

На правах рукописи
УДК: (616.15+616-003.261) - 074 - 091.818:340.6

Асташкина Ольга Генриховна

**«Выявление наркотических веществ группы опиатов
методом иммуноферментного анализа
при гнилостной трансформации трупа»**

14.00.24 - судебная медицина

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва - 2004 г.

Работа выполнена в государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский Государственный медико-стоматологический университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Заслуженный врач РФ, доктор медицинских наук, профессор В.В.Жаров

Официальные оппоненты:

Заслуженный врач РФ, доктор медицинских наук, профессор, Юлий Иванович Соседко
доктор медицинских наук, профессор, Юрий Дмитриевич Гурочкин

Ведущая организация:

Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. академика И.П. Павлова

Защита состоится _____ **2004 года в** _____ **часов на**

заседании диссертационного совета Д208.041.04 при государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский Государственный медико-стоматологический университет» Министерства Здравоохранения РФ (Москва, ул. Долгоруковская, д.4; почтовый адрес: Москва, ул. Делегатская, д.20/1, 127473)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский Государственный медико-стоматологический университет» Министерства Здравоохранения РФ (127206, Москва, ул. Вучетича, д. 10а).

Автореферат разослан _____ 2004 года.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,
кандидат медицинских наук, доцент

Т.Ю. Хохлова

Актуальность исследования.

В России в настоящее время наркоманией страдает более 1 млн. человек и число лиц, употребляющих наркотические средства, за последние годы постоянно увеличивается (Кузьминых К.С., Бабаханян Р.В., 1998, Лисовская СБ., 2000, Александрова Л.Г. с соавт, 2001; Мелентьев А.Б. с соавт. 2001). Из общего числа насильственной смерти отравления составляют в среднем 23% (Мельникова Е.Ю., 2002). Проблема наркомании принимает угрожающие масштабы, растущее разнообразие наркотических и одурманивающих средств способствует вовлечению в свой мир все большего количества людей, как правило, молодого и юного возраста (Кригер О.В., Могутов СВ., Бутовский с соавт., 2001; Колкутин В.В., Соседко Ю.И., Пиголкин Ю.И., с соавт, 2002). Перестали быть редкостью случаи острого отравления наркотиками детей до 14 лет (Мельникова Е.Ю., 2002). Постоянным спутником наркомании являются такие страшные заболевания как ВИЧ и гепатиты В, С и некоторые другие, передающиеся парентеральным путем (Кригер О.В., с соавт. 2001; Каниболоцкий А.А., с соавт. 2003, Lange WR. et al, 1990). По данным зарубежных исследователей большой процент потенциальных доноров злоупотребляет наркотиками (Mahl MA, Hirsch M, Sugg U., 2000; Peters FT, Maurer NN, Hellstern P., 2003).

Повышение уровня отравлений и смертности от передозировки наркотических средств влечет за собой увеличение количества судебно-химических экспертиз. Одним из распространенных наркотических средств, возможно, более доступным для населения, злоупотребляющего наркотиками, является морфин, представитель группы опиатов.

Диагностика наркомании у живых лиц не представляет большой проблемы вследствие широкого выбора исследуемого материала. Гораздо больше затруднений возникает при судебно-медицинской экспертизе трупов в связи с тем, что, как правило, отсутствует катamnестические данные и подробные сведения об обстоятельствах дела. При проведении

судебно-медицинской экспертизы достаточно часто секционное исследование проводится спустя некоторое время после смерти (на 1-е, 2-е, 3-е сутки), в отдельных случаях и через значительно больший промежуток времени. В связи с этим, судебно-медицинские эксперты нередко исследуют трупы, подвергшиеся гнилоственному разложению, что значительно затрудняет постановку диагноза. По данным Российского центра судебно-медицинской экспертизы за 2003 год на территории РФ было зарегистрировано 57 тыс. гнилостно измененных трупов с неустановленной причиной смерти.

Таким образом, возникают- определенные проблемы, связанные с исследованиями частично или полностью путрифисцированного биологического материала. Многие эксперты лабораторной службы не считают возможным исследовать такие объекты, мотивируя свой отказ недостоверностью возможных результатов.

Традиционные методы определения наркотиков в трупном материале при проведении судебно-медицинской экспертизы включают хроматографические методы анализа, такие как тонкослойная хроматография (ТСХ), газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ/МС), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) (Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В., 1993). Эти методы требуют пробоподготовки образца и занимают много времени (обычный срок исполнения судебно-химической экспертизы на наличие наркотических веществ составляет до 1 месяца по данным Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента Здравоохранения г. Москвы). Для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) требуется кровь и моча, не нуждающиеся в специальной пробоподготовке. Срок исполнения экспертизы значительно меньше (до 1 дня), чувствительность и специфичность метода достаточно высоки, чтобы применять ИФА на предварительном этапе судебно-медицинского исследования (Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В., 1993).

