

На правах рукописи

**Киселева Раиса Юрьевна**

**Разработка иммуноферментного метода анализа амфетамина и антител к нему в биологических жидкостях человека.**

Специальность: 03.01.06 – Биотехнология  
(в т.ч. бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

**Москва  
2012**

Работа выполнена на кафедре биотехнологии Российского химико-технологического университета им Д.И. Менделеева и в лаборатории иммунохимии физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН)

Научный руководитель

Доктор биологических наук, профессор  
**Мягкова Марина Александровна**

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор  
**Сахаров Иван Юрьевич**  
Ведущий научный сотрудник Химического факультета Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова

кандидат технических наук  
**Коваленко Алексей Евгеньевич**  
Заведующий кафедрой экспертизы в допинг- и нарконтроле Российского химико-технологического университета им Д.И. Менделеева

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки  
«Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации

Защита состоится «22» мая 2012 г. в 17.00 часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.204. 13 в РХТУ им. Д. И. Менделеева (125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9) в аудитории 443 (конференц-зал) .

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Автореферат диссертации разослан «20» апреля 2012 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
ДМ 212.204.13

Шакир И.В.

## **Общая характеристика работы.**

**Актуальность проблемы.** Увеличение незаконного оборота синтетических наркотиков, в том числе амфетаминового ряда, и злоупотребления ими стало одной из серьезнейших проблем мирового сообщества. Решение многих вопросов, связанных с противодействием распространению наркомании, обуславливает потребность в доступных и достоверных методах, позволяющих при массовых обследованиях быстро выявлять факты злоупотребления психоактивными средствами. Разработка и производство тест-систем для надежной диагностики фактов злоупотребления различными видами наркотических веществ является одним из актуальных направлений биотехнологии.

На сегодняшний день в медицинской практике широкое применение нашли иммунохимические методы анализа, используемые для определения самых разных физиологически активных веществ и объектов – от низкомолекулярных регуляторов метаболизма до маркеров раковых клеток и патогенных микроорганизмов. Уникальная специфичность реакции антиген – антитело позволяет достоверно выявлять индивидуальные соединения в биопробах сложного состава, не прибегая к их предварительной обработке и фракционированию. Наиболее перспективным биотехнологическим методом анализа является иммуноферментный анализ (ИФА), который позволяет в течение 2-3 часов получить результаты анализа большого количества биопроб пациентов.

Известно, что хроническое употребление ряда наркотических веществ приводит к образованию специфических антител в сыворотке крови больных наркоманией. Так, у людей, злоупотребляющих опиатами и препаратами эфедрина, выявлено повышение уровня иммуноглобулинов (IgG), связывающих эти вещества. Специфические антитела к наркотикам долгое время циркулируют в кровотоке в отличие от быстро выводимых из мочи метаболитов. Полученные научные данные стали основой для создания новых методов диагностики скрытых форм наркомании.

**Цель работы.** Цель данного исследования заключается в разработке эффективных методов твердофазного иммуноферментного определения амфетамина и антител к нему в биологических жидкостях человека и установление его практической значимости в диагностике и профилактике употребления препаратов амфетаминового ряда.

### **Для достижения цели поставлены следующие задачи:**

1. Осуществить синтез иммунохимических реагентов – новых конъюгированных антигенов, содержащих в своем составе производные амфетамина на макромолекулярном носителе - белковой матрице.

2. Разработать условия проведения твердофазного иммуноферментного анализа определения амфетамина в биологических жидкостях человека с использованием различных вариантов получения иммунохимических реагентов.

3. Провести сравнительное определение амфетамина в моче человека разработанным иммуноферментным методом и хроматографическим способом. Установить диагностическую значимость разработанного иммуноферментного метода.

4. Разработать иммуноферментные методы определения антител к амфетамину в биологических жидкостях человека. Оптимизировать условия определения антител к амфетамину в сыворотке крови человека на основе использования в иммуноферментном анализе новых синтетических антигенов.

5. Синтезировать сорбенты для аффинной хроматографии, провести выделение антител к амфетамину из сыворотки крови больных, употребляющих психостимулирующие препараты амфетаминового ряда, и доноров, исследовать их иммунохимические свойства.

6. Провести сравнительный анализ содержания специфических антител к амфетамину в биологических жидкостях человека и установить практическую значимость разработанных вариантов иммуноферментного анализа.

**Научная новизна.** Получены новые конъюгаты амфетамина с использованием различных

методов синтеза.

Разработаны оригинальные способы твердофазного иммуноферментного анализа для определения амфетамина и антител к нему в биологических жидкостях человека, являющиеся основой комплексного подхода к диагностике наркомании.

На основе исследования сыворотки крови больных, употребляющих психостимулирующие препараты амфетаминового ряда, обнаружены антитела к указанному наркотическому соединению. Причём, достоверно установлено увеличение уровня антител к амфетамину по сравнению с нормой при злоупотреблении амфетаминовыми препаратами, в период развития зависимости от наркотика. Впервые выполнено определение иммуноглобулинов класса А, связывающих производные этого препарата, в слюне больных наркоманией. Проведено сравнительное определение содержания данных иммуноглобулинов, концентрации sIgA и общего белка слюны.

**Практическая значимость работы.** Результаты по созданию новых методов иммуноферментного анализа амфетамина и антител к нему в биологических жидкостях человека получили высокую оценку специалистов и имеют важное значение для практического использования в диагностике наркомании.

На базе лаборатории иммунохимии физиологически активных веществ ИФАВ РАН разработана технология изготовления тест-систем для определения амфетамина в моче. Данные тест-системы зарегистрированы как изделия медицинского назначения (Набор реагентов для иммуноферментного определения амфетаминов в моче «Дианарк-А» № ФСР 2009/0530 от 30 июня 2009 г.) и с 2009 года начат выпуск опытно-промышленных партий этой тест-системы для применения в отечественном здравоохранении.

**Апробация работы.** Основные материалы и положения диссертационной работы доложены и утверждены на заседании Ученого совета кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева (протокол № 651 от 22 декабря 2008 г.) на межлабораторной конференции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН) (протокол №1 от 24 декабря 2008 года). Результаты исследования представлены на VII Всероссийском конгрессе «Профессия и здоровье» (Москва, ноябрь 2008 г.); Первом Московском международном Конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, март 2009 г.); VII съезде аллергологов и иммунологов СНГ II Всемирном форуме по астме и респираторной аллергии, Первом Российском национальном конгрессе по наркологии (Москва, ноябрь 2009 г.); Восьмой международной научно-практической конференции «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности» (Москва, 2009 г.); Научно-практической конференции "Современные аналитические задачи определения наркотиков, лекарственных средств и других компонентов в различных матрицах» (Москва, май 2010 г.). Зарегистрирована Медицинская технология «Метод раннего выявления потребления наркотических веществ «Дианарк» для предупреждения наркомании». Учреждения разработчики: МНПЦ наркологии ДЗ г. Москвы, ИФАВ РАН, г. Черноголовка Моск. обл., ООО «Диамедика»

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, в том числе 3 статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК, 6 – сборниках статей и материалах конференций.

