بسم الله الرحمن الرحیم

تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع

بعد از دفاع از حوزه پژوهشی دانشکده دریافت و بعد اسکن نمایید.

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **نازنین وزیری‌تبار** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۹۰** مقطع **کارشناسی ارشد** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم».

امضا

تاریخ

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **پایان‌نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **بیوشیمی بالینی** است که در سال **۱۳۹۳** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر محمدجواد رسایی** ، مشاوره **–** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **نازنین وزیری‌تبار** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان

طراحی سنجش ایمنوکروماتوگرافی برای اندازه گیری بالینی امفتامین در نمونه بزاق انسان

نگارش

نازنین وزیری‌تبار

استاد راهنما

دکتر محمد جواد رسایی

تیر ۱۳۹۳

تقدیم:

با درود فراوان بر پدر بزرگوارم و سپاس بیکران بر همدلی و همراهی و همگامی مادر دلسوز و مهربانم

که سجده ی ایثارشان گل محبت را در وجودم پروراند

و دامان گهربارشان لحظه های مهربانی را به من آموخت.

به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است

و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند.

این مجموعه را به **پدر و مادر** عزیزم و خواهر عزیزم **ساناز** تقدیم می کنم.

تشکر و قدردانی

باسپاس از سه وجود مقدس:

آنان که ناتوان شدند تا ما به توانایی برسیم...

موهایشان سپید شد تا ما روسفید شویم...

و عاشقانه سوختند تا گرمابخش وجود ما و روشنگر راهمان باشند...

پدرانمان

مادرانمان

استادانمان

چکیده

مقدمه: مت‌امفتامین یک محرک عصبی است و یکی از اصلی‌ترین مواد مخدر سراسر جهان می‌باشد. در دهه‌های اخیر تولید صنعتی و سوء مصرف مت‌امفتامین به شدت افزایش یافته و این امر موجب تهدید سلامت و رفاه اجتماعی در جهان شده است. برای کاهش رشد روز افزون سوء مصرف مت‌امفتامین و اثرات مخرب آن بر اجتماع به روش‌های کارآمدی برای شناسایی سوء مصرف کنندگان مت‌امفتامین نیاز است. سنجش‌های ایمنی به دلیل سادگی، حساسیت مناسب و در دسترس بودن روش‌های سنجش درمکان آن‌ها، در غربالگری نمونه‌های زیستی برای سوء مصرف مواد مخدر مورد استفاده قرار می‌گیرند. در تحقیق حاضر طراحی سنجش ایمنوکروماتوگرافی برای شناسایی مت‌امفتامین در نمونه بزاق انسانی انجام شد.

مواد و روش‌ها: برای تهیه آنتی‌ژن مورد استفاده در سنجش مشتق کربوکسیله مت‌امفتامین (METH) سنتز شد و توسط روش کربودی‌ایمید با آلبومین سرم گاوی (BSA) مزدوج گردید. آنتی‌ژن تهیه شده برای تهیه آنتی‌بادی پلی‌کلونال به دو خرگوش در ۱۱ نوبت تزریق شد. آنتی‌بادی تولیدی توسط روش الایزا بررسی شد و پس از تخلیص به نانوذرات طلا متصل گردید. با ثابت کردن آنتی‌ژن تهیه شده در جایگاه خط تست بر روی غشاء نیتروسلولز و قرار دادن آنتی‌بادی نشان‌دار با ذرات طلا در جایگاه پد نمونه، سنجش ایمنوکروماتوگرافی برای شناسایی مت‌امفتامین در نمونه بزاق طراحی شد.

نتایج و بحث: اطلاعات بدست آمده از طیف‌های IR اسپکتروسکوپی، سنتز مشتق کربوکسیله مت‌امفتامین را تایید کرد. طیف UV اسپکتروفتومتری در ۲۷۸ نانومتر تشکیل مزدوج BSA-METH را نشان داد. داده‌های حاصل از الایزا نشان دهنده تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر علیه مت‌امفتامین بود. با استفاده از آنتی‌ژن و آنتی‌بادی تولیدی سنجش ایمنوکروماتوگرافی برای شناسایی مت‌امفتامین در نمونه بزاق با cut off برابر ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، که cut off مناسبی برای شناسایی مت‌امفتامین در بزاق می‌باشد، طراحی شد.

کلمات کلیدی: مت‌امفتامین، سنجش‌های ایمنی، سنجش‌های ایمنوکروماتوگرافی

فهرست مطالب

فهرست مطالب .... أ

فهرست جداول .... ز

فهرست نمودارها .... ح

فهرست شکل ها .... ط

فصل اول : مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. اعتیاد ۲

۱- ۱- ۱. آمار اعتیاد در جهان و ایران ۲

۱- ۱- ۲. اثرات روانی مواد مخدر ۳

۱- ۱-۳. انواع مواد مخدر ۳

۱-۲. امفتامین‌ها ۵

۱- ۲- ۱. فارماکولوژی مولکولی مت‌امفتامین ۵

۱- ۲- ۲. تاریخچه و اپیدمیولوژی مت‌امفتامین ۶

۱- ۲- ۳. گیرنده‌های هدف متامفتامین و اثرات فیزیولوژیک آن ۸

۱- ۲- ۴. مکانیسم‌های سمیت ۸

۱- ۲- ۴- ۱. استرس اکسیداتیو ۸

۱- ۲- ۴- ۲. سمیت تحریکی ۸

۱- ۲- ۴- ۳. سمیت میتوکندریایی ۹

۱- ۲- ۴- ۴. التهاب مغزی ۹

۱- ۲- ۵. عوارض مت‌امفتامین ۹

۱- ۲- ۶. جذب مت‌امفتامین در بدن ۱۱

۱- ۲- ۷. متابولیسم مت‌امفتامین ۱۱

۱- ۲- ۸. نیمه عمر پاک سازی از خون ۱۲
۱- ۲- ۹. زمان ورود متامفتامین به بزاق ۱۲
۱- ۳. اهمیت سنجش متامفتامین و روش‌های سنجش آن ۱۳
۱- ۳- ۱. کروماتوگرافی ۱۳
۱-۳- ۱- ۱. کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) ۱۳
۱- ۳- ۱- ۲. کروماتوگرافی گازی (GC) ۱۴
۱-۳-۱-۳. کروماتوگرافی مایع با فشار بالا(HPLC) ۱۴
۱- ۳- ۲. سنجش های ایمنی ۱۵
۱- ۳- ۲- ۱. سنجشهای ایمنی با رادیوایزوتوپ‌ها (RIA) ۱۷
۱- ۳- ۲- ۲. سنجش‌های ایمنی غیررادیوایزوتوپی ۱۷
۱- ۳- ۲- ۳. سنجش ایمنی با آنزیم(EIA) ۱۷
۱-۴. انواع سنجش‌های ایمنی برای متامفتامین ۱۹
۱- ۴- ۱. رادیوایمنواسی ۲۰
۱- ۴- ۲. لاتکس آگلوتیناسیون مهاری ۲۰
۱- ۴- ۳. هماگلوتیناسیون مهاری ۲۰
۴- ۴. سنجش ایمنی با آنزیم (EIA) ۲۱
۱- ۴- ۴- ۱. سنجش EIA همگن ۲۱
۱- ۴- ۴- ۲. سنجش EIA ناهمگن ۲۱
۱- ۴- ۵. ایمنوکروماتوگرافی ۲۱
۱-۴-۵-۱. سنجش‌های سریع ۲۱
۴- ۵- ۱- ۲. ساز و کار سنجش‌های سریع ۲۷
۱- ۵. نمونه مورد استفاده در آزمایشات اعتیاد ۲۸
۱- ۵- ۱. ادرار ۲۸