Вопрос сохранности наркотических веществ группы опиатов в трупном материале изучен недостаточно, данные литературы противоречивы. Концентрация общего морфина и кодеина в моче при хранении в замороженном состоянии при -20°C была стабильна в течение года (Dugan S. et al., 1994). Содержание общего морфина и кодеина в моче снижается на 10-40% в течение 11 мес при хранении охлажденными до $4-8^{\circ}\text{C}$ или замороженными при -15°C , при этом концентрация свободных морфина и кодеина постоянно возрастает (Веселовская Н.В., Коваленко А.Е., 2000). В комнатных условиях ($25-30^{\circ}\text{C}$) за 11 мес концентрация общего морфина может уменьшиться на 70-100%, а концентрация свободного морфина меняется непредсказуемо (в зависимости от рН, наличия бактерий, концентрации конъюгатов), значительно увеличиваясь в некоторых образцах мочи в течение 30-90 дней хранения (Lin DL, et al, 1995). Морфин свободный и морфин конъюгированный стабильны в образцах мочи и крови в течение 10 дней хранения при температуре 4°C , $18-22^{\circ}\text{C}$ и 37°C (Веселовская Н.В., Коваленко А.Е., 2000).

По данным литературы, есть возможность использования биохимических показателей при постановке диагноза наркотической интоксикации - определение концентрации глюкозы, гликогена и миоглобина (Павленко Е. Ю., с соавт. 2003). Помимо этого, при длительном злоупотреблении наркотическими препаратами, возможны полиорганные нарушения, которые можно выявить на основании изменений концентраций мочевины, креатинина. В моче возможно качественное выявление билирубина, уробилиногена и ацетона, что также способствует диагностике нарушений функциональной активности печени и почек. Обнаружение рядом с трупом приспособлений для инъекций наводит на мысль о злоупотреблении наркотиками, однако, не исключена возможность наличия сахарного диабета у потерпевшего. Для диагностики данного заболевания необходимо проводить исследование гликозилированного гемоглобина, глюкозы и ацетона. Активность

холинэстеразы также, по литературным данным, может свидетельствовать об употреблении морфина - морфин угнетающе воздействует на данный показатель (Смусин Я.С., 1980).

Таким образом, представляется весьма актуальным исследование трупного материала при наличии гнилостных изменений методом иммуноферментного анализа с сопоставлением результатов указанного метода с данными стандартных судебно-химических методов и с использованием биохимических показателей для уточнения диагноза наркотической интоксикации.

Цель работы: применить метод иммуноферментного анализа для выявления наличия наркотических веществ группы опиатов в крови и моче при гнилостной трансформации и разработать критерии экспертной оценки наркотической интоксикации по биохимическим показателям органов и тканей.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи.

Задачи исследования:

1. Провести исследование крови и мочи из трупов методом иммуноферментного анализа и тонкослойной хроматографии, газовой хромато-масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии для сравнения полученных результатов по наличию наркотических веществ группы опиатов.

2. Провести иммуноферментное исследование крови и мочи из трупа, содержащей опиаты, в условиях хранения материала при температуре +4°C в течение 6 мес (1 день, 1 неделя, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 26 недель) и при температуре +18-20°C в течение 6 мес (1 день, 1 неделя, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 26 недель).

3. Провести иммуноферментное исследование крови и мочи из трупа, не содержащей опиаты, в условиях хранения материала при температуре +4°C в течение 6 мес (1 день, 1 неделя, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 26 недель) и

при температуре +18-20°C в течение 6 мес (1 день, 1 неделя, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 26 недель).

4. Оценить влияние пробоподготовки трупного материала с элементами гемолиза и гниения (центрифугирование в течение 10 мин при 3 тыс. об/мин) на результаты иммуноферментного анализа.

5. Оценить антиокислительную активность крови и мочи с элементами путрификации с наличием опиатов и без таковых.

6. Оценить изменение биохимических показателей (глюкозы, мочевины, креатинина, миоглобина, гликогена, активности холинэстеразы, гликированного гемоглобина) в крови, моче, перикардиальной жидкости, печени, миокарде, скелетной мышце при наличии опиатов.

Научная новизна.

Впервые в судебно-медицинской практике применен метод иммуноферментного анализа с использованием диагностикума для обнаружения опиатов при гнилостных изменениях крови и мочи. Доказано, что гнилостное разложение объектов (кровь и моча) в сроки до 6 месяцев при хранении объектов при температуре +4 С и при температуре +18-20 С не препятствует установлению наличия опиатов.

Впервые проведено исследование методом хемилюминесценции трупного материала, содержащего опиаты и раствора морфина.

Впервые для обоснования диагноза наркотической интоксикации использованы биохимические показатели - содержание глюкозы, гликогена, мочевины, креатинина, миоглобина, активности холинэстеразы, гликозилированного гемоглобина, билирубина, ацетона, уробилиногена в крови, моче, перикардиальной жидкости, печени, миокарде, скелетной мышце. Доказана возможность использования указанных показателей также для диагностики сахарного диабета.

Практическая значимость. В процессе исследования методом иммуноферментного анализа при гнилостной трансформации получены результаты, позволяющие давать предварительную оценку наличия или

отсутствия наркотических веществ группы опиатов в исследуемом материале (кровь и моча). Разработана схема комплексной оценки биохимических показателей трупного материала (крови, мочи, печени, миокарда, скелетной мышцы, перикардиальной жидкости), что позволяет провести посмертную диагностику сахарного диабета и наркотической интоксикации. Даны практические рекомендации по хранению и исследованию экспертного материала.

На защиту выносятся положения:

1. Иммуноферментный анализ с использованием диагностикума обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Указанное положение подтверждено с помощью стандартных химических методов (тонкослойной хроматографии, газовой хромато-масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии), примененных для выявления наркотических веществ группы опиатов.
2. Иммуноферментный анализ информативен при выявлении наличия опиатов в крови и моче с гнилостными изменениями при хранении трупного материала при температуре +4 С и при температуре +18-20 С.
3. Пробоподготовка в виде центрифугирования в течение 10 мин при 3 тыс. оборотов/мин достоверно не влияет на результаты иммуноферментного анализа.
4. Проведение комплексной оценки биохимических показателей крови, мочи; перикардиальной жидкости, печени, миокарда и скелетной мышцы способствует постановке диагноза наркотической интоксикации и позволяет исключить диагноз сахарного диабета при подозрении на наркоманию.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены и обсуждены на 2-ой Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы судебной биохимии» (Санкт-Петербург, 2003), на заседании научного общества судебных химиков Российского Центра судебно-медицинской экспертизы (2004), на совместном заседании

кафедры судебной медицины МГМСУ, 9-ого танатологического отделения и химического отделения Бюро СМЭ ДЗ Москвы.

Внедрение в практику. Результаты, полученные в ходе проведения диссертационного исследования, внедрены в практическую деятельность Бюро судебно-медицинской экспертизы ДЗ г. Москвы.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 научных статей. Получена приоритетная справка №2004109841.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена в 1 томе на 135 страницах компьютерного текста и состоит из введения, 5 глав, выводов и практических рекомендаций, списка литературы, включающего 153 источника. (73 отечественных и 80 зарубежных авторов), приложений 1 и 2, иллюстрирована 17 таблицами и 47 рисунками.

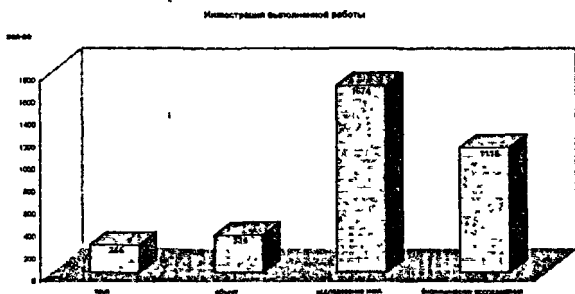
Материалы и методы исследования.

Работа была выполнена на экспертном материале Бюро Судебно-медицинской экспертизы Департамента Здравоохранения г. Москвы.

В работе было проведено 1674 исследования методом иммуноферментного анализа 334 объектов (кровь и моча), а также 1118 биохимических исследований крови, мочи, печени, миокарда, скелетной мышцы, жидкости из полости перикарда.

Объекты были получены от 245 трупов лиц в возрасте от 16 до 75 лет. Количество трупов мужского пола 186, женского - 59. Давность смерти составляла от 1 до 3 дней.

Рис.1 Материалы и исследования.



Наибольшее количество случаев выявления наркотических веществ группы опиатов (66%) наблюдается в возрастном диапазоне 20-29 лет. Значительно большее, количество случаев обнаружение опиатов приходится на долю мужской половины населения.

В работе были использованы следующие методы:

1. Метод иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием диагностикума для обнаружения в крови и моче наркотических веществ группы опиатов.
2. Газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС) - метод определения наркотических веществ, использован для сравнения результатов ИФА.
3. Тонкослойная хроматография (ТСХ) - метод определения наркотических веществ, использован для сравнения результатов ИФА.
4. Высокоэффективная жидкостная хроматография — метод исследования мочи, на наличие наркотических веществ, использован для сравнения результатов ИФА.
5. Антроновый метод определения гликогена по Рою и Моррису в модификации Зейфтера.
6. Глюкозооксидазный метод определения глюкозы.
7. Метод определения мочевины в реакции с диацетилмонооксимом и метод определения креатинина по цветной реакции Яффе с использованием реактивов фирмы «Lachema».
8. Метод определения миоглобина в реакции пассивной гемагглютинации.
9. Спектрофотометрический метод определения концентрации гликозилированного гемоглобина.
10. Хемилюминесцентный метод определения антиокислительной активности биологического материала в модельной системе гемоглобин-люминол-перекись водорода (Нв-ЛМ-Н₂O₂).
11. Методы статистической обработки данных.

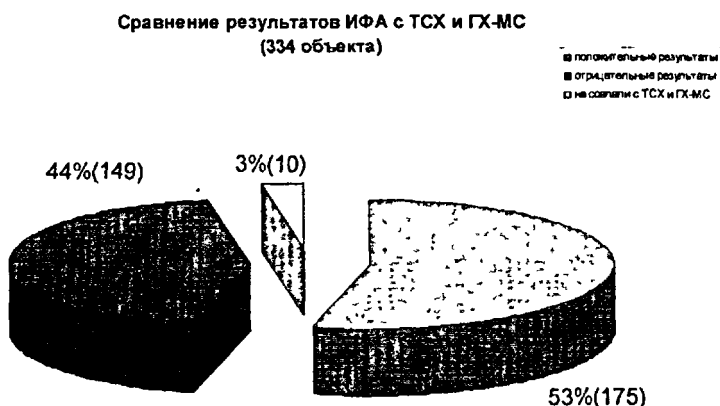
Результаты исследования.

Определение опиатов методом иммуноферментного анализа при гнилостной трансформации. Сопоставление результатов с данными тонкослойной хроматографии и газовой хромато-масс-спектрометрии.

Все образцы трупного материала были исследованы методом тонкослойной хроматографии, газовой хромато-масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (моча) и методом иммуноферментного анализа.

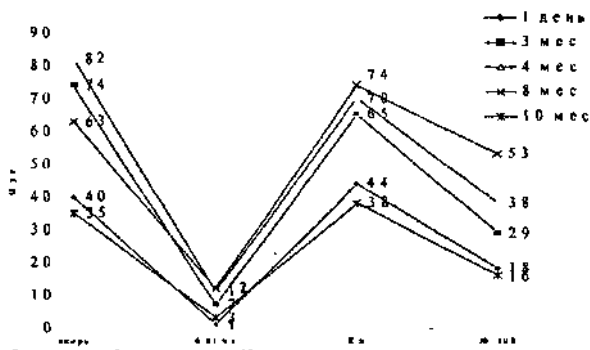
В 97% случаев результаты, полученные методом ИФА, совпали с данными тонкослойной хроматографии и газовой хромато-масс-спектрометрии. Только в 3% случаев результаты, полученные методом ИФА, не совпали с результатами указанных методов (рис 2). Поскольку метод ИФА позволяет определять пикограммовые количества веществ, допустимым является вариант выявления минимальных количеств опиатов в объекте исследования, которые не могут быть обнаружены стандартными методами за счет более низкой чувствительности.

Рис.2. Сравнение результатов ИФА с ТСХ и ГХ-МС.



После исследования указанными методами, были отобраны 87 объектов, содержащих опиаты и 47 объектов, не содержащих опиаты, которые хранили при температуре +18-20° С и при температуре +4° С в течение 6 месяцев (около 26 недель), проводя определение наркотических веществ группы опиатов методом иммуноферментного анализа через 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 26 недель. На рис. 3 показана воспроизводимость метода иммуноферментного анализа (кривая эксперимента повторяется из раза в раз).

Рис.3. Воспроизводимость метода иммуноферментного анализа.



Оценку наличия опиатов проводили по значению оптической плотности (А). Учет результатов производили спектрофотометрически при длине волны 492 нм. Реакцию считали положительной, если оптическая плотность исследуемого образца равна или ниже А стандартного раствора, что соответствует содержанию веществ группы опиатов в опытном образце не менее 300 нг/мл. В каждом эксперименте участвовал отрицательный контроль (специфические антиморфиновые антитела), положительный контроль (стандартный раствор морфина 6 нг/мл), модельная система (контрольная моча, в которой заведомо отсутствуют опиаты). Значения А исследуемых объектов необходимо сравнивать со значениями А указанных параметров ИФА для правильной оценки полученных результатов.

В таблице 1 представлены данные по выявлению опиатов в трупном материале в течение 6 мес по значению оптической плотности в виде ($M+m$) с указанием достоверности. M_1 и m_1 характеризуют группу объектов, где опиаты обнаружены не были, M_2 и m_2 соответственно относятся к группе с выявленным наличием опиатов.

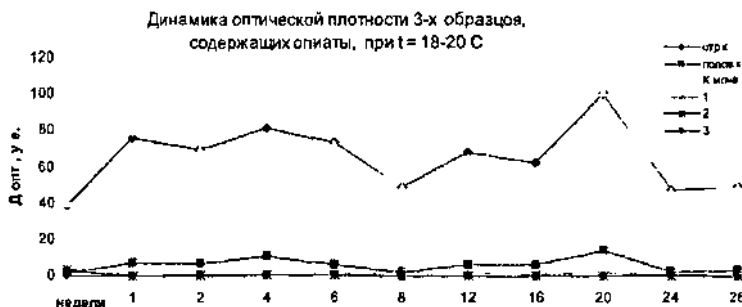
Таблица 1. Средние значения оптической плотности при исследовании объектов методом ИФА.

| №№ | срок | $M_1(A \times 100)$ | $m_1(A \times 100)$ | Достоверность | $M_2(A \times 100)$ | $m_2(A \times 100)$ | Достоверность |
|----|------|---------------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------|
| 1 | 1д | 47.04 | 1.19 | $p < 0.001$ | 0.71 | 0.12 | $p < 0.001$ |
| 2 | 1н | 38.61 | 1.40 | $p < 0.001$ | 0.48 | 0.09 | $p < 0.001$ |
| 3 | 2н | 41.33 | 1.5 | $p < 0.001$ | 0.49 | 0.07 | $p < 0.001$ |
| 4 | 4н | 41.57 | 1.42 | $p < 0.001$ | 0.7 | 0.09 | $p < 0.001$ |
| 5 | 6н | 41.78 | 1.24 | $p < 0.001$ | 0.6 | 0.08 | $p < 0.001$ |
| 6 | 8н | 41.55 | 1.3 | $p < 0.001$ | 0.64 | 0.09 | $p < 0.001$ |
| 7 | 12н | 41.67 | 1.24 | $p < 0.001$ | 0.64 | 0.09 | $p < 0.001$ |
| 8 | 16н | 42.55 | 1.2 | $p < 0.001$ | 0.56 | 0.09 | $p < 0.001$ |
| 9 | 20н | 43.27 | 1.21 | $p < 0.001$ | 0.84 | 0.11 | $p < 0.001$ |
| 10 | 24н | 47.04 | 1.49 | $p < 0.001$ | 0.71 | 0.10 | $p < 0.001$ |
| 11 | 26н | 47.08 | 1.25 | $p < 0.001$ | 0.74 | 0.09 | $p < 0.001$ |

Средние значения оптической плотности в группе объектов, отрицательной на опиаты колебались в диапазоне от 38.61 ± 1.40 до 47.08 ± 1.25 , что соответствует отсутствию веществ группы опиатов в образцах трупного материала. Средние значения оптической плотности в группе объектов, положительной на опиаты, находились в диапазоне от 0.48 ± 0.09 до 0.84 ± 0.11 .

На рис. 4 представлена динамика значений оптической плотности трех выборочно взятых образцов, содержащих опиаты, измеренной методом иммуноферментного анализа, в течение 26 недель при хранении образцов при температуре $+18-20^\circ \text{C}$.

Рис. 4. Динамика оптической плотности 3-х содержащих опиаты образцов при температуре хранения +18-20 С.



Кривые, помеченные ромбом и треугольником, отображают динамику значений А отрицательного контроля и контрольной мочи, видно, что значений их достоверно не отличаются друг от друга, что дает возможность сделать вывод о правильности заключений, касающихся наличия наркотических веществ в исследуемых образцах. Очевидным является факт наличия опиатов в указанных образцах трупного материала.

На рис.5 представлены данные по динамике значений оптической плотности образцов, содержащих опиаты, хранящихся при температуре +4С в течение 26 недель.

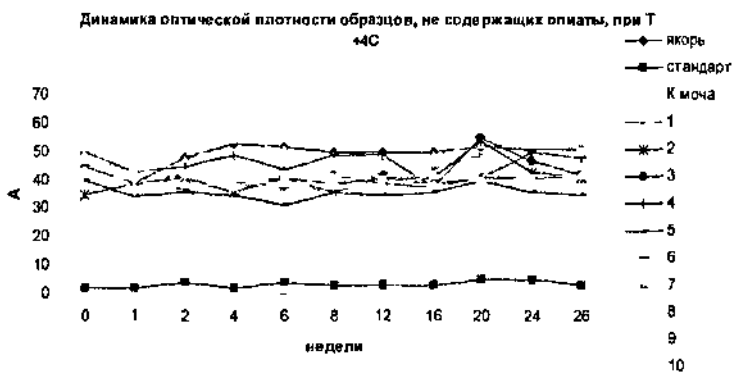
Рис.5 Динамика оптической плотности положительных на опиаты образцов при температуре +4 С.



Аналогичная картина наблюдается при исследовании положительных образцов, хранящихся при температуре +4° С - по оптической плотности можно сделать вывод об отсутствии веществ группы опиатов в исследуемых образцах крови.

Такие же исследования были проведены в отношении не содержащих опиаты образцов трупного материала. Результаты исследований представлены на рис.6 (на примере 10 образцов).

Рис 6 Динамика значений оптической плотности образцов, не содержащих опиаты в течение 26 недель при хранении при T=+4 С.



Значения оптической плотности отрицательного контроля и контрольной мочи достоверно не отличаются, значения A стандарта достоверно отличаются от A якоря и контрольной мочи. Значения A опытных образцов достоверно отличаются от значений A стандарта и достоверно не отличаются от значений A якоря и контрольной мочи, что свидетельствует об отсутствии наркотических веществ группы опиатов в объектах.

На следующем рисунке 7 представлены данные по изменению A образцов, отрицательных на опиаты при хранении их при температуре +18-20 С в течение 26 недель.

Рис.7. Динамика оптической плотности «отрицательных» образцов при температуре +18-20 С.



В условиях комнатной температуры особенно отчетливо проявляется бактериальный пророст образцов трупного материала. Несмотря на это, большинство образцов показало стабильность в отношении значений оптической плотности, указывающей на отсутствие опиатов. Оптическая плотность образцов достоверно отличается от оптической плотности стандартного раствора.

Количественная оценка наличия наркотических веществ группы опиатов.

Теоретически была выведена формула для количественного определения наркотических веществ группы опиатов в исследуемом материале. Наличие опиатов в диагностически значимой концентрации 300 нг/мл устанавливают по значению оптической плотности (A), если $A_{иВ}$ в диапазоне $A_{положительный\ кр} \geq A_{иВ} > 0$. В том случае, если $A_{иВ} = 0$ осуществляют разведение до тех пор, пока $A_{иВ}$ не станет отличной от 0, затем проводят количественное определение наркотических веществ группы опиатов по формуле:

$$C = \frac{300 * Y}{X},$$

где: С - концентрация наркотического вещества, нг/мл,

300 - диагностически значимая концентрация наркотического вещества группы опиатов, нг/мл,

X - исходное разведение,

У - конечное разведение.

Способ количественного определения опиатов методом иммуноферментного анализа с использованием диагностикума, включая выше указанную формулу, были поданы в виде заявки в Патентное ведомство РФ. Получена приоритетная справка №2004109841. Практическое применение рассмотрено на примере: кровь развели в 50 раз (980 мкл раствора 2 + 20 мкл крови. При измерении А в лунке, содержащей отрицательный контроль получен результат 0.76; 0.77 (на каждый образец 2 лунки), А в лунке с положительным контролем (морфин 6 нг/мл) = 0.04;0.05; А в лунке, содержащей разведенный опытный образец составила 0,00; 0,00. Провели разведение крови в 100 раз и вновь произвели измерение А указанных образцов. Оптическая плотность опытного образца составила 0,00; 0,00. Далее процесс разведения и измерения А проводили до тех пор, пока А опытного образца не стала отличной от нуля. При разведении в 350 раз оптическая плотность опытного образца составила 0,03; 0,04, что $\leq A_{\text{положительный кр}}$. Произвели расчет концентрации опиатов в образце крови:

$$C = (300 \times 350) / 50 = 2100 \text{ нг/мл.}$$

Концентрация веществ группы опиатов в присланном на исследование образце крови составила 2100 нг/мл.

Оценка влияния пробоподготовки в виде центрифугирования на результаты иммуноферментного анализа

Считается, что при проведении ИФА желательно проводить пробоподготовку образцов трупной крови, включающую центрифугирование с целью осаждения эритроцитарной и белковой массы. Однако, в связи с тем, что в судебно-медицинской практике, как правило,

трупная кровь представлена сгусткообразной формой, с элементами фибринолиза и гемолиза, представляется весьма проблематичным отцентрифугировать такой материал. В связи с этим мы поставили перед собой задачу провести сравнительное исследование образцов трупной крови и мочи методом иммуноферментного анализа с пробоподготовкой и без.

В работе было проведено иммуноферментное исследование 30 образцов трупного материала, из них 28 объектов - кровь, 2 - моча. Образцы крови и мочи центрифугировали в течении 10 мин при 3 тыс. об/мин. Из 30 образцов крови 8 находились в состоянии гемолиза (таблица 2).

Таблица 2. Сравнение оптической плотности образцов, исследуемых после центрифугирования и без центрифугирования при проведении иммуноферментного анализа.

| №№ | Без п/п, А x 100 | С п/п, А x 100 | №№ | Без п/п, А x 100 | С п/п, А x 100 |
|------|---------------------|-------------------|------|---------------------|-------------------|
| 1 | 40 | 41 | 16 | 38 | 37 |
| 2 г | 39 | 37 | 17 | 36 | 37 |
| 3 | 36 | 34 | 18 | 39 | 41 |
| 4 г | 43 | 30 | 19 | 40 | 44 |
| 5 | 35 | 37 | 20 | 33 | 36 |
| 6 г | 40 | 37 | 21 | 2 | 1 |
| 7 г | 36 | 30 | 22 | 1 | 0 |
| 8 г | 44 | 38 | 23 | 1 | 1 |
| 9 | 38 | 39 | 24 | 0 | 0 |
| 10 г | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 1 | 26 | 0 | 1 |
| 12 | 1 | 2 | 27 | 1 | 0 |
| 13 | 2 | 0 | 28 г | 1 | 2 |
| 14 г | 2 | 1 | 29 м | 1 | 1 |
| 15 | 1 | 0 | 30 м | 1 | 1 |

А - значение оптической плотности исследуемого образца при проведении ИФА;

г - гемолиз; м - моча

Пробоподготовка в виде центрифугирования не оказывает существенного влияния на результаты иммуноферментного анализа.

О влиянии опиатов на антиоксидантную активность трупной крови и мочи.

При нормальных условиях все клетки содержат широкий спектр антиоксидантов и ферментов, контролирующих образование свободных радикалов. Возможно, при действии наркотиков на организм происходят сдвиги в антиокислительной (АО) системе организма. В литературе нам не встретилось данных о влиянии опиатов, в частности, морфина, на процессы перекисного окисления липидов и АО активности крови. В связи с этим было проведено провести измерение АО активности трупной крови и мочи и стандартного раствора морфина в концентрации 6 нг/мл в модельной системе гемоглобин-люминол-перекись водорода. Не было выявлено существенного влияния опиатов на АО активность крови и мочи, однако были обнаружены антиокислительные свойства морфина при разведении стандартного раствора морфина в концентрации 6 нг/мл в 100 раз.

Оценка биохимических показателей органов и тканей из трупа при наличии опиатов.

Во всех образцах крови от каждого трупа были определены концентрации глюкозы, мочевины и креатинина, в отдельных случаях было проведено определение активности холинэстеразы крови, концентрации гликозилированного гемоглобина. Концентрация глюкозы также была определена в моче и перикардиальной жидкости.

В случаях, когда для исследования кроме крови были доставлены фрагменты печени, миокарда, скелетной мышцы, производилось определение гликогена тканей. В отдельно взятых случаях было проведено исследование крови и мочи, а также жидкости из перикардиальной полости с целью определения миоглобина в реакции обратной пассивной гемагглютинации.

В таблице 3 представлены средние значения концентраций биохимических показателей - глюкозы, мочевины, креатинина, гликогена, в группах 1 и 2 с указанием достоверности.

Таблица 3. Средние значения концентраций биохимических показателей.

| Название биохимического показателя | Образцы, не содержащие опиаты | Образцы, содержащие опиаты | достоверность |
|------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------|
| глюкоза крови | 4,73+0.68 | 3,10+0.26 | p<0.05 |
| глюкоза перик/ж | 9,17+2,72 | 2,13+0.35 | p<0.001 |
| глюкоза мочи | 11.42+5.74 | 7,14+4.6 | |
| мочевина | 9.62+1.34 | 5.45+0.28 | p<0.001 |
| креатинин | 0.34+0.04 | 0.20+0.01 | p<0.05 |
| гликоген печени | 1.3+0.28 | 1.76+0.2 | p<0.05 |
| гликоген миокарда | 0.03+0.03 | 0+0 | |
| гликоген скелетной мышцы | 0.55+0.09 | 0.68+0.08 | p<0.05 |
| миоглобин мочи | 542.47+ 320.94 | 323.77+229.57 | |
| миоглобин перик/жид | 75146.66+44818.31 | 224300.59+41612.53 | |
| миоглобин крови | 47864.84+20820.35 | 18617.14+4179.04 | |
| гликозилированный гемоглобин | 6.79+0.67 | 5.02+0.12 | p<0.01 |
| активность холинэстеразы | 2.11+0.64 | 2.88+0.06 | p<0.1 |
| миоглобин мочи (Ln) | 4.68+0.41 | 4.05+0.37 | |
| миоглобин перик/жидкости (Ln) | 10.85+0.61 | 11.64+0.23 | |
| миоглобин крови (Ln) | 8.94+0.28 | 8.77+0.18 | |

Комплексная оценка биохимических показателей органов и тканей позволяет уточнить диагноз танатолага.

Высокие показатели глюкозы в крови и наличие гликогена в органах свидетельствует о быстрой смерти, например, в случае передозировки наркотиками. Также возможна посмертная диагностика сахарного диабета

по вышеуказанным показателям и при оценке содержания глюкозы и ацетона в моче. На основании полученных результатов мы предлагаем таблицу интерпретации данных по гликозилированному гемоглобину для трупной крови (таблица 4):

Таблица 4. Интерпретация результатов для трупной крови.

| НвА ₁ , % | Степень контроля глюкозы |
|----------------------|---|
| >12% | возможна кома (уточнить показатели глюкозы крови и мочи, ацетон в моче) |
| 9-12% | плохая |
| 8-9% | посредственная |
| 7-8% | удовлетворительная |
| 6-7% | близкая к норме гликемия |
| <6% | недиабетический уровень |

Показатели мочевины и креатинина, билирубина и уробилиногена характеризуют состояние печени и почек. Повышенное содержание креатинина и мочевины при наличии билирубина в моче указывают на нарушение функции почек. Отсутствие мочевины в крови может свидетельствовать о нарушении функции печени. Нормальные показатели мочевины и креатинина в крови свидетельствуют об отсутствии нарушений функции печени и почек, что характерно для молодых наркоманов, у которых не успевают развиваться указанные нарушения. Наличие уробилиногена в моче при отсутствии билирубина может свидетельствовать о наличии гемолитической желтухи, пернициозной анемии, инфекции желчевыводящих путей.

По концентрации миоглобина возможно установить повреждение мышечной ткани, токсическое поражение организма. Высокие концентрации миоглобина в перикардиальной жидкости наблюдались у трупов лиц, злоупотребляющих наркотиками. Наличие опиатов достоверно не влияло на активность холинэстеразы крови.

Выводы.

1. Результаты исследований, подтвержденные стандартными химическими методами (тонкослойная хроматография, газовая хромато-масс-

спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография) свидетельствуют, что метод иммуноферментного анализа с использованием диагностикума обладает высокой чувствительностью и специфичностью и может быть рекомендован в судебно-медицинскую практику для установления наркотических веществ группы опиатов в крови и моче при экспертизе наркотической интоксикации.

2. Проведенными исследованиями установлено, что метод иммуноферментного анализа сохраняет свою информативность и достоверность при гнилостной трансформации и установление наличия опиатов в крови и моче из трупа в указанных условиях осуществимо в сроки до 6 месяцев постмортального периода.
3. Проведение комплексных биохимических исследований органов и тканей трупа (кровь, моча, перикардальная жидкость, печень, миокард, скелетная мышца) и оценка их показателей способствует правильной постановке диагноза наркотической интоксикации и исключению наличия сахарного диабета у пострадавших.
4. Ряд условий пробоподготовки, а также эндогенные и экзогенные факторы (длительность центрифугирования в течение 10 мин, количество оборотов 3 тыс/мин, пол, возраст потерпевших, температура хранения, длительность хранения до 6 месяцев) существенно не влияют на результаты иммуноферментного анализа.
5. Результаты применения метода хемилюминесценции свидетельствуют о наличии определенной антиоксидантной активности стандартного раствора морфина в концентрации 6 нг/мл при разведении в 100 раз. Дальнейшее изучение указанного явления позволит раскрыть ряд существенных механизмов действия морфина на организм человека.

Практические рекомендации.

1. После изъятия крови и мочи из трупов, следует их поместить в стандартную стеклянную посуду (пузырек), закрытую крышкой и оперативно отправить их в судебно-химическую и судебно-биохимическую лаборатории на исследование. При отсутствии такой возможности кровь и мочу можно хранить в стеклянной посуде при температуре +4°C в течение нескольких дней.
2. При подозрении на наркотическую интоксикацию желательно направить кровь, мочу, перикардальную жидкость, кусочки печени, миокарда, скелетной мышцы для биохимического исследования на глюкозу, гликоген, мочевины, креатинин, гликозилированный гемоглобин, билирубин, уробилиноген, ацетон, миоглобин.
3. При вскрытии гнилостных разложенных трупов с подозрением на наркотическую интоксикацию необходимо направить в биохимическую лабораторию кровь и мочу для исследования с помощью иммуноферментного анализа, так как процессы гнилостного разложения в сроки до 6 месяцев существенно не влияют на результаты исследования.
4. Для точной оценки наличия наркотических веществ группы опиатов целесообразно проводить исследование содержания глюкозы, гликогена, гликозилированного гемоглобина, ацетона, мочевины, креатинина, миоглобина в крови, моче, перикардальной жидкости, печени, миокарде, скелетной мышце. Эти показатели позволяют также выявить наличие сахарного диабета, что важно при определении причин смерти.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Михайлова Г.В., Асташкина О.Г., Павленко Е.Ю., Зимина Л.Н., Барина М.В. «Значение биохимических исследований в комплексной диагностике острых отравлений опиатами». Альманах судебной медицины (материалы 2-ой Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы судебной биохимии»), Санкт-Петербург, №6,2003, с. 88-91.
2. Жаров В.В., Пашинян Г.А., Асташкина О.Г. «Определение гликозилированного гемоглобина для посмертной диагностики нарушений углеводного обмена». Альманах судебной медицины (материалы 2-ой Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы судебной биохимии»), Санкт-Петербург, №6,2003, с. 56-58.
3. Жаров В.В., Пашинян Г.А., Лапенков МИ., Асташкина О.Г. «Определение наличия наркотических веществ группы опиатов методом иммуноферментного анализа при гнилостной трансформации трупа при определении опиатов методом иммуноферментного анализа». Альманах судебной медицины (материалы 2-ой Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы судебной биохимии»), Санкт-Петербург, №6,2003, с. 54-56.
4. Жаров В.В., Пашинян Г.А., Асташкина О.Г. «О возможности биохимического исследования трупной крови в сроки до 21 дня после взятия материала». Альманах судебной медицины (материалы 2-ой Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы судебной биохимии»), Санкт-Петербург, №6,2003, с. 54-56.
5. Асташкина О.Г. «Определение гликозилированного гемоглобина для посмертной диагностики сахарного диабета методом ионообменной хроматографии» // «Естественные и технические науки», Москва, №4 (13),2004,с.261-264.

- б.Асташкина О.Г. «Оценка влияния пробоподготовки трупного материала при определении опиатов методом иммуноферментного анализа» // «Естественные и технические науки», Москва, №4 (13), 2004, с.265-266.
7. Асташкина О.Г. «О влиянии опиатов на антиоксидантную активность трупного материала» // «Естественные и технические науки», Москва, №4 (13), 2004, с.267-268.
- 8.Асташкина О.Г. «Исследование биохимических показателей трупного материала при наркотической интоксикации» // «Проблемы экспертизы в медицине», Ижевск, 2004, Т 4, № 3, с. 15-17.

Асташкина Ольга Генриховна

**«Выявление наркотических веществ группы опиатов
методом иммуноферментного анализа
при гнилостной трансформации трупа»**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

ЛИЦЕНЗИЯ ПД № 00608

Формат 60x84/16 1,7 усл. п.л.
Бумага офсетная 80 гр.
Тираж 100 экз. Заказ № 98

Отпечатано с готовых О/М
в типографии «Медина-Принт»
ул. Новослободская д. 14/19 стр. 5
тел./факс: 787-62-21

163.55