**Объем и структура работы.** Диссертация построена по общепринятому плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов работы и их обсуждения, выводов и списка литературы (197 источников). Работа содержит 19 таблиц и 13 рисунков. Материалы изложены на 113 страницах машинописного текста.

**Работа выполнена** в лаборатории иммунохимии физиологически активных веществ ИФАВ РАН и на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **1. Материалы исследования.**

Для разработки иммуноферментного метода определения амфетамина в моче исследовали 21 образец мочи людей, подозреваемых в злоупотреблении амфетамином и 15 образцов мочи здоровых людей, предоставленные Наркологической клинической больницей № 17 Департамента здравоохранения г. Москвы.

В разработке иммуноферментного метода определения антител к амфетамину в сыворотке крови человека использовали пробы сыворотки крови 18 больных, употребляющих психостимулирующие препараты амфетаминового ряда, в возрасте от 20 до 44 лет и продолжительностью заболевания от 1 года до 11 лет, предоставленные Московским научно-практическим центром наркологии г. Москвы. У обследуемых лиц осуществляли забор 5 мл венозной крови, до начала и после окончания лечения. Пробирки с кровью помещали в термостат на 30 мин. при  $T\ 37^{\circ}\text{C}$ , затем оставляли на 18 часов при  $T\ 4^{\circ}\text{C}$ . Образовавшуюся сыворотку крови центрифугировали при 3000 об/мин. Образцы сыворотки крови хранили при  $T\ -20^{\circ}\text{C}$  до момента тестирования. В качестве контрольных образцов использовали сыворотки крови 25 здоровых доноров в возрасте от 20 до 50 лет, полученные в Учреждении Российской академии медицинских наук Гематологическом научном центре РАМН.

Иммуноферментный метод определения амфетамина в слюне разрабатывали с использованием 22 образцов слюны людей, подозреваемых в злоупотреблении амфетамином и 20 образцов слюны здоровых людей, предоставленные Наркологической клинической больницей № 17 Департамента здравоохранения г. Москвы. Слюну собирали утром натощак после ополаскивания ротовой полости водой путем сплевывания ее в пробирку в течение 10-15 минут. Далее образцы слюны центрифугировали (10 тыс. об/мин) в течение 15 минут, собирали надосадок и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2. Методы исследования.**

**Для проведения иммунохимических исследований применяли следующие методы:**

1. Иммуноферментный анализ выполняли на полистирольных планшетах фирмы «Nunc» (Дания). Учёт результатов иммуноферментного анализа осуществляли на спектрофотометре с вертикальным ходом луча фирмы «Bio-Rad» при длине волны 450 нм.

2. Очистку конъюгированных антигенов проводили с помощью гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-25. Регистрацию результатов хроматографии осуществляли на жидкостном хроматографе «Spektroflow 757».

3. Определение спектральных характеристик синтезированных конъюгированных антигенов проводили на спектрофотометре «Genesys UV100» фирмы «Thermo».

4. Аффинную хроматографию проводили с помощью специально полученного сорбента на основе макропористого аминопропилированного стекла. Регистрацию результатов хроматографии осуществляли на жидкостном хроматографе «Spektroflow 757».

5. Белок в растворах аффинно выделенных антител определяли методом Бредфорда. Оптическую плотность растворов белков регистрировали спектрофотометрически на приборе «Genesys UV100» фирмы «Thermo».

6. В работе использовали комплекс статистических методов с применением пакета программ SPSS для научных исследований. Результаты исследований оценивали с использованием средней арифметической величины ( $M$ ), их стандартной ошибки ( $m$ ), критерия Стьюдента-Уэлча ( $t$ ), критерия Пирсона, коэффициента корреляции Кендалла. Для принятия гипотезы применяли уровень достоверности 95% ( $p=0,05$ ).

### 3. Результаты собственных исследований и их обсуждение.

#### 3.1. Получение реагентов для иммуноферментного анализа определения амфетамина.

Первый этап создания метода определения амфетамина и антител к ним в биологических жидкостях человека связан с получением биохимических реагентов. Именно их качественные характеристики относятся к главным факторам анализа, составляющих основу биотехнологической разработки. Реагентами при разработке твердофазного иммуноферментного анализа являются специфические антитела и антигены.

Исследовали различные варианты синтеза конъюгированных антигенов амфетамина. Провели анализ структуры новых соединений и оценили их свойства для использования в качестве антигенов при разработке иммуноферментного метода.

Для синтеза конъюгированного антигена амфетамина с белками применяли следующие способы:

- 1) с использованием в качестве конденсирующего агента карбодиимида,
- 2) с применением глутарового альдегида в растворе фосфатного буфера,
- 3) методом смешанных ангидридов.

##### 3.1.1. Синтез конъюгированных антигенов амфетамина с различными белками.

Амфетамин в своей структуре не содержит функциональных групп для ковалентного связывания с белками в мягких условиях, поэтому предварительно было синтезировано производное амфетамина (d, 1-1-фенил-2-карбоксаминопропан – соединение (1)). Получено 83 мг вещества.

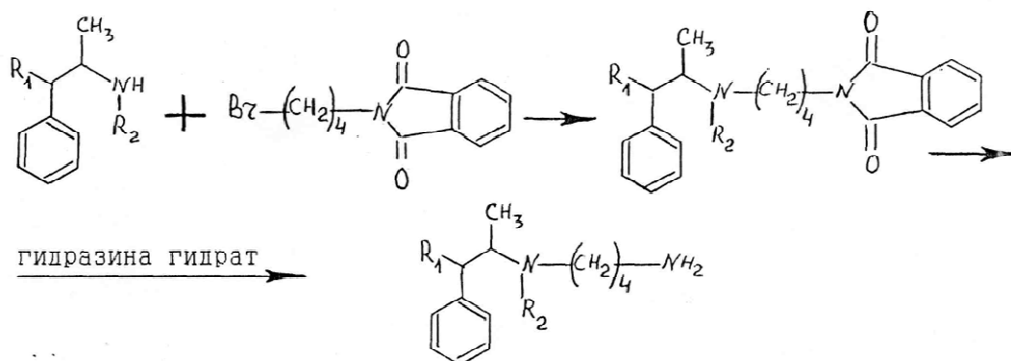


Рисунок 1. Схема синтеза соединения (1), где R<sub>1</sub>- H, R<sub>2</sub> – H

В дальнейшем это соединение использовали при синтезе конъюгированных антигенов амфетамина с овальбумином (КА-1 и КА-2) и бычьим сывороточным альбумином (КА-3).