۱- ۵- ۲. بزاق ۲۸

فصل دوم : مواد و روش‌ها ۳۰

۲-۱. مواد، وسایل و دستگاه‌ها ۳۱

۲-۱-۱. مواد شیمیایی مورد نیاز جهت سنتز مشتق متامفتامین (METH) ۳۱

۲-۱-۲. مواد مورد نیاز جهت سنتز ایمنوژن (BSA-METH) و تولید آنتی بادی ۳۱

۲-۱-۳. بافرها و محلول‌ها ۳۱

۲-۱-۳-۱. بافرهای ELISA ۳۱

۲-۱-۳-۲. معرف برادفورد ۳۲

۲-۱-۳-۳. بافرهای تخلیص آنتی‌بادی ۳۲

۲-۱-۳-۴. بافرهای SDS-PAGE ۳۲

۲-۱-۳-۵. محلول‌های رنگ‌آمیزی کوماسی بلو ۳۳

۲-۱-۴. مواد مورد نیاز جهت طراحی نوار های سنجش سریع ۳۳

۲-۱-۴-۱. سنتز نانوذرات طلا کنژوگه به آنتی بادی ۳۳

۲-۱-۴-۲.اجزاء نوار سنجش سریع ۳۳

۲-۱-۵. وسایل ۳۴

۲-۱-۶. دستگاه‌ها ۳۴

۲-۲. روش‌ها ۳۵

۲-۲-۱. تهیه ایمنوژن ۳۵

۲-۲-۱-۱.تهیه مشتق (s)-۴-[۲-(متیلآمینو)پروپیل]بنزنبوتانوئیک هیدروکلراید (METH) ۳۵

۲-۲-۱-۱-۳. تهیه اتیل-۴-هیدروکسیل-۴-۴-(S)-۲-[- (N- متیلاستامید) پروپیل] بوتانوات (محصول ۴) ۳۶

۲- ۲- ۲. ایمن کردن خرگوش‌ها ۳۸

۲-۲-۳. تست های الایزا به منظور بررسی آنتی بادی ۳۹
۲-۲-۳-۱. الایزا به منظور بدست آوردن غلظت مناسب آنتی ژن کت شده در کف چاهک‌ها ۳۹
۲-۲-۳-۲. تعیین تیترآنتی‌بادی پلی‌کلونال موجود در سرم از تزریق سوم بـه بعـد بـه روش الایزا ۴۰
۲-۲-۳-۳. تعیین درصد مهار رقابتی آنتی‌بادی توسط مت‌امفتامین حل شده دربـزاق (تهیـه منحنی استاندارد متامفتامین) ۴۰
۲-۲-۳-۴. تعیین تغییرات درون و بین سنجش، برای تست الایزای تشخیص متامفتامین در بزاق ۴۰
۲-۲-۴. تخلیص آنتی‌بادی ۴۱
۲-۲-۴-۱. آماده‌سازی رزین مبادله‌کننده آنیون دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز ۴۱
۲-۲-۴-۲. مراحل تخلیص ۴۱
۲-۲-۴-۳. تهیه ژل‌های SDS-PAGE ۴۲
۲-۲-۴-۴.رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو ۴۲
۲-۲-۵. آماده کردن نوارسنجش سریع ۴۳
۲-۲-۵-۱.تهیه نانوذرات طلا ۴۳
۲-۲-۵-۲. تعیین pH و غلظت مناسب برای مزدوج ساختن آنتیبادی با نانوذرات طلا....... ۴۳
۲- ۲- ۵- ۳. اتصال آنتی‌بادی به نانوذرات طلا ۴۳
۲- ۲- ۵- ۴. تهیه نوارهای سنجش سریع ۴۴
۲-۲-۵- ۵. طراحی نوار ادراری با استفاده از آنتی ژن تولیدی و آنتی بادی تجاری نشان دار با نانوذرات طلا ۴۴
۲-۲-۵- ۶. طراحی نوار ادراری آنتی بادی پلی کلونال تولیدی نشان دار شده با طلا، بـرای تشخیص متامفتامین در ادرار و مقایسه آن با تست تجاری مشابه ۴۴

۲-۲-۵- ۷. طراحی نوار بزاقی با استفاده از آنتی ژن سنتز شده و آنتی بادی پلی کلونال تولیدی نشان دار شده با طلا، برای تشخیص متامفتامین در نمونه بزاق و مقایسه آن با تست تجاری مشابه ۴۵
۲-۲-۵- ۸. تعیین اختصاصیت و حساسیت ۴۵
۲-۲-۵-۹.بررسی واکنش متقاطع آنتی‌بادی ۴۵
فصل سوم : نتایج و یافته ها ۴۶
۳-۱. تهیه ایمنوژن ۴۷
۳-۱-۱. سنتز مشتقMETH ۴۷
۳-۱-۲. مزدوج کردن مشتق METH با BSA و محاسبه تعداد METH متصل شده به BSA ۵۳
۳- ۱- ۳. تایید تشکیل مزدوج METH-BSA با استفاده از آنتی بادی تجاری نشاندار با نانوذرات طلا بر روی نوار سنجش سریع ۵۴
۳-۲. نتایج ایمن سازی خرگوش ها ۵۴
۳-۲-۱. جدول زمان بندی تزریق و خون گیری ۵۴
۳-۳. تخلیص ایمونوگلوبولین‌های سرم به روش رسوب‌دهی پروتئین ها با استفاده از آمونیوم سولفات و کروماتوگرافی تعویض یونی: ۵۹
۳-۳-۱. تعیین تیتر آنتیبادی تخلیص شده ۶۰
۳-۵. الایزای متامفتامین در بزاق با استفاده از آنتیبادی تخلیص شده ۶۰
۳-۵-۱. منحنی استاندارد متامفتامین در بزاق ۶۰
۳-۵-۲. محاسبه ضریب تغییرات درون و بین سنجشی برای الایزای متامفتامین در بزاق... ۶۱
۳-۵. نتایج مربوط به طراحی نوار سنجش سریع ۶۲
۳-۵-۱. آماده‌سازی نانوذرات طلا ۶۲
۳-۵-۲. تعیین pH و غلظت مناسب برای مزدوج ساختن آنتی‌بادی با نانوذرات طلا ۶۳

۳-۵-۳. تهیه نوارهای سنجش سریع ۶۳
۳-۵-۳-۱. طراحی نوار ادراری با استفاده از آنتی ژن تولیدی و آنتی بادی تجاری نشـان دار با نانوذرات طلا ۶۳
۳-۵-۳-۲. طراحی نوار ادراری با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال تولیدی نشاندار شـده بـا طلا، برای تشخیص متامفتامین در ادرار و مقایسه آن با تست تجاری مشابه ۶۴
۳-۵-۳-۳. طراحی نوار بزاقی با استفاده از آنتی ژن سنتز شده و آنتـی بـادی پلـی کلونـال تولیدی نشان دار شده با طلا، برای تشخیص متامفتامین در نمونـه بـزاق و مقایسـه آن بـا تست تجاری مشابه ۶۷
۳-۵-۳-۴. تعیین اختصاصیت و حساسیت ۶۸
فصل چهارم : بحث ، نتیجه گیری و پیشنهادها ۷۴
۴-۱. بحث ۷۵
۴-۱-۱. نمونه های زیستی در سنجش‌های مربوط به سوء مصرف مواد مخدر ۷۶
۴-۱-۲. روش‌های سنجش متامفتامین در نمونه‌های زیستی ۸۲
۴-۱-۲-۱. سنجش‌های ایمنی برای امفتامین‌ها ۸۲
۴-۲. نتیجه‌گیری ۸۷
فهرست منابع ۸۸
فهرست منابع ۸۹
ضمائم ۹۵

فهرست جداول

فصل اول: مقدمه

جدول ۱-۱. انواع سیستم‌های TLC برای مت‌امفتامین ۱۳

فصل دوم: مواد و روش‌ها

جدول ۲-۱. مواد لازم جهت تهیه ژل تفکیک‌کننده برای SDS-PAGE ۴۲

جدول ۲-۲. مواد لازم جهت تهیه ژل متراکم‌کننده برای SDS-PAGE ۴۲

فصل سوم: نتایج

جدول ۳-۱. زمان بندی تزریق و خون گیری ۵۵

جدول ۳-۲. ۵۰٪ اتصال آنتی‌ژن به آنتی‌بادی ۶۶

جدول ۳-۳. محاسبه ضریب تغییرات درون سنجشی ۶۱

جدول ۳-۳. نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های بزاقی فاقد و حاوی متامفتامین با سنجش سریع طراحی شده ۶۸

جدول ۳-۴. بررسی واکنش متقاطع آنتی‌بادی تولیدی با برخی از داروها ۷۳

فصل چهارم: بحث

جدول ۴-۱. مزایا و معایب هر کدام از نمونه‌های مورد استفاده در سنجش‌های مربوط به سوء مصرف مواد مخدر. ۷۷

جدول ۴-۲. Cutoff مواد مخدر مختلف در بزاق ۸۱

فهرست نمودارها

فصل اول: مقدمه

نمودار ۱-۱. a) نمودار کشورهایی که بیشترین کشف و ضبط متامفتامین را دارند در سال ۲۰۱۰-۲۰۱۱، b) نسبت کشف و ضبط متامفتامین جهانی در آمریکای شمالی و دیگر کشورهای جهان در سالهای مختلف ۷

فصل سوم: نتایج

نمودار ۳-۱. تیتر آنتی‌بادی در خونگیری اول (روز ۵۰)........ ۵۶
نمودار ۳-۳. تیتر آنتی‌بادی در خونگیری سوم (روز ۸۰)........ ۵۶
نمودار ۳-۲. تیتر آنتی‌بادی در خونگیری دوم (روز ۶۵). ۵۶
نمودار ۳-۴. تیتر آنتی‌بادی در خونگیری چهارم (روز ۹۵). ۵۷
نمودار ۳-۵. تیتر آنتی‌بادی در خونگیری پنجم (روز ۱۱۰) ۵۷
نمودار ۳-۶. تیتر آنتی‌بادی در خونگیری ششم(روز ۱۲۵). ۵۷
نمودار ۳-۷. تیتر آنتی‌بادی در خونگیری هفتم (روز ۱۴۰). ۵۸
نمودار ۳-۸. تیتر آنتی‌بادی در خونگیری هشتم(روز ۱۵۵). ۵۸
نمودار ۳-۹. تیتر آنتی‌بادی در خونگیری نهم (روز ۱۷۰)........ ۵۸
نمودار ۳-۱۰. تیتر آنتی‌بادی تخلیص شده (ایمونوگلوبولین تخلیص شده در اولین فرکشن)....... ۶۰

فهرست شکل ها

فصل اول: مقدمه

شکل ۱-۱. ساختار فنیل‌اتیل‌آمین‌ها (امفتامین‌ها) ۶

شکل ۱-۲. مکانیسم احتمالی متابولیسم مت‌امفتامین. ۱۲

شکل ۱-۳. نوار (strip) سنجش سریع ۲۲

شکل ۱-۴. مقایسه فرمت رقابتی و ساندویچی در سنجش ایمنوکروماتوگرافی ۲۷

شکل ۱-۵. موقعیت آناتومیک سه جفت غده اصلی بزاقی. ۲۹

فصل دوم: مواد و روش‌ها

شکل ۲-۱. مسیر سنتز مشتق METH ۳۵

فصل سوم: نتایج

شکل ۳-۱. طیف IR مربوط به مت‌امفتامین اولیه ۴۷

شکل ۳-۲. طیف IR مربوط به (s)-N-متیل-N(۱-متیل-۲-فنیل اتیل) استامید. ۴۸

شکل ۳-۳. طیف IR مربوط به (S)-۴- [۲-(استیل متیل آمینو)پروپیل]-γ -اکسوبنزن بوتانوئیک اسید اتیل استر. ۴۹

شکل ۳-۴. طیف IR مربوط به اتیل -۴- هیدروکسل-۴-۴-(S)-۲-[-(N-متیل استامید) پروپیل] بوتانوات. ۵۰

شکل ۳-۵. طیف IR مربوط به (S)-اتیل-۴-(۴-(۲۰(متیل استامیدو)پروپیل)فنیل) بوتانوات.... ۵۱

شکل ۳-۶. طیف IR مربوط به مشتق METH. ۵۲

شکل ۳-۷. طیف جذب نوری مزدوج METH-BSA ۵۳

شکل ۳-۸. واکنش مزدوج METH-BSA با آنتی بادی تجاری نشان دار با نانوذرات طلا بر روی نوار سنجش سریع. ۵۴
شکل۳-۹. تخلیص ایمونوگلوبولینهای سرم خرگوشی با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی ۵۹
شکل ۳-۱۰. تشکیل نانوذرات طلا با محلول سیترات سدیم ۶۲
شکل ۳-۱۱: بهینه‌سازی اتصال نانوذرات طلا به آنتی‌بادی ۶۳
شکل ۳-۱۲. نوار ادراری با استفاده از ایمنوژن سنتز شده و آنتی بادی تجاری نشان دار با طلا ۶۴
شکل ۳-۱۳ . نوار ادراری آنتی بادی پلی کلونال تولیدی نشاندار شده با طلا، برای تشخیص متامفتامین در ادرار و مقایسه آن با سنجش تجاری مشابه ۶۵
شکل ۳-۱۴. نوار ادراری تهیه شده با آنتی بادی پلی کلونال تولیدی نشان دار شده با طلا با رقت ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۸ .... ۶۶
شکل۳-۱۵. طراحی نوار بزاقی با استفاده از آنتی ژن سنتز شده و آنتی بادی پلی کلونال تولیدی نشان دار شده با طلا، برای تشخیص متامفتامین در نمونه بزاق و مقایسه آن با تست تجاری مشابه. ۶۷
شکل ۳-۱۶. نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های بزاقی فاقد و حاوی متامفتامین با نوارهای سنجش طراحی شده ۶۸
شکل ۳-۱۷. ساختار مولکول‌هایی که واکنش متقاطع آنها با آنتی‌بادی تولیدی بررسی شد ۷۱
شکل ۳-۱۸. بررسی واکنش متقاطع برخی داروها با آنتی بادی تولیدی. ۷۲
شکل ۳-۱۹. بررسی واکنش متقاطع آنتی‌بادی تولیدی با برخی از داروها ۷۲

فصل چهارم: بحث

شکل ۴-۱. غلظت متامفتامین در بزاق ۸۰
شکل ۴-۲. غلظت متامفتامین در پلاسما ۸۰

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. اعتیاد

به مصرف اجباری دارو علی رغم آگاهی از اثرات مخرب آن اعتیاد گفته می‌شود. اعتیاد ناشی از تغییرات بیولوژیک و فیزیولوژیک بدن است و یک بیماری تلقی می‌گردد. مصرف مزمن دارو سبب تحمیل تغییراتی در سلول‌ها و سیستم‌های فرد مصرف کننده می‌گردد و فرد را برای طبیعی نگه داشتن عملکرد بدن ناچار به مصرف مکرر دارو می‌نماید که در اصطلاح به آن وابستگی فیزیکی گفته می‌شود. فرد معتاد علاوه بر وابستگی فیزیکی دارای وابستگی روانی به دارو نیز می باشد [۱]. مصرف مواد مخدر نه تنها سبب اثرات مخرب بر سیستم بیولوژیک فرد مصرف کننده می‌شود بلکه سبب بروز رفتارهای ناهنجار اجتماعی نیز می‌گردد. اثرات روانی ناشی از مصرف مواد مخدر باعث مستعد شدن فرد مصرف کننده برای ارتکاب جرم و خودکشی می‌شود به گونه ای که ارتباط مستقیمی میان میزان مصرف مواد مخدر و ارتکاب جرم در جامعه وجود دارد[۲].

۱- ۱- ۱. آمار اعتیاد در جهان و ایران

اعتیاد و قاچاق مواد مخدر مساله‌ای جهانی است و تمام جوامع بشری را درگیر خود نموده است. تخمین زده می‌شود ۲۳۰ میلیون نفر (۵ درصد جمیت جهانی) در سال ۲۰۱۰ حداقل یکبار تجربه مصرف مواد مخدر را داشته‌اند. در این بین بیشترین سوء مصرف مربوط به مشتقات حشیش می‌باشد. محرک‌های شبه آمفتامینی به عنوان دومین گروه از مواد مورد سوء مصرف می‌باشند. رشد سریع اعتیاد به این گروه از مواد مخدر صنعتی ، ناشی از افزایش در تولید این مواد است به گونه ای که از سال ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۰ میزان مت‌امفتامین تولید شده از ۲۱/۵ تن در سال به ۴۵ تن در سال رسیده است[۳]. علاوه بر افزایش نرخ اعتیاد در ایران، تنوع مصرف مواد صنعتی نیز به شدت افزایش یافته است. شیوه تزریقی مصرف این مواد سبب انتقال برخی بیماری‌های عفونی می‌گردد به گونه‌ای که ۶۶ درصد موارد گزارش شده مثبت ایدز در سال ۱۳۸۹ مربوط به استفاده از سرنگ تزریقی مشترک بوده

است. درصد معتادان در ایران بالاتر از نرخ ۵ درصدی جهان می‌باشد و حدود ۴۰ درصد جرایم انجام شده در کشور با پدیده اعتیاد در ارتباط است.

۱- ۱- ۲. اثرات روانی مواد مخدر

همانگونه که برخی آسیب‌های اجتماعی با برخی شاخص‌های اقتصادی و اجتماعی ارتباط دارند، به نظر می‌رسد که اختلال‌های رفتاری و روانی هم با برخی رفتارها و احساس‌های اجتماعی از جمله هیجان‌های جامعه، بی‌ارتباط نباشد. این موضوع زمانی اهمیت می‌یابد که از دیدگاه علمی به ساز و کار تاثیر مواد مخدر بنگریم و دریابیم که دست کم پنج ویژگی زیر در رابطه با اثرات مثبت کاذب و موقت هیجانی مواد مخدر دخالت دارند:

نشاط افزایی (شادابی): مقابله با هیجان غم واندوه.

اضطراب زدایی (آرامش): مقابله باهیجان ترس و انتظار.

درد زدایی (تسکین): مقابله با هیجان و عاطفه منفی خستگی و خمودگی.

جسارت زایی (اعتماد به نفس): مقابله باهیجان ناکامی و احساس حقارت.

مهارگسیختگی (بی پروایی): مقابله با خشم و سایر هیجان‌های منفی.

از سوی دیگر، به نظر می‌رسد جامعه ایرانی، از دیدگاه روان شناختی و جامعه شناختی، جامعه‌ای با بخشی از ویژگی‌های زیر باشد: هیجانی، نگران، غمگین، حرمت شکن و غیر قابل پیش بینی، که همه هیجان‌های منفی یاد شده، از عوامل خطر در بروز اختلال‌های رفتاری-روانی و سوء مصرف مواد مخدر به شمار می‌روند [۴]. لذا با توجه به نرخ رشد اعتیاد، ویژگی‌های جامعه و اثرات مواد مخدر لزوم تحقیق در مورد روش‌های مبارزه با تولید و قاچاق مواد مخدر و همچنین شناسایی و درمان افراد معتاد یک نیاز اساسی برای کشور تلقی می‌گردد.

۱- ۱-۳. انواع مواد مخدر

مواد مورد سوء مصرف عموماً بر اساس اثرات روانی که ایجاد می‌کنند به ۶ گروه تقسیم می‌گردند.

۱) مواد ضد درد

این مواد می توانند سبب سرکوب یا کاهش درد گردند. تریاک و مواد مشتق شده از آن در این گروه قرار می‌گیرند. اعضای این گروه الزاماً منشأ طبیعی ندارند. هروئین برای مثال به عنوان یک ماده نیمه سنتزی از مورفین سنتز می‌گردد. متادون، بوپرنورفین و پنتازوسین کاملاً سنتزی می‌باشند.

اثرات کوتاه مدت این مواد شامل سرخوشی، اختلال در قضاوت می‌باشد. مصرف مزمن آن‌ها سبب اختلالات رفتاری، کاهش میل جنسی، یبوست و اختلالات تنفسی می‌باشد.

۲) سرکوب‌گرهای هیجانات (دپرسانت[1])

موادی که سبب کاهش فعالیت سیستم عصبی مرکزی گردند، تحت عنوان دپرسانت یا سرکوبگر هیجانات شناخته می‌شوند. GHB، الکل، بنزودیازپین‌ها و باربیتورات‌ها در این گروه قرار دارند. مصرف این مواد همراه با سرخوشی و احساس آرامش است. اختلال در قضاوت، تخریب حافظه کوتاه مدت و تپق زدن از علائم مصرف این مواد است.

۳) توهم‌زا[2]

LSD، سیلوسایبین، فن سیکلیدین و کتامین از جمله اعضای این گروه می‌باشند. توهم زایی به معنای عدم تشخیص رؤیا و واقعیت می‌باشد. متیلن‌دی‌اکسی مت‌امفتامین یا اکستازی علاوه بر اثرات توهم زایی دارای اثر تحریکی بر سیستم عصبی مرکزی نیز می‌باشد.

۴[3]) حشیش

تمام موادی که از گیاه شاهدانه مشتق می‌شوند، در این گروه قرار می گیرند. این مواد شامل حشیش، ماری جوانا، گراس و بنگ می‌باشند. بیشترین سوء مصرف مربوط به اعضای این گروه است. تفاوت این گروه با گروه‌های دیگر در عدم ایجاد وابستگی فیزیکی است و صرفا وابستگی روانی ایجاد می‌کنند. مصرف این مواد سبب سرخوشی ملایم، نشاط و خوشحالی بی‌دلیل، قرمزی چشم و عدم ادراک زمان و مکان است.

۵) مواد فرار[4]

مواد فرار هیدروکربنی مشتق شده از نفت خام مانند اتر، استون، مواد پاک کننده و حلال‌های صنعتی هستند که تنفس آن‌ها سبب وابستگی می‌شود. سرخوشی، گیجی، هیجان و در بعضی موارد توهم‌زایی از اثرات مصرف این مواد است. سوء مصرف طولانی مدت این مواد سبب نارسایی‌های شدید ریوی، قلبی و انواع ناهنجاریهای عصبی (سایکوز) می‌گردد.

---

[1] Depressants
[2] Hallucinogens
[3] Cannabis
[4] Volatile solvents

۶) محرک‌ها[1]

محرک‌های سایکوتیک به دسته از مواد گفته می شود که سبب افزایش فعالیت سیستم عصبی و ناهنجاریهای عصبی مرکزی می گردند. این اثر به دلیل افزایش نوراپی‌نفرین در سیناپس نورونی می‌باشد. مصرف این مواد سبب افزایش انرژی بدن، سرخوشی، کاهش اشتها، افزایش فشار خون و دمای بدن می‌گردد. کوکائین، مشتقات آمفتامینی، اکستازی و نیکوتین از اعضای این گروه هستند. کوکائین و نیکوتین در این گروه منشأ طبیعی دارند و آمفتامین‌ها و اکستازی به صورت شیمیایی تولید می‌گردند [۵].

۱- ۲. امفتامین‌ها

امفتامین‌ها گروهی از مشتقات فنیل‌اتیل‌آمین‌ها می‌باشند. تمامی اعضای گروه امفتامین‌ها از محرک‌های مهم سیستم عصبی مرکزی (CNS) به شمار می‌آیند و دارای درجه مختلفی از فعالیت تحریکی می‌باشند.ساختار بسیاری از اعضای این گروه در شکل ۱-۱ نشان داده شده است. در تحقیق حاضر از بین اعضا گروه امفتامین‌ها، مت‌امفتامین انتخاب شد زیرا از میان اعضای این گروه بیشترین سوء مصرف مربوط به مت‌امفتامین می‌باشد [۶].

۱- ۲- ۱. فارماکولوژی مولکولی مت‌امفتامین[2]

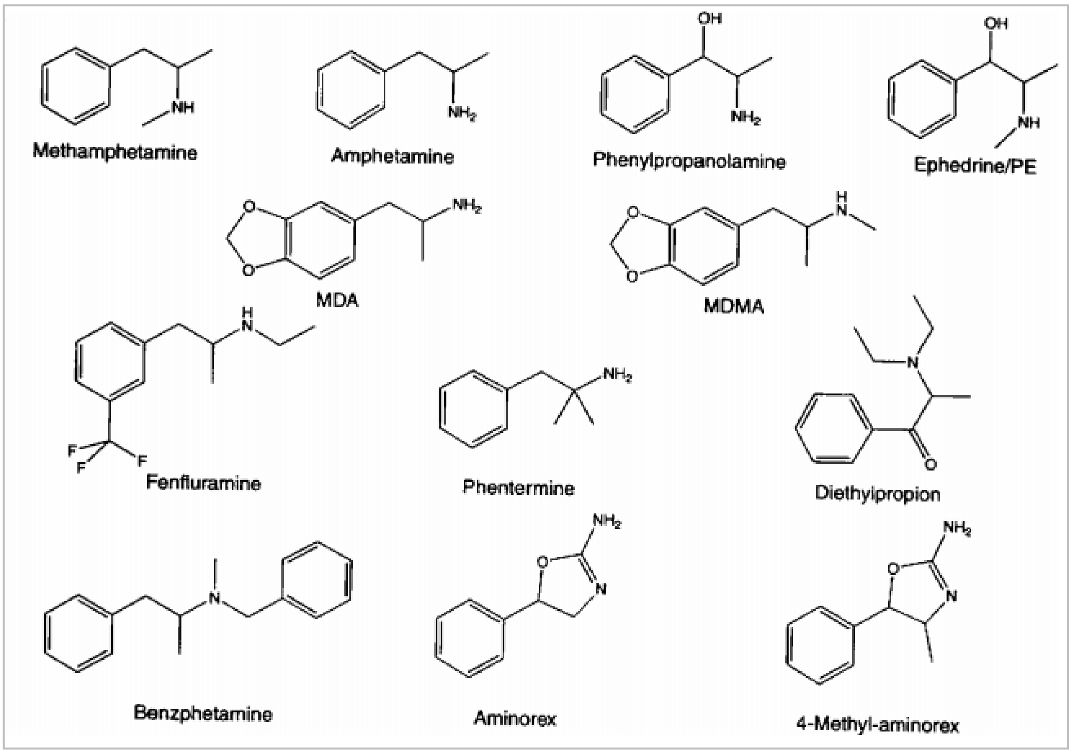
مت‌امفتامین با نام ایوپاک N- متیل -۱- فنیل پروپان -۲- آمین (شکل ۱-۱)، از مهمترین اعضای گروه امفتامین‌ها می‌باشد. در بین امفتامین‌ها، مت‌امفتامین درارای فعالیت تحریکی بسیار زیادی می‌باشد. مت‌امفتامین آگونیست غیرمستقیم رسپتورهای دوپامین، نورآدرنالین و سروتونین می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که متامفتامین سبب افزایش ترشح نورآدرنالین، دوپامین و سروتونین می شود[۷, ۸].مت‌امفتامین یک ترکیب کایرال است و ایزومر L آن با نام لوومت‌امفتامین یک داروی ضداحتقان می‌باشد و اثر تحریکی بر سیستم عصبی ندارد. تحریک سیستم عصبی ناشی از مت امفتامین مربوط به ایزومر D موجود در نمونه‌های راسمیک است [۶]. مت‌امفتامین به صورت کریستال، پودر ، قرص و مایع مورد سوء مصرف قرار می گیرد. فرم کریستالی به دلیل خلوص بالاتر

---

[1] Stimulants

[2] Methamphetamine

نسبت به دیگر فرم ها قدرت اعتیاد آوری بیشتری دارد. شیشه ، یخ ، مت ، شابو ، تینا و یابا از اسامی خیابانی این ترکیب می‌باشند.

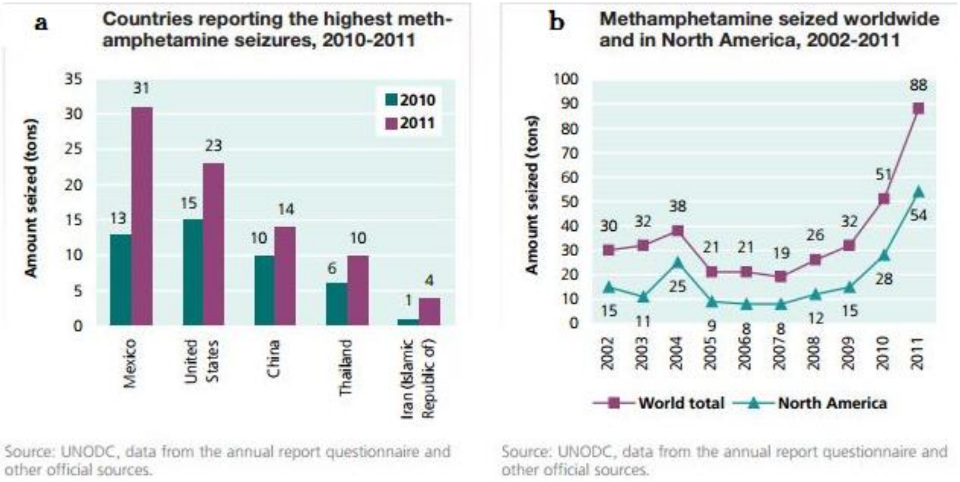


شکل ۱-۱. ساختار فنیل‌اتیل‌آمین‌ها (امفتامین‌ها)

۱- ۲- ۲. تاریخچه و اپیدمیولوژی مت‌امفتامین

مت‌امفتامین برای اولین بار در سال ۱۸۹۳ توسط ناگایی (فارماکولوژیست ژاپنی) از افدرین سنتز گردید. قبل از جنگ جهانی دوم مت‌امفتامین جهت درمان نارکولپسی، افسردگی، الکلیسم مزمن و چاقی مورد تایید FDA قرار گرفت. طی جنگ جهانی دوم نیروهای امریکا، ژاپن و آلمان از مت امفتامین برای بالا بردن انرژی و تمرکز سربازان در جنگ استفاده می‌کردند. ژاپن در سال ۱۹۴۱ مت-امفتامین را با نام تجاری فیلپون وارد بازار دارویی نمود و اولین اپیدمی مت‌امفتامین در خلال سال-های ۱۹۴۵ تا ۱۹۵۷ در ژاپن شکل گرفت به گونه‌ای که ۵ درصد از جمعیت ژاپن دچار سوءمصرف مت‌امفتامین شدند. در سال ۱۹۷۰ استفاده بالینی از مت‌امفتامین ممنوع شد [۹-۱۱].

میزان مت‌امفتامین سنتز شده در ایران از سال ۲۰۰۷ تا سال ۲۰۰۸ از ۳۸ کیلوگرم در سال به ۱۵۰۰ کیلوگرم در سال رسیده است که در سال ۲۰۱۰ پنجمین تولیدکننده مت‌امفتامین بوده‌است. میزان تولید مت‌امفتامین در سال ۲۰۱۱ به ۴ تن رسیده است (شکل۱- ۲(a)).



نمودار ۱-۱. a) نمودار کشورهایی که بیشترین کشف و ضبط مت‌امفتامین را دارند در سال ۲۰۱۰-۲۰۱۱، b) نسبت کشف و ضبط متامفتامین جهانی در آمریکای شمالی و دیگر کشورهای جهان در سالهای مختلف .اقتباس از گزارش: UNODC UN. World drug report. Publication UN, editor. 2013

از میان مشتقات آمفتامینی شامل آمفتامین ، متامفتامین و اکستازی میزان متامفتامین سنتز شده افزایش سالانه بیشتری از اکستازی و آمفتامین داشته است که دلیل اصلی آن می‌تواند روش آسان سنتز و راحتی دسترسی به مواد پیش ساز (افدرین) باشد. افزایش تولید مت‌امفتامین در سالهای ۲۰۰۷ تا ۲۰۱۰ سبب کاهش قیمت این ماده و افزایش خلوص آن شده است [۱۲].

تا سال ۲۰۰۹ حدود شانزده میلیون نفر در جهان دچار سوء مصرف مت‌امفتامین بوده‌اند که بیشتر از اعتیاد به کوکائین و هروئین است. در بین مواد مخدر کشف شده مت‌امفتامین بعد از حشیش (کانابینوئیدها) دومین جایگاه را دارد. روش سنتز ساده، قیمت پائین مواد اولیه و محصول، اثرات قوی تحریکی بر مغز و طول اثر نسبتاً طولانی از جمله عواملی است که سبب افزایش مصرف متامفتامین و محبوبیت این ماده در بین افراد معتاد شده است. مت‌امفتامین به عنوان اولین ماده مورد سوءمصرف در استرالیا، کانادا، چک‌واسلواکی شناخته‌شده‌است. شرق و جنوب شرقی آسیا مسیر اصلی حمل این مواد است و تخمین زده می‌شود نیمی از مصرف کنندگان مت‌امفتامین مربوط به این ناحیه باشند. بیشترین سنتز مت‌امفتامین با نام یخ (Ice) با خلوص ۷۵ تا ۹۰٪ در مکزیک صورت می‌گیرد. آمارها نشان می‌دهند ۱۲/۸٪ جمعیت بالای ۱۲ سال در امریکا حداقل یکبار مت‌امفتامین مصرف کرده‌اند. مصرف مت‌امفتامین سبب افزایش ابتلا به بیماری ایدز می‌گردد که ناشی از استفاده از وسایل مشترک تزریق و افزایش میل جنسی متعاقب مصرف است [۱۳].

۱- ۲- ۳. گیرنده‌های هدف مت‌امفتامین و اثرات فیزیولوژیک آن

مت‌امفتامین علاوه بر اثر آگونسیتی بر گیرنده‌های دوپامینی، سروتونینی و نوراپی‌نفرینی، سوبسترای انتقال‌دهنده‌های دوپامینی (DAT)، نوراپی‌نفرینی (NET) غشای نورون و انتقال‌دهنده‌ی مونوآمینی وزیکولی نوع ۲ (VAMT-2) می‌باشد. ورود مت‌امفتامین به درون وزیکول سبب تغییر pH درون وزیکول می‌گردد و ذخایر نوروترانسمیتری درون وزیکول با عمل معکوس VMAT-2 به درون سیتوزول تخلیه می‌گردد. افزایش درون سیتوزولی مونوآمین‌ها سبب عکس شدن مسیر انتقالی NET ، DAT و SERT می‌گردد. لذا مت‌امفتامین سبب افزایش نوروترانسمیترهای مونوآمینی در سیناپس می‌گردد. مت‌امفتامین همچنین سبب مهار آنزیم مونوآمین‌اکسیژناز نیز می‌گردد. مطالعات برون تنی نشان می‌دهد قدرت مت‌امفتامین در افزایش سطح نوراپی‌نفرین سیناپسی دو برابر دوپامین و شصت برابر سروتونین است [۶ و ۷].

۱- ۲- ۴. مکانیسم‌های سمیت

۱- ۲- ۴- ۱. استرس اکسیداتیو

احتمالاً اثرات سمی مت‌امفتامین ناشی از شباهت ساختاری آن با دوپامین است. مت‌امفتامین سبب خروج دوپامین از وزیکول‌های پیش سیناپسی به درون سیتوپلاسم می‌گردد و افزایش سطح دوپامین در سیتوپلاسم دلیل اصلی سمیت مت‌امفتامین است. ترکیبات مهار کننده تیروزین هیدروکسیلاز که میزان دوپامین را کاهش می‌دهند، باعث محافظت نورون‌های استریاتوم در برابر سمیت مت‌امفتامین می‌گردند و از طرفی تجویز L-DOPA سمیت مت‌امفتامین را افزایش می‌دهد. دوپامین در سیتوپلاسم باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می‌گردد [۱۳].

۱- ۲- ۴- ۲. سمیت تحریکی

سمیت عصبی مت‌امفتامین همچنین به دلیل سمیت تحریکی ناشی از گلوتامات می‌باشد. تمام داروهای مورد سوءاستفاده از دسته محرک‌های عصبی سبب افزایش ترشح گلوتامات در نواحی مختلف مغزی می‌گردند. MK-801 آنتاگونیست گیرنده گلوتامات سبب کاهش آسیب‌های نورودژنراتیو مت امفتامین و رفع مهار کمپلکس ۲ میتوکندری، القا شده توسط مت‌امفتامین می‌شود. افزایش ترشح گلوتامات سبب هیپرترمی در مغز می‌شود که ناشی از افزایش فعالیت نورون است [۱۳].

۱- ۲- ۴- ۳. سمیت میتوکندریایی

متامفتامین یک ترکیب لیپوفیل کاتیونی است که به راحتی وارد میتوکندری می‌شود. تجمع متامفتامین در میتوکندری سبب از بین رفتن گرادیان الکتریکی غشا میتوکندری می‌شود و pH را افزایش داده و سنتز ATP متوقف می‌گردد. تولید گونه‌های فعال در میتوکندری سبب حفره دار شدن غشای میتوکندری و آزادسازی سیتوکروم اکسیداز در سیتوپلاسم می‌شود. آزاد شدن کلسیم ذخیره میتوکندری و سیتوکروم اکسیداز، مسیرهای آپوپتوزی را فعال می‌کند [۱۳].

۱- ۲- ۴- ۴. التهاب مغزی

متامفتامین با فعال‌سازی میکروگلیا سبب افزایش آسیب می‌گردد. میکروگلیا با آزادسازی گونه-های فعال نیتروژنی و اکسیژنی سبب افزایش بیشتر استرس اکسیداتیو می‌شود. احتمالاً متامفتامین به واسطه افزایش گلوتامات باعث فعالسازی میکروگلیا می‌شود زیرا MK-801 (آنتاگونیست گیرنده NMDA) از فعالسازی میکروگلیاها با متامفتامین جلوگیری می‌کند [۱۳].

۱- ۲- ۵. عوارض متامفتامین

مطالعات موردی در ارتباط با مرگ و میر ناشی از مصرف متامفتامین نشان می دهد مرگ در افراد مصرف کننده ناشی از ادم ریوی، خونریزی مغزی، انفراکتوس قلبی، خفگی به دلیل آسپیراسیون محتویات معده و فیبریلاسیون بطنی است. آمارها نشان می‌دهد اصلی‌ترین عامل انتقال بیماری‌های عفونی مانند ایدز و هپاتیت استفاده از وسایل تزریقی مشترک است. اگرچه دلیل مرگ و میر مرتبط با مصرف متامفتامین بیشتر مربوط به ایجاد اثرات سایکولوژیک و وقوع تصادفات، خودکشی و قتل است.

سمیت قلبی عروقی متامفتامین ناشی از افزایش فشار خون، آریتمی، سندرم حاد کرونری و ایسکمی بطنی است. مصرف مزمن متامفتامین با عوارض مزمن قلبی عروقی مانند بیماری‌های کرونری و کاردیومیوپاتی همراه است. احتمال ابتلا به بیماری کاردیومیوپاتی در افراد معتاد به متامفتامین ۳/۷ برابر افراد عادی است [۱۴].

در دوزهای پائین تا متوسط (۵ تا ۳۰ میلی‌گرم) متامفتامین سبب سرخوشی، برانگیختگی، افزایش ضربان قلب و فشار خون، میدریاز، افزایش دمای بدن و کاهش اشتها می‌شود. دوزهای بالا ولی غیرکشنده متامفتامین سبب اختلالات ذهنی و بروز علائم سایکوتیک، رابدومیولیز و تشنج می‌شود. علائم سایکوتیک شامل ایجاد رفتارهای تهاجمی در ۲۰ درصد افراد، سایکوز حاد در ۷ تا ۱۲ درصد

افراد و تمایل به خودکشی در ۶ تا ۱۲ درصد افراد با مصرف دوزهای بالا از متامفتامین است. رابدومیولیز ممکن است در ۱۴ درصد افراد که دوزهای بالایی از متامفتامین مصرف کرده‌اند ایجاد گردد. تشنج در ۳ تا ۴ درصد افراد و به ندرت ایجاد می‌شود [۷].

متامفتامین سبب آسیب به آکسون‌های دوپامینرژیک و سروتونینرژیک می‌گردد. مکانیسم سمیت عصبی ممکن است ناشی از افزایش دوپامین و سروتونین درون سیتوزولی باشد. اکسیداسیون خودبخودی این مونوآمین‌ها در سیتوزول سبب ایجاد استرس اکسیداتیو می‌گردد. همچنین افزایش دمای مغز ناشی از مصرف متامفتامین سبب آسیب‌های بیشتری به بافت مغز می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد آسیب‌های ایجاد شده ممکن است تا یک سال بعد از قطع مصرف نیز ترمیم نگردند. مطالعات تصویربرداری به وسیله پرتونگار انتشار پوزیترونی نشان می‌دهد که افراد معتاد به متامفتامین دچار التهاب مغزی، کاهش چگالی نورونی و کاهش مارکرهای دوپامینرژیکی و سروتونینرژیکی هستند. این آسیب‌ها تا یک سال بعد از قطع مصرف نیز می‌توانند وجود داشته باشند و بهبود بعد از قطع مصرف به صورت کامل صورت نمی‌گیرد. مطالعات رفتاری نشان می‌دهد که مصرف مزمن متامفتامین سبب اختلال در حافظه حین انجام کار و حافظه ضمنی می‌شود. آسیب به قشر پره فرونتال مغز سبب کاهش کنترل رفتاری و انجام رفتارهای نابهنجار در این افراد می‌گردد.

عدم علاقه به فعالیت‌هایی که فرد قبلاً از انجام آن لذت می‌برد، از علائم روانی مصرف مت-امفتامین است. مصرف مزمن در ۲۰ درصد افراد سبب ایجاد شیزوفرنی می‌شود که تا ۶ ماه بعد از قطع مصرف نیز ممکن است وجود داشته باشد. افسردگی و انزوا اجتماعی نیز در اکثر افراد ایجاد می‌گردد. توهمات حس بساوایی مانند فورمیکشن (احساس حرکت حشره بر سطح پوست) از سایکوزهای شایع در بین افراد مصرف‌کننده است.

مصرف متامفتامین در دوران حاملگی به دلیل ایجاد هیپوکسی در جنین، کاهش انعطاف پذیری عروق رحم، افزایش مصرف سیگار و همچنین کاهش مراقبت‌های دوران حاملگی سبب کاهش وزن نوزاد، افزایش احتمال مرگ جنین، زایمان زود رس و افزایش زمان بستری شدن بعد از زایمان می-گردد. احتمال ابتلا به سندرم داون در نوزاد با مادر معتاد به متامفتامین بیشتر از نوزادان با مادر طبیعی است [۱۵].

خشکی دهان، انقباض عروق و هیپوکسی، دندان قروچه و رعایت نکردن بهداشت دهان و دندان سبب شکستگی دندان‌ها، ایجاد زخم در لثه و خونریزی مکرر لثه می‌گردد [۷].

۱- ۲- ۶. جذب مت‌امفتامین در بدن

جذب خوراکی مت‌امفتامین سریع است و بیشترین غلظت پلاسمایی آن در ۳/۱ تا ۶/۳ ساعت ظاهر می‌گردد. مصرف متامفتامین به صورت کشیدن [1] سبب اثر سریع تحریکی بر سیستم عصبی می-گردد. به دلیل چربی دوستی بیشتر و مقاومت نسبت به آنزیم مونوآمین‌اکسیزناژ اثرات مت‌امفتامین نسبت به دیگر محرک‌های شبه آمفتامینی سریعتر ایجاد می‌گردد و این اثرات برای مدت طولانی‌تری ادامه می‌یابد. میزان دوز مورد نیاز برای ایجاد اثرات تحریکی مشابه در سیستم عصبی مرکزی کمتر از دیگر محرک‌های شبه آمفتامینی است و اثرات عصبی محیطی آن نیز کمتر است [۱۶] .

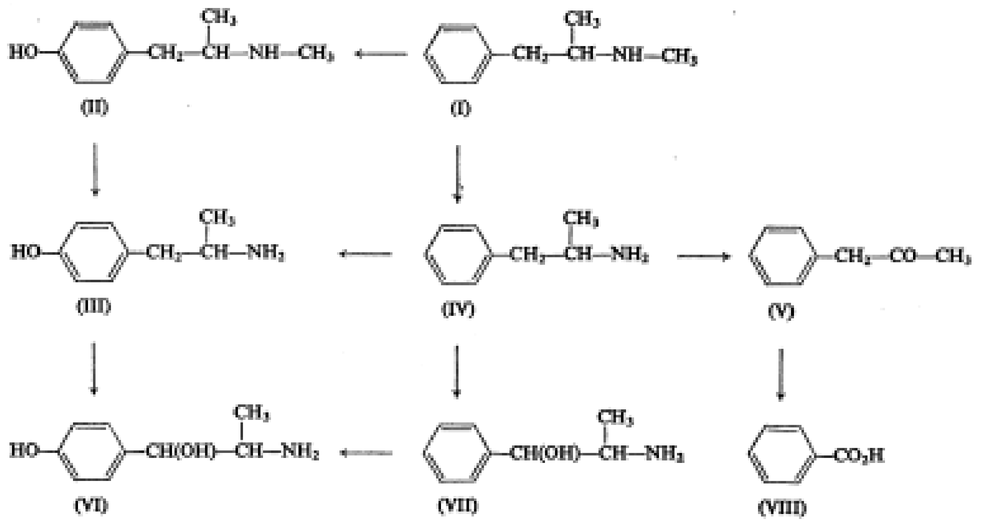
۱- ۲- ۷. متابولیسم مت‌امفتامین

اولین محل متابولیسم مت‌امفتامین در کبد است و در آنجا تحت تاثیر واکنش‌های هیدروکسیلاسیون آروماتیک، دآمیناسیون و N -دآلکالاسیون [2] قرار می‌گیرد. حداقل ۷ متابولیت در ادرار شناسایی شده است که از متابولیت‌های اصلی می‌توان به هیپوریک اسید [3](۵٪)، آمفتامین (فعال)(۲-۳ ٪)، ۴-هیدروکسی مت‌امفتامین [4] (۱۵٪)، اشاره کرد و متابولیت‌های جزئی شامل ۴-هیدروکسی آمفتامین [5] (۱٪)، نورافدرین [6] (۲٪)، ۴-هیدروکسی نورافدرین [7] (۱-۲٪) هستند (شکل۱-۳). ماکزیمم پیک غلظتی این مواد ۱۰ الی ۲۴ ساعت بعد از مصرف ایجاد می گردد [۱۷].

مت‌امفتامین در تمام بدن چرخش می‌کند و بیشترین پیک را در کلیه و شش‌ها دارد و بعد از آن معده، پانکراس، طحال، کبد و کمترین مقدار در قلب و مغز است [۱۸].

---

[1] smoking
[2] N-dealkylation
[3] Hippuric acid
[4] 4-hydroxymethamphetamine
[5] 4-hydroxyamphetamine
[6] Norephedrine
[7] 4-hydroxynorephedrine



شکل ۱-۲. مکانیسم احتمالی متابولیسم متامفتامین. در انسان متابولیت‌های اصلی I و II . در موش I، III و VI متابولیت‌های اصلی هستند

۱- ۲- ۸. نیمه عمر پاک سازی از خون

نیمه عمر متامفتامین بین ۴-۵ ساعت گزارش شده است و دفع آن از طریق ادرار صورت می-گیرد که سرعت دفع بسته به pH ادرار متفاوت است (pH اسیدی باعث افزایش ترشح متامفتامین می‌شود).

دفع متامفتامین به صورت تغییر نیافته ۳۰ تا ۵۴ درصد کل دفع ادراری را تشکیل می‌دهد که همانطور که گفته شد، تحت تاثیر pH ادرار تغییر می‌کند [۱۴].

۱- ۲- ۹. زمان ورود متامفتامین به بزاق

متامفتامین ۲ تا ۴ ساعت بعد از مصرف به صورت استنشاقی، کشیدن یا خوراکی در بزاق قابل شناسایی است. غلظت متامفتامین در بزاق متناسب با غلظت آن در پلاسما می‌باشد [۱۹].

۱- ۳. اهمیت سنجش مت‌امفتامین و روش‌های سنجش آن

یکی از مهمترین راه‌های پیشگیری از اعتیاد و آثار شوم آن تشخیص صحیح و به هنگام سوء مصرف‌کنندگان مواد مخدر می‌باشد. اندازه‌گیری مت‌امفتامین در نمونه‌های بیولوژیکی مثل ادرار، خون، سرم، بزاق، عرق، مو و بافت‌های جامد برای تشخیص اعتیاد به شیشه (مت‌امفتامین) انجام می‌شود [۲۰]

۱- ۳- ۱. کروماتوگرافی

اساس کروماتوگرافی جداسازی بر اساس دو فاز ساکن و متحرک می‌باشد[۲۱].

۱-۳- ۱- ۱. کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

کروماتوگرافی لایه نازک نوعی کروماتوگرافی جذب سطحی است. TLC یکی از معمول‌ترین روش‌های مورد استفاده جهت تفکیک و شناسایی مواد مخدر است. این روش تقریباً سریع (این آنالیز به ندرت بیش از ۳۰ دقیقه طول می کشد)، حساس، کم‌هزینه و مورد استفاده برای طیف وسیعی از مواد مخدر است. با وجود مزایای مختلف این روش، در اکثر کشورها جواب آن به تنهایی معتبر نمی‌باشