды (3*100 мкл) 0,005%-ным раствором твин-20 в ЗФР (pH 7,2) и вносили в лунки в двух повторах по 100 мкл исследуемой сыворотки в забуференном физиологическом растворе (ЗФР), содержащем 0,01% твин-20, в разведении 1/200. Планшет инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C.

После инкубации планшет отмывали, как описано выше, и добавляли в лунки по 100 мкл раствора антивидовых антител против Ig человека, меченных пероксидазой хрена в разведении 1/2000. Планшет инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C.

После инкубации планшет промывали, как описано выше, и заполняли (по 100 мкл в лунку) субстратной смесью, содержащей 0,4% о-фенилендиамина и 0,4% H₂O₂ в 0,05 М фосфатно-цитратном буфере. Планшет инкубировали в течение 20 мин в темноте.

После инкубации останавливали ферментативную реакцию добавлением в лунки по 50 мкл 10% H₂SO₄ и измеряли оптическую плотность (OD₄₉₂) на спектрофотометре при длине волны 492 нм.

На основании результатов ИФА проводили анализ содержания иммуноглобулинов в индивидуальных сыворотках больных и доноров, определяя достоверное изменение уровня антител.

За величину порогового уровня, разделяющего сыворотки доноров и больных, имеющих повышенный либо пониженный уровень антител к исследуемым антигенам, принимали значение OD₄₉₂ в ИФА, отличающееся от среднего значения OD₄₉₂ в ИФА для группы доноров, на величину трехкратного стандартного отклонения. Полученные данные обрабатывали статистически с оценкой достоверности результатов, применяя t-критерий Стьюдента.

Клинический материал предоставлен ГУ НИИ психического здоровья ТНЦ СО РАМН г. Томска. В работе использованы образцы сыворотки крови больных опийной наркоманией (56 чел.) в возрасте от 15 до 35 лет и здоровых доноров (20 чел.) в возрасте от 18 до 25 лет. Средний возраст больных на момент исследования составлял 23,49±4,19 года; из них лиц мужского пола 85,05%, женского пола 14,95%. Больные начали принимать препараты опия в возрасте 18,03±3,52 года (p>0,05). Стаж употребления наркотиков на момент исследования составлял 5,23±2,66 года (p>0,05). Больные включались в исследование на 7-е сутки после отмены наркотика и пребывания в стационаре. Для проведения ИФА осуществляли забор крови в начале лечебного процесса и далее трехкратно в динамике с интервалом 7 дней.

С целью изучения эффективности применения препарата "анар" в период постабстинентных расстройств при формировании ремиссии обследованные пациенты были разделены на 2 группы — основную (1) и сравнения (2). Больные опийной наркоманией 1-й и 2-й групп стандартизованы по половозрастным, социально-психологическим и клиническим характеристикам. Протокол исследования включал следующие фармакотерапевтические режимы:

• группа 1 (основная) — пациенты, получающие анар:

— по 1 табл. 5—8 раз в сутки в течение первых 2 недель исследования, с возможностью увеличения дозы до 10—12 табл. в сутки в зависимости от выраженности психопатологических проявлений постабстинентного состояния;

— по 1 табл. 4—6 раз в сутки в течение последующих 3 недель исследования, с возможностью трех дополнительных приемов препарата по одной табл. с интервалом 15—20 мин при возникновении пароксизмального влечения к наркотику;

• группа 2 (сравнения) — пациенты, получающие традиционную медикаментозную терапию, включающую дифференцированное назначение следующих основных групп препаратов: антидепрессанты (амитриптилин до 100 мг/сут.); корректоры поведения (неулептил до 30 мг/сут., сонапакс до 50 мг/сут.); гипнотики (хлорпротиксен до 100 мг/сут.); ноотропы (пирасетам до 800 мг/сут.); вегетостабилизаторы (пирроксан до 60 мг/сут., грандаксин до 100 мг/сут.).

При назначении сопутствующей терапии в течение всего периода исследования был исключен прием препаратов из групп нейролептиков, транквилизаторов, антидепрессантов, антагонистов опия.

Исследование продолжалось до момента выписки больного из стационара и стойкого редуцирования всех симптомокомплексов, а также первичного патологического влечения к наркотику.

Оценка эффективности и безопасности терапии проводилась на основании показателей динамики клинических проявлений постабстинентного состояния в баллах; динамики психологического тестирования; динамики клинико-иммунологических показателей в начале и в конце курса лечения; субъективная оценка эффективности пациентом; оценки клинической эффективности врачом; оценки переносимости терапии пациентом, а также по наличию и характеру нежелательных явлений.

Результаты и их обсуждение

Проведено комплексное исследование определения эффективности лечения постабстинентных состояний и использования поддерживающей терапии в период формирования ремиссии у больных опийной наркоманией. При выполнении работы в ходе лечения больных сравнили два ме-

Таблица 1

Иммуноферментный анализ антител к морфину в исследуемых группах больных опийной наркоманией

Группы больных и доноров	Среднее по группе значение OD ₄₉₂ в ИФА			
	Этапы забора крови в динамике лечения			
	1	2	3	4
Больные по программе "Анар"	0,592±0,006; =0,030	0,569±0,007; =0,032	0,471±0,008 =0,029	0,386±0,010; =0,037
Больные по программе "Традиционная терапия"	0,590±0,008; =0,030	0,588±0,015; =0,046	0,575±0,020; =0,057	0,497±0,014; =0,041

Таблица 2

Средние значения времени полного редуцирования постабстинентной симптоматики

Показатель	Основная группа (N=67)	Группа сравнения (N=40)	p
Продолжительность постабстинентного состояния	11,38±6,36	13,62±3,04	0,046

тогда лечения — традиционной медикаментозной терапии и применение лекарственных средств нового поколения. Новый фармакологический препарат анар содержит потенцированные по правилам гомеопатии аффинно очищенные антитела к морфину в разведениях C30 и C200. В экспериментах, выполненных ранее на животных, показано, что этот препарат обладает направленным психотропным эффектом и не создает дополнительной токсической лекарственной нагрузки при длительной терапии [10].

В качестве инструмента исследования использовали иммуноферментный анализ определения антител к опиатам в сыворотке крови больных наркоманией и доноров. Результаты представлены в табл. 1.

Анализ полученных данных показал, что на момент начала лечения (1-й этап) в сыворотках крови больных основной (1) и контрольной (2) групп выявляется достоверно повышенный уровень антител к морфину по сравнению с донорами. Наиболее яркими клиническими симптомами у больных, находящихся на начальном этапе исследования в постабстинентном состоянии, выступали диссомнические и аффективные расстройства. Эти показатели были сопоставимы в обеих группах при первом контрольном заборе крови.

По мере прохождения курса лечения препаратом "анар" на 2-м и 3-м этапах у больных наблюдалось снижение уровня антител к морфину и в дальнейшем значительная нормализация этого параметра при выписке из стационара. В группе сравнения (2) у пациентов, получавших традиционную медикаментозную терапию, уровень антиопиатных антител оставался достоверно повышенным по сравнению со здоровыми донорами на всех этапах контрольного забора крови.

Анализ клинических данных позволил установить, что процесс редуцирования нейровегетативной, аффективной, поведенческой и диссомнической симптоматики, а также влечения к наркотику в клинических группах проходил неодинаково.

Полученные результаты позволяют сделать вывод об эффективности препарата "анар" при купировании постабстинентных расстройств, превышающей таковую при традиционной медикаментозной терапии, с 8-х по 20-е сутки пребывания больного в стационаре. Эффективность препарата в отношении нейровегетативных расстройств и влечения к наркотику превышает эффективность традиционной терапии в период с 8-х по 11-е сутки, в дальнейшем становясь сопоставимой.

Полное редуцирование постабстинентных расстройств в среднем по рассматриваемым группам происходило в следующие сроки (табл. 2).

Полученные факты хорошо согласовывались с иммунохимическим исследованием, выполненным в данной работе. Более детальное рассмотрение иммунологических характеристик, полученных у пациентов каждой из рассматриваемых групп, показало, что изменение уровня антител к опиатам происходит индивидуально для каждого участника исследования. При приеме препарата "анар" нормализация этого показателя наблюдалась у 13 чел. уже при втором контрольном

заборе образцов крови для анализа (через 7 дней). У оставшейся части больных уровень антител к морфину снижался более медленно в течение 14–20 дней и достигал нормы за 5–7 дней до выписки из стационара. В контрольной группе сравнения отмечено снижение уровня антител к морфину у 5 чел. через 7 дней после начала эксперимента, но этот результат не был достоверен. После второго этапа забора крови (14 дней) уровень антиопиатных антител вновь повышался и оставался таковым до окончания исследования.

Следует отметить взаимосвязь полученных результатов с клиническими показателями. Так, выявлено значимое снижение сроков пребывания больного в постабстинентном состоянии при монотерапии препаратом "анар" по сравнению с традиционным медикаментозным лечением. При этом у 14 больных основной группы постабстинентные проявления полностью редуцировались в срок до 7 суток, чего в группе сравнения не наблюдалось.

Определение антител к опиатам в сыворотке крови больных наркоманией является дополнительным критерием, позволяющим объективно дополнить и оценить клинические показатели применения той или иной терапии. Предположительно один из вариантов механизма терапевтического действия препарата "анар" связан с иммунной системой. Нормализация показателей гуморального иммунитета — антител к морфину может иметь важное значение для увеличения периода ремиссии у больного наркоманией. Присутствие специфических антител, циркулирующих в кровотоке, может являться тем патогенным фактором, который вновь стимулирует человека к приему наркотика после выписки из стационара. Наблюдения и исследования в этой области будут продолжены.

Таким образом, результаты выполненного эксперимента свидетельствуют о том, что анализ антител к опиатам в сыворотке крови больных наркоманией может являться объективным критерием в оценке эффективности выбираемой терапии.

Список литературы

1. Ringle D.A., Herndon B.L. // J. Immunol. — 1972. — Vol. 109. — P. 174–175.
2. Ryan J., Parker C.W. // J. Lab. Clin. Med. — 1972. — Vol. 80. — P. 155–164.
3. Мягкова М.А., Лушникова М.В., Полевая О.Ю. // Вопросы наркологии. — 1989. — №4. — С. 7–12.
4. Полевая О.Ю., Лушникова М.В., Мягкова М.А. // Иммунология. — 1990. — №3. — С. 19–22.
5. Мягкова М.А., Лушникова М.В., Полевая О.Ю. // Иммунология. — 1992. — №3. — С. 45–47.
6. Мягкова М.А., Брюн Е.А., Копоров С.Г., Панченко О.Н., Абраменко Т.В. // Суд.-мед. экспертиза. — 2001. — Т. 44, №1. — С. 18–20.
7. Эпштейн О.И. // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2002. — №4. — С. 8–15.
8. Булакова Е.Б. // Вестник РАН. — 1994. — Т. 64, №5. — С. 425–427.
9. Barbour L.J., Ozz G.W., Atwood J.L. // Nature. — 1998. — Vol. 393. — P. 471–474.
10. Воробьева Т.М., Берченко О.Г., Эпштейн О.И. // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2002. — №4. — С. 38–40.

**IMMUNOENZYME ASSAY FOR ANTIBODIES TO OPIATES IN THE ANTISERA BLOOD
OF THE PATIENT WITH NARCOMANIA FOR THE ESTIMATION OF THE EFFECTIVENESS OF THE THERAPY
BY THE MEDICATION "ANAR"**

**MIAGKOVA M.A.
KOPOROV D.S.
DEMERCHAN S.A.
ABRAMENKO T.V.
OPSHTEYN O.I.
BOHAN N.A.
VOEVODIN I.V.**

It was carried out the determination of the effectiveness of the medical treatment of the post-abstinent status and the use of the supporting therapy during the period of the forming of the remission at the patients with opiate narcomania. During the medical treatment of the patients two methods were compared traditional medical treatment and application of the medication "ANAR" which contains potentiated by homeopathy rules affinity purified antibodies to morphine on the dilutions C30 and C200. Immunoenzyme assay for the determination of the antibodies to the opiates in the sera of the blood of the patients with narcomania and donors was used as the instrument of the investigation. The obtained results allow to make a conclusion about the effectiveness of the medication "ANAR" at the stopping of the post-abstinent disorders which exceeded the effectiveness of the traditional medical therapy in the period from 8 to 20 days of the stay of the patients in the hospital.