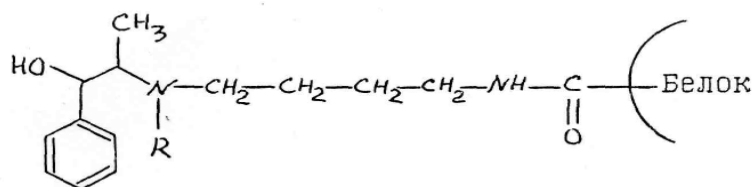


Рисунок 2. Общая формула иммуногенов - конъюгатов производных фенилалкиламина, где R - H.

При получении конъюгатов амфетамина с овальбумином исследовали два способа синтеза - карбодиимидный и с помощью глутарового альдегида. Такой подход позволял установить влияние метода конъюгирования низкомолекулярного соединения на параметры разрабатываемого ИФА: чувствительность определения амфетамина, специфичность и афинность антител, используемых в анализе.

Конъюгат (КА-1) получали добавлением раствора глутарового альдегида к раствору смеси соединения (1) и овальбумина при комнатной температуре. Для остановки реакции использовали раствор лизина.

При получении конъюгата (КА-2) карбодимидным методом соединение (1) непосредственно вводили в реакцию с белком-носителем овальбумином, используя в качестве конденсирующего агента водорастворимый карбодимид.

Полученные конъюгаты (КА-1, КА-2, КА-3) с белком выделяли гель-фильтрацией на колонке с Сефадексом G-25. Очищенные таким образом конъюгаты высушивали и хранили при температуре -20°C.

Содержание амфетамина в конъюгированных антигенах определяли спектрофотометрически сравнением УФ-спектров исходного белка и полученного конъюгата с амфетамином. Затем по изменению интенсивности поглощения конъюгата при 280 нм рассчитывали количество молей присоединенного амфетамина.

Таблица 1.

Характеристики синтезированных конъюгированных антигенов амфетамина с белком.

№ п/п	Количество молей соединения (1) на моль белка	Количество синтезированного конъюгата, мг	Метод синтеза
КА-1	10-12	105	с использованием глутарового альдегида
КА-2	3-5	90	с использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимида (ЭДК)
КА-3	18-20	110	смешанных ангидридов

Конъюгированный антиген с различным содержанием гаптена и овальбумина использовали в иммуноферментном анализе. Сравнительные данные ИФА для конъюгатов (КА-1) и (КА-2) представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Результаты проведения иммуноферментного анализа на конъюгированных антигенах с различным соотношением гаптена и белка носителя.

Наименование антигена	Диапазон разведения антигена, мкг/мл	Диапазон разведения сыворотки
КА-1	10-0,3 мкг/мл	1: 100 – 1:6400
КА-2	10-0,3 мкг/мл	1: 100 – 1:3200

Результаты титрования сыворотки в ИФА получены при использовании конъюгата (КА-1), содержащего 10 - 12 молей гаптена на моль овальбумина, показали более высокое значение связывания антител с антигеном. В случае применения конъюгата (КА-2), титр сыворотки был меньше. Эти факты могут быть

объяснены более низкой посадкой производного амфетамина на белок-носитель, либо инактивацией полученного конъюгата в процессе синтеза. В дальнейшем при разработке ИФА определения амфетамина в моче использовали конъюгат (КА-1), синтезированный с помощью глутарового альдегида.

### 3.1.2. Получение антител к амфетамину.

При получении антител к низкомолекулярным веществам, к которым относится и амфетамин, использовали процедуру иммунизации животных синтезированным конъюгированным антигеном (КА-3). Низкомолекулярное соединение не может являться индуктором синтеза антител без макромолекулярной матрицы.

В процессе иммунизации и при ее завершении у иммунизированных животных отбирали кровь и определяли в ИФА титр полученных антител. Для определения общего титра антител на полный антиген на планшеты сорбировали конъюгат (КА-3), включающий гаптен и белок-носитель бычий сывороточный альбумин. Титр антител на гаптен устанавливали с использованием конъюгата, в котором заменили белок-носитель на

овальбумин. Титр сыворотки определяли как конечное разведение, при котором значение оптической плотности при 450 нм в ИФА превышало фоновое значение втрое. В результате проведенных исследований установлено, что титры антител на гаптен и белок-носитель у различных животных варьируют в широком интервале (Табл. 4). Степень посадки гаптена отражает эпитопную структуру антигена, которая является оптимальной для получения специфических антител.

Таблица 3.

Титр сыворотки, определяемый в ИФА с помощью различных конъюгированных антигенов.

№ п/п иммунной сыворотки	Титр антител в ИФА для конъюгированных антигенов		
	КА-1	КА-2	КА-3
1	1 : 400	1 : 800	1 : 10 <sup>6</sup>
2	1 : 3200	1 : 6400	1 : 10 <sup>12</sup>
3	1 : 1600	1 : 3200	1 : 10 <sup>5</sup>
4	1 : 600	1 : 800	1 : 10 <sup>12</sup>
5	1 : 800	1 : 1600	1 : 10 <sup>3</sup>
6	1 : 800	1 : 1600	1 : 10 <sup>3</sup>

Сыворотку крови кролика, имеющую наиболее высокий титр антител к гаптenu (1:6400), использовали в качестве реагента в ИФА. В качестве второго реагента для ИФА применяли конъюгат (КА-1), синтезированный с использованием глутарового альдегида.

Таким образом, для разработки твердофазного ИФА определения амфетамина были получены все необходимые компоненты, а именно: конъюгаты амфетамина с белками, различающиеся способом синтеза и количеством молей гаптена, связанных с

белком-носителем, и специфичные антитела.

### 3.2. Иммуоферментный анализ определения амфетамина.

Твердофазный метод ИФА определения амфетамина включает следующие основные стадии: иммобилизацию конъюгированного антигена на полистирольном планшете; конкурентное связывание свободного производного амфетамина, присутствующего в анализируемом образце, и адсорбированного на твердой фазе конъюгата амфетамина с белком со специфическими антителами; выявление образовавшегося иммунного комплекса с помощью антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена; измерение ферментативной активности в образовавшемся иммунном комплексе.

Для разработки ИФА определения амфетамина подбирали оптимальные концентрации сорбируемого на твердую фазу конъюгированного антигена и разведение специфических антител к амфетамину. На первом этапе разработки твердофазного ИФА определения амфетамина в биологических жидкостях человека подбирали оптимальные соотношения количества (КА-1), сорбированного на твердой фазе, и необходимое количество кроличьих сывороток, содержащих антитела к амфетамину, вносимых в реакцию. При проведении ИФА пользовались приемом «шахматное титрование», т.е. титрование исследуемых веществ проводили в разных направлениях: горизонтальном и вертикальном. Также определяли минимальный промежуток времени, за который в системе антиген-антитело достигается равновесие. Для установления необходимых параметров проведения ИФА в работе также использовали антивидовые антитела, меченные пероксидазой хрена, которые применяли для выявления комплекса образовавшихся на твердой фазе связавшихся специфических антител с конъюгатом амфетамина. По полученным в ИФА данным исследовали зависимость оптической плотности  $OD_{450}$  от концентрации сорбированного на твердую фазу конъюгата (КА-1) при определенном разведении кроличьей антисыворотки, а также зависимость  $OD_{450}$  от разведения кроличьей антисыворотки при определенной концентрации конъюгата (КА-1), сорбированного на твердую фазу. Затем выбирали линейные участки на полученных кривых титрования и определяли оптимальное соотношение реагентов в ИФА.

В результате были выбраны следующие условия проведения ИФА амфетамина в моче:



- сорбцию (КА-1) выполнили в концентрации 1 мкг/мл;
- рабочее разведение специфических антител составило 1:1600;
- разведение с антивидовых антител, меченных пероксидазой 1:1000;
- время проведения анализа составило 2,5 часа без учета стадии сорбции.

### 3.2.1. Определение чувствительности разработанного твердофазного ИФА определения амфетамина.

На основании данных, полученных при анализе связывания конъюгата (КА-1) с антителами в зависимости от количества присутствующего в пробе свободного амфетамина, строили калибровочную кривую. Результаты этого исследования представлены на рисунке 3. Установлено, что максимальная чувствительность метода составляет 250 нг/мл. При этом

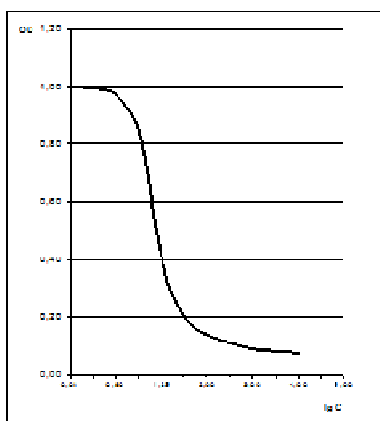


Рисунок 3. Калибровочная кривая для количественного определения амфетамина в моче. По оси абсцисс –  $\lg C$ , где  $C$  - концентрация амфетамина (в мкг/мл); по оси ординат – оптическая плотность (ОП) в ИФА при 450 нм.

каждого из этих соединений определяли концентрацию, при которой происходит 50% торможение взаимодействия антиамфетаминовых антител, меченных ферментом, с антигеном на твердой фазе. Специфичность рассчитывали как выраженное в процентах отношение молярных концентраций исследуемого вещества и исходного гаптена. Результаты изучения специфичности антител к амфетамину, использованных в ИФА, представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Специфичность разработанного метода твердофазного ИФА для определения амфетамина.

Соединение	% ингибирования в ИФА
Амфетамин	100
Метамфетамин	30
D,l-эфедрин	26
Морфин	1,5
D <sup>9</sup> -тетрагидроканнабинол	1,2
Кокаин	1,1
Фенобарбитал	1,2
Кодеин	1,0

ИФА антитела не дают перекрестных реакций с наркотическими и лекарственными препаратами другой химической природы. Разработанный метод анализа амфетамина в моче

50%-ное ингибирование взаимодействия специфических антител, с конъюгатом (КА-1), иммобилизованным в лунках полистирольного планшета, происходит при добавлении 500 нг/мл свободного амфетамина.

### 3.2.2. Определение специфичности разработанного твердофазного ИФА определения амфетамина.

Специфичность ИФА была изучена в тесте конкуренции. Для этого в качестве ингибиторов использовали структурно родственные амфетамину соединения, а также наркотические вещества другой химической природы и ряд психотропных лекарственных препаратов. При этом исследуемые соединения были условно разделены на 2 группы: вещества, являющиеся близкородственными к амфетамину, и вещества, наиболее часто встречающиеся в наркологической практике. Для

каждого из этих соединений определяли концентрацию, при которой происходит 50% ингибирование взаимодействия антител, меченных ферментом, с антигеном на твердой фазе. Результаты изучения специфичности антител к амфетамину, использованных в ИФА, представлены в таблице 4.

Из представленных в таблице 4 данных видно, что антитела реагируют с близкими по структуре соединениями. Вещества, отличающиеся по своей природе от амфетамина, не ингибируют специфическую реакцию взаимодействия антител и антигена даже в концентрации 0,5 мг/мл. Следовательно, разработанный ИФА позволяет определять наркотические вещества амфетаминового ряда, а используемые в качестве реагентов

человека является высокоспецифичным и может быть рекомендован для использования в диагностических целях.

### 3.2.3. Определение воспроизводимости результатов разработанного метода ИФА определения амфетамина.

Для оценки диагностической значимости ИФА используют следующие параметры: чувствительность, специфичность, воспроизводимость и точность. С целью оценки воспроизводимости разработанного метода сравнивали результаты измерений, выполненные в различных условиях (разными экспериментаторами, в разные дни), при этом коэффициент вариации составил 7-10%, а отклонение от стандартной кривой не превышало 2-4%.

Таблица 5.  
Воспроизводимость и точность ИФА определения амфетамина.

Группы сравнения		Концентрация амфетамина, нг/мл		
		100	300	1000
А.	Среднее значение, нг/мл	99	292	1000
	Коэффициент вариации, %	8,4	9,4	7,0
Б.	Среднее значение, нг/мл	100	307	1000
	Коэффициент вариации, %	8,0	7,0	7,8

Обработку цифровых данных проводили методами вариационной статистики. Для расчетов использовали пакет прикладных статистических программ SPSS фирмы SPSS Inc.

В результате выполненных исследований установлено, что твердофазный ИФА определения амфетамина в биологических жидкостях человека, отличающийся высокой чувствительностью,

воспроизводимостью и специфичностью. Время анализа без учета сорбции на планшеты конъюгированного антигена составляет 2,5 часа.

### 3.3. Определение амфетамина в биологических жидкостях разработанным твердофазным ИФА и сравнение полученных результатов с другими методами анализа.

Твердофазный иммуноферментный анализ мочи на наличие амфетамина проводили в 21 образце мочи пациентов, подозреваемых в злоупотреблении этим веществом. С помощью разработанного метода ИФА обнаружено наличие производных амфетамина в 70% исследуемых образцах. В оставшихся 30% анализируемых образцах мочи амфетамин либо отсутствовал, либо содержался в следовых количествах.

Достоверность полученных результатов ИФА была подтверждена данными одновременного определения амфетамина в указанных выше образцах мочи физико-химическим методом газовой хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ГХМС).

Определение наркотических веществ физико-химическими методами проводили совместно с сотрудниками 17 наркологической больницы г. Москвы. Так, анализ образцов мочи пациентов, подозреваемых в злоупотреблении амфетаминными высокочувствительным методом ГХМС показал присутствие амфетамина в 18 исследуемых пробах, что составило 85,7% случаев. Следует отметить, что в 11 образцах мочи (52%) содержались в равных количествах как амфетамин, так и метамфетамин (№№ 3, 4, 6-10, 14, 17, 19, 20), а в 7 образцах мочи (28%) амфетамин находился в концентрации ниже 250 нг/мл (№№ 2, 7, 8, 10, 14, 17, 19, 20). В 4 анализируемых образцах наряду с производными амфетамина дополнительно обнаружено наличие никотина (№№ 11, 13, 16) и селегилина (№ 21).

При сравнении индивидуальных для каждого исследуемого образца результатов ИФА и ГХМС установлены различия в полученных данных (табл. 6). Анализируемые образцы мочи разделены на группы, содержащие и не содержащие амфетамин, что связано с использованием в ИФА антител определенной специфичности. Присутствие в пробе метамфетамина в количестве, в сотни раз превышающем следовые количества амфетамина, дает отрицательную реакцию на амфетамин в ИФА.

Таблица 6.

Исследование образцов мочи методами ИФА и ГХМС.

№ пробы	Результаты исследования методом ИФА	Результаты исследования методом ГХМС	№ пробы	Результаты исследования методом ИФА	Результаты исследования методом ГХМС
1	+	+	12	+	+
2	+	+	13	+	+
3	+	+	14	+	+
4	+	+	15	-	-
5	+	+	16	+	+
6	+	+	17	+	+
7	+	+	18	+	-
8	+	+	19	+	+
9	+	+	20	-	+
10	+	+	21	+	+
11	-	-			

значимости определения их уровня для создания новых методов анализа, используемых в диагностике наркомании.

### 3.4.1. Выделение антител к амфетаминам аффинной хроматографией и исследование их иммунохимических свойств.

Выделение антител к амфетамину из сыворотки крови доноров и больных, употребляющих психостимулирующие препараты амфетаминового ряда, проводили аффинной хроматографией с помощью синтезированных иммуносорбентов. Для их получения к суспензии аминопропилированного стекла, активированного предварительно полинитрофенилакрилатом, добавляли соответствующие количества производного амфетамина - соединения (1). После ковалентного связывания гаптена с макропористым носителем определяли ёмкость полученных сорбентов и использовали их для аффинной хроматографии. Применение аминопропилированного стекла, модифицированного полимером, позволяет минимизировать неспецифическую сорбцию сывороточных белков и получить фракцию аффинно выделенных антител в чистом виде.

Концентрация белка, выделенного из сыворотки крови больных, употребляющих психостимулирующие препараты амфетаминового ряда, находилась в интервале 0,036-0,060 мг/мл, а в сыворотке доноров была равна 0,014-0,030 мг/мл.

#### 3.4.1.2. Определение константы аффинности ( $K_a$ ) для антител против амфетамина.

На следующем этапе с помощью ИФА были исследованы иммунохимические свойства (аффинность и специфичность) выделенных из сыворотки крови людей иммуноглобулинов.

Таблица 7.

Определение  $K_a$  для антител к амфетамину, выделенных из сыворотки крови доноров и больных.

Исследуемый антиген	Диапазон $K_a$ , $M^{-1}$			
	Группа больных		Группа доноров	
	IgG	IgM	IgG	IgM
КА-1	$10^6-10^7$	$10^7-10^{10}$	$10^3-10^4$	$10^3-10^4$

торможения антител ( $I_{50}$ ), связавшихся с иммобилизованным на планшете антигеном.  $K_a = I/I_{50}$ .

Результаты сравнительного исследования показали возможность использования данного метода в медицинской наркологической практике.

### 3.4. Иммуноферментный анализ определения антител к амфетамину и выявление его диагностической значимости.

Следующий раздел диссертационной работы посвящен разработке высокочувствительного ИФА антител к амфетамину в сыворотке людей. Первоначально работа была связана с установлением факта существования таких антител в сыворотке крови наркоманов и выявлением диагностической

Расчет константы аффинности ( $K_a$ ) проводили на основании кривых ингибиторного ИФА, используя в качестве ингибитора амфетамин.  $K_a$  определяли как обратную величину концентрации свободного ингибитора, необходимую для 50%

Обобщенные данные по аффинности антител представлены в таблице 7.

Проведено сравнение аффинности антител, выделенных из сыворотки крови наркоманов и иммунных антител, индуцированных у животных введением конъюгированного антигена амфетамин-белок. Была установлена более высокая  $K_a$  антител, выделенных из сыворотки кроликов ( $10^8-10^{10} M^{-1}$ ) по сравнению с антителами из сыворотки больных наркоманией.

### 3.4.1.2. Изучение специфичности аффинно очищенных антител к амфетамину.

Следующий этап работы включал сравнительный анализ специфичности антиамфетаминовых антител, индуцированных свободным наркотиком у людей. Исследование специфичности таких антител проводили ингибиторным ИФА, причем в качестве ингибиторов использовали амфетамин и соединения структурно родственные амфетамину (метамфетамин, эфедрин, псевдоэфедрин, норэфедрин, центедрин, пиридитол). Специфичность рассчитывали как отношение молярных концентраций амфетамина и исследуемого соединения, вызывающего в ИФА 50% ингибирование.

В результате установлено, что все выделенные из сыворотки крови антитела индивидуальны по своей специфичности и не дают перекрестных реакций с исследованными ингибиторами, отличающимися по структуре от использованного для аффинной хроматографии.

Таким образом, установлено, что по мере развития патологического состояния (наркомании) в организме у больного человека, происходит изменение уровня антител, возрастает их аффинность и способность избирательно связываться с антигенами, предохраняя организм от патогенного воздействия.

### 3.6. Разработка ИФА выявления антител к амфетамину у больных, употребляющих психостимулирующие препараты амфетаминового ряда.

Выбор оптимальных условий проведения ИФА был сделан на основании данных, полученных при использовании пула сыворотки наркоманов и здоровых доноров. Для выявления уровня иммуноглобулинов у наркоманов готовили пул из 50 образцов сыворотки больных, употребляющих психостимулирующие

Таблица 8.  
Специфичность (%) антиамфетаминовых антител, выделенных из сыворотки крови больных, употребляющих психостимулирующие препараты амфетаминового ряда.

№ сыворотки	Изотип Ig	Название соединения				
		амфетамин	метамфетамин	эфедрин	псевдоэфедрин, норэфедрин, центедрин, пиридитол	
1	IgG	100	100	-.*	-	
	IgM	100	-	-	-	
2	IgG	100	100	-	-	
	IgM	100	-	-	-	
3	IgG	12	100	17	-	
4	IgM	100	0,2	1,4	-	
5	IgG	100	1	0,1	-	
6	IgM	-	10	100	-	
7	IgG	100	0,14	0,11	-	
	IgM	100	25	1	-	
8	IgG	100	100	100	-	
9	IgM	100	0,1	-	-	
10	IgG	100	-	-	-	
	IgM	100	-	-	-	

\*специфичность составляет менее 0,001%

препараты амфетаминового ряда, с точно установленным клиническим диагнозом. Пул здоровых доноров был составлен из 300 образцов сыворотки крови практически здоровых людей.

На первом этапе разработки ИФА исследовали влияние структуры антигена, используемого для сенсibilизации планшет, а также его концентрации на определение иммуноглобулинов, связывающих конъюгат амфетамина с белком, в сыворотке крови людей. В качестве антигенов использовали конъюгированные антигены амфетамина с овальбумином: (КА-1) и (КА-2).

При анализе полученных зависимостей установили, что в интервале концентраций сорбируемых антигенов от 40 до 0,5 мкг/мл наблюдается линейная зависимость  $OD_{450}$  в ИФА от концентрации антигена. Кроме того, оказалось, что значения  $OD_{450}$  в ИФА при использовании пула сыворотки крови наркоманов существенно отличались от таковых для доноров. С учетом этих результатов были выбраны следующие концентрации антигена: 2 мкг/мл для конъюгата (КА-1) и 10 мкг/мл для конъюгата (КА-2).

Следует отметить, что при использовании для сенсibilизации планшет конъюгата (КА-1) разница в значениях  $OD_{450}$  в ИФА между пулом сыворотки больных и доноров была значительно большей, чем для конъюгата (КА-2). Поэтому дальнейшие исследования проводили на планшетах, сенсibilизированных раствором конъюгата (КА-1).

Для определения оптимального разведения сыворотки оценивали диапазон разведений, в котором наблюдается титрование иммуноглобулинов, связывающих конъюгат (КА-1). На рисунке 4 представлены кривые титрования пула нормальных (донорских) сывороток (кривая 1) и пула сывороток больных-наркоманов, содержащих иммуноглобулины, связывающиеся с конъюгатом амфетамина с белком (кривая 2) при разведении сыворотки 1:100.

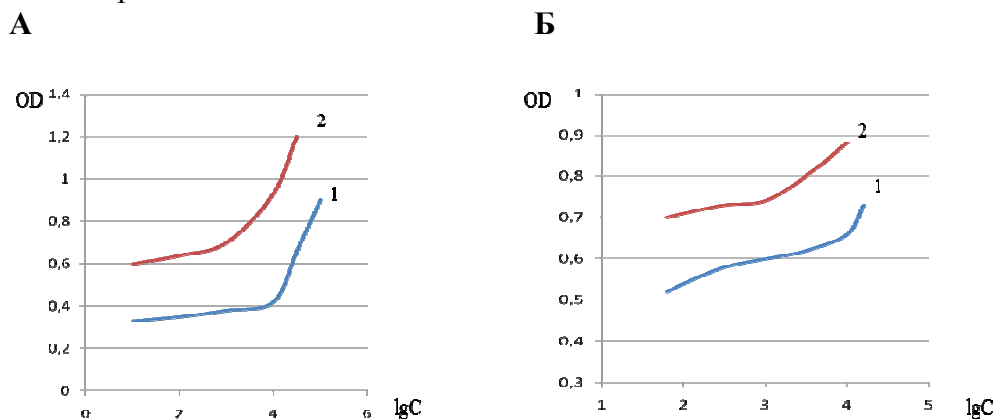


Рисунок 4. Кривые титрования сыворотки крови человека в ИФА. Где (1) – сыворотка крови доноров, (2) - сыворотка крови больных, употребляющих психостимулирующие препараты амфетаминового ряда, А – титрование иммуноглобулинов М-класса, Б – титрование иммуноглобулинов G-класса.

В таблице 9 приведены обобщённые данные, полученные при анализе результатов подбора условий выполнения ИФА для определения антител к амфетамину, на основании которых выбирали область линейной зависимости величины поглощения в ИФА, как от концентрации исследуемого антигена, так и от разведения анализируемой сыворотки.

Таблица 9.

Условия проведения ИФА для определения антител к амфетамину в анализируемых образцах сыворотки крови.

Исследуемый антиген, содержащий в качестве гаптена:	Изотип иммуноглобулинов	Интервал разведения сыворотки	Интервал концентрации сорбируемого антигена, мкг/мл
Амфетамин	IgM	1:200 – 1:800	0,5 – 2
	IgG	1:100 – 1:600	0,5 – 2

Далее с помощью разработанного ИФА мы провели анализ содержания иммуноглобулинов, связывающихся с конъюгатом (КА-1), у 50 больных наркоманией и 300 доноров. Все полученные данные обрабатывали, используя методы вариационной статистики.

Причём у 60% доноров установлено наличие антител класса IgG и только в

единичных случаях (10%) одновременно присутствовали IgM и IgG антитела. У 30% доноров в выделенной из сыворотки фракции не удалось идентифицировать в ИФА принадлежность к конкретному классу иммуноглобулинов.

Обобщенные результаты исследования представлены на рисунке 5.



Рисунок 5. Процентное соотношение выделенных антител из сыворотки доноров.

При исследовании изотипического состава антител против амфетаминов, выделенных из сыворотки крови больных, употребляющих препараты амфетаминового ряда, обнаружены значительные отличия по сравнению с донорами. Из каждого образца хроматографированы антитела к амфетамину IgG и IgM класса.

Для того, чтобы установить количество больных с достоверно повышенным уровнем иммуноглобулинов по сравнению с донорами, за величину порогового уровня, разделяющего нормальные и аномальные сыворотки, принимали

полученные в серии тестов среднее значение для нормальной сыворотки плюс трехкратное значение стандартного отклонения. Как видно из данных, приведенных на рисунке 5, достоверно повышенный уровень иммуноглобулинов наблюдается в группе больных, употребляющих психостимулирующие препараты амфетаминового ряда, по сравнению с группой доноров в среднем в 70% случаев. При обследовании сывороток крови лиц, злоупотребляющих амфетаминами, процент выявления ИФА повышенного уровня специфических иммуноглобулинов колебался в диапазоне от 65 до 74%. Следует подчеркнуть, что в ряде случаев у одних и тех же лиц наблюдался повышенный уровень как IgM, так и IgG классов, и только у небольшого числа лиц (15±3% от общего количества) выявляемые иммуноглобулины относились только к G-классу или только к M-классу.

### 3.6.1. Определение диагностической значимости разработанного ИФА выявления антиамфетаминовых антител в сыворотке крови людей.

На первом этапе работы для обследованной группы наркоманов провели выявление антител к амфетамину твердофазным ИФА. Из полученных результатов определили количество больных, имеющих по сравнению с донорами достоверно повышенный уровень иммуноглобулинов к данному антигену. Для сопоставления результатов ИФА с клиническими данными обследовано 27 человек. Результаты сопоставления диагнозов с результатами иммунологического исследования сывороток имело место в 90% случаев. Применение разработанного способа диагностики позволило дополнительно к клиническому обследованию выявить несколько лиц, злоупотребляющих амфетаминами (испытуемые № 12, №18, а также № 55 и № 60). Был поставлен под сомнение факт длительной ремиссии (более 4 мес.) у больных № 19, № 39, № 61. Результаты анализа для больных этой группы представлены в таблице 10.

Таблица 10.

Сопоставление клинических диагнозов с результатами тестирования сывороток с помощью разработанного метода ИФА определения антител к амфетамину.

Обследованные больные	Оптическая плотность сыворотки больного	Результаты анализа, выраженные в условных единицах	Оценка результата	Клинический диагноз	Обследованные больные	Оптическая плотность сыворотки больного	Результаты анализа, выраженные в условных единицах	Оценка результата	Клинический диагноз
№ 19	0,75	1,2	+	Н(А)	№ 18	0,63	0,85	±	- “ -
№ 29	0,65	0,86	+	- “ -	№ 31	0,64	0,88	+	Н(А)
№ 59	0,51	0,47	+	- “ -	№ 14	0,64	0,88	+	- “ -
№ 39	0,59	0,74	+	- “ -	№ 3	0,63	0,86	+	- “ -
№ 37	0,65	0,91	+	- “ -	№ 45	0,71	1,08	+	- “ -
№ 30	0,69	0,97	+	- “ -	№ 7	0,48	0,41	±	Токс
№ 25	0,52	0,53	+	- “ -	№ 42	0,43	0,26	-	- “ -
№ 56	0,61	0,79	+	- “ -	№ 6	0,54	0,58	-	Алк
№ 61	0,82	1,4	+	- “ -	№ 68	0,42	0,23	-	- “ -
№ 67	0,75	1,02	+	- “ -	№ 12	0,47	0,38	±	- “ -
№ 50	0,64	0,88	+	ПН	№ 8	0,65	0,91	+	Н(А)
№ 60	0,47	0,38	±	- “ -	№ 5	0,47	0,38	±	- “ -
№ 55	0,46	0,35	±	- “ -	№ 9	0,72	1,17	+	- “ -
№ 28	0,41	0,23	-	Н(Г)					
					Ср. дон.	0,34			

Где Н(А) - Наркомания (амфетамины), Н(Г) – наркомания (гашишная), ПН – полинаркомания, Алк – алкоголизм, Токс – токсикомания.

Наличие антител к амфетаминам в анализируемых образцах, определяемое данным методом, выражают в усл. ед. и рассчитывают по формуле:

$(\text{ОП анал. обр.} - \text{ОП отр.})$

ОП отр.

где ОПанал - среднее значение оптической плотности в лунке с анализируемым образцом, ОПотр - среднее значение оптической плотности в лунке с отрицательным контрольным образцом.

### 3.7. Разработка ИФА выявления иммуноглобулинов человека, связывающих конъюгат амфетамина с белком в слюне. Определение диагностической значимости разработанного метода.

Для разработки ИФА выявления иммуноглобулинов человека, связывающих конъюгат амфетамина с белком в слюне, обследовали группу больных с наркотической зависимостью (22 человека) и группу здоровых доноров (20 человек).

На первом этапе работы для выбора условий выполнения ИФА для определения антител к конъюгату амфетамина исследовали влияние различных концентраций сорбируемого антигена и разведений слюны на уровень выявления антител, относящихся к иммуноглобулинам человека класса А против амфетамина.

Анализ результатов зависимости изменения оптической плотности в ИФА от различных концентраций иммобилизованного антигена показал возможность работы в диапазоне от 2.5 мкг/мл до 5 мкг/мл для конъюгатов амфетамина. Для использованных разведений слюны область линейной зависимости в ИФА с учетом выбранных концентраций антигена находится в интервале от 1:4 до 1:40.

Однако наиболее значительная достоверная разница при определении оптической плотности в ИФА образцов слюны доноров и больных наркоманией обнаружена при сорбции конъюгированного антигена 3 мкг/мл и разведении слюны 1:20.

Таблица 11.

ИФА определения антител класса А к производным амфетамина в слюне больных наркоманией.

№ больных	Стаж наркотизации, лет	Значения оптической плотности (ОП <sub>450</sub> )	sIgA (мкг/мл)	Общий белок (мг/мл)
1.	2	0,756 +	214,0	0,86
2.	1,5	1,008 +	2707,0	3,94
3.	3	0,537	174,0	1,03
4.	3	0,711 +	327,3	0,78
5.	5	0,651 +	349,6	0,96
6.	6	0,605 +	443,8	1,01
7.	7	0,698 +	608,3	1,54
8.	6,5	0,764 +	487,7	1,80
9.	6	0,690 +	1041,7	2,10
10.	7	0,459	745,0	2,60
11.	8	0,490	517,6	2,72
12.	7	0,444	638,9	2,80
13.	8	0,522	622,1	2,31
14.	9	0,468	528,0	3,05
15.	9	0,483	601,0	3,20
16.	8	0,546 ±	14,1	2,40
17.	6	0,458	658,3	2,95
18.	9	0,285	407,9	3,62
19.	8	0,545 ±	14,7	3,81
20.	11	0,378	58,6	0,98
21.	12	0,300	69,4	0,60
22.	11	0,345	57,0	0,81
		Среднедонорское значение ОП <sub>450</sub> ± стандартное отклонение М ± σ; 0,39 ± 0,037; 3σ = 0,111	Среднестатистическая норма у здоровых людей 68 ± 8 мкг/л	Среднестатистическая норма у здоровых людей 0,82 – 1,58 г/л

Для определения диагностической значимости разработанного метода в индивидуальных образцах слюны больных наркоманией провели одновременное определение специфических IgA антител к производным амфетамина твердофазным ИФА и содержания секреторного IgA.

Анализ выполняли с учетом выбранных ранее оптимальных условий. Из полученных результатов анализа определили количество больных, имеющих по сравнению с донорами, достоверно повышенный уровень иммуноглобулинов к данному антигену. Результаты определения специфических IgA для больных этой группы представлены в таблице 11.

Положительные результаты образцов слюны при исследовании на содержание специфических антител А класса были получены у больных, употребляющих производные амфетамина. При этом достоверно повышенный уровень специфических антител по исследованному антигену обнаружен у пациентов №№ 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 (в таблице 11 отмечены знаком «+»). Для этой же группы характерно увеличение и общего sIgA.

Определения антител IgA класса к исследованному антигену у больных № 16 и № 19 (в таблице 11 отмечены знаком «±») не дали достоверных результатов.

Определение иммуноглобулинов класса А, связывающих производные амфетамина, в слюне больных наркоманией выполнено впервые. Проведено сравнительное определение содержания данных иммуноглобулинов, концентрации sIgA и общего белка слюны.



## Выводы

1. Получены новые конъюгированные антигены на основе производных амфетамина и белка. Выбраны оптимальные варианты синтеза данного конъюгата для разработки иммуноферментного анализа амфетамина и антител к нему с различным соотношением гаптена и белка.

2. Разработаны условия проведения твердофазного иммуноферментного анализа определения амфетамина в моче человека с использованием различных вариантов иммунохимических реагентов. Концентрация иммобилизованного антигена составляла 2,5 мкг/мл, а разведение сыворотки – 1:1600.

3. Установлена диагностическая значимость разработанного иммуноферментного метода при проведении сравнительного определения амфетамина в моче разработанным иммуноферментным методом и хроматографическим способом.

4. Синтезированы сорбенты для аффинной хроматографии, проведено выделение антител к амфетамину из сыворотки крови больных, употребляющих препараты амфетамина, и доноров. Исследованы их иммунохимические свойства:  $K_a = 10^6$ - $10^7$  для больных и  $10^3$ - $10^4$  для доноров.

5. Разработан иммуноферментный метод определения антител к амфетамину в биологических жидкостях человека. Оптимизированы условия проведения анализа иммуноглобулинов класса М и А в сыворотке крови и слюне человека на основе использования новых синтетических антигенов.

6. Проведен сравнительный анализ содержания специфических антител к амфетамину в биологических жидкостях человека. Показана взаимосвязь клинического диагноза с их уровнем и установлена практическая значимость разработанных вариантов иммуноферментного анализа.

**Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:**

1. Киселева Р.Ю. Разработка иммуноферментного анализа иммуноглобулинов класса А связывающих производные амфетамина в слюне больных наркоманией / Киселева Р.Ю., Петроченко С.Н., Мягкова М.А., Брюн Е.А. // Вопросы наркологии. – 2009 № 1. – С. 30-36
2. Киселева Р.Ю. Разработка иммуноферментного анализа амфетаминов в биологических жидкостях человека / Киселева Р.Ю., Мягкова М.А., Шакир И.В., Брюн Е.А., Морозова В.С. // Биотехнология – 2010. - №6- с.89-93.
3. Киселева Р.Ю. Сравнительный анализ выявления амфетаминов методом ИФА и газовой хроматографии с масс-спектрометрической детекцией / Киселева Р.Ю., Мягкова М.А., Анохин Л.А., Петроченко С.Н., Смирнов А.В., Морозова В.С., Брюн Е.А. // Судебно-медицинская экспертиза. – 2010. – № 2-с.42-44.
4. Киселева Р.Ю. Новая технология раннего выявления потребителей психоактивных веществ методом «Дианарк» для диагностики наркомании и других заболеваний зависимости / Киселева Р.Ю., Мягкова М.А., Петроченко С.Н., Абраменко Т.В. // «Материалы VII Всероссийского конгресса «Профессия и здоровье». Москва 25-27 ноября 2008 г. Тезисы докладов. – С.567-568.
5. Киселева Р.Ю. Новый подход в диагностики заболеваний зависимости на основе иммуноферментного анализа естественных антител к эндогенным биорегуляторам / Киселева Р.Ю., Мягкова М.А., Петроченко С.Н., Морозова В.С., Шипицын В.В., Соколичик Е.И., Брюн Е.А.//Здравоохранение и медицинские технологии. – 2008. – № 5. – 20-22.
6. Киселева Р.Ю. Иммуноферментный анализ иммуноглобулинов класса А связывающих производные амфетамина в слюне больных наркоманией / Киселева Р.Ю., Шакир И.В., Петроченко С.Н., Мягкова М.А., Брюн Е.А. //Материалы Первого Московского международного Конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» Москва 2009. 16-20 марта.
7. Киселева Р.Ю. Определение специфических IgA антител в слюне больных наркоманией для оценки иммунного статуса. / Киселева Р.Ю., Петроченко С.Н., Мягкова М.А., Левашова А.И., Гордюшенко В.В., Шакир И.В. // VII съезд аллергологов и иммунологов СНГ II Всемирный форум по астме и респираторной аллергии. – С.-Петербург. – 2009, 26-28 апреля. // Аллергология и иммунология.– 2009. – Том 10. – № 2. – С. 265.
8. Киселева Р.Ю. Инновационный метод диагностики заболеваний зависимости на основе иммуноанализа /Киселева Р.Ю., Мягкова М.А., Петроченко С.Н., Гордюшенко В.В., Морозова В.С. //Сборник трудов Восьмой международной научно-практической конференции «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности» 2009. – С.-Петербург, 27-28 октября. С. 215-216.
9. Киселева Р.Ю. Инновационный метод диагностики заболеваний зависимости на основе иммуноанализа / Киселева Р.Ю., Петроченко С.Н., Морозова В.С. Мягкова М.А. // Материалы научно-практической конференции "Современные аналитические задачи определения наркотиков, лекарственных средств и других компонентов в различных матрицах», Москва, 20 мая 2010
10. Киселева Р.Ю. Современные методы оценки иммунного статуса для диагностики заболеваний зависимости на основе иммуноанализа /Киселева Р.Ю., Петроченко С.Н., Постоюк Н.А., Брюн Е.А., Мягкова М.А. // Материалы Конгресса «Человек и проблемы зависимости», Архангельск, 28-29 апреля 2010.
11. Киселева Р.Ю. Разработка методов диагностики заболеваний зависимости на основе оценки иммунного статуса // Материалы 6 Российской конференции «Нейроиммунопатология», Москва. 1-2 июня, 2010.
12. Kiselyova, R. Y.; Myagkova, M. A.; Shakir, I. V.; Bryun, E. A.; Morozova, V. S. Development of Enzyme Immunoassay of Amphetamines in Human Biological Fluids. / Kiselyova, R. Y.; Myagkova, M. A.; Shakir, I. V.; Bryun, E. A.; Morozova, V. S. //Appl. Biochem. Microbiol. 2011, 47, 707-710.
13. Медицинская технология «Метод раннего выявления потребления наркотических веществ «Дианарк» для предупреждения наркомании». Учреждения разработчики: МНПЦ наркологии ДЗ г. Москвы, ИФАВ РАН, г. Черноголовка Моск. обл., ООО «Диамедика», г. Москва – 2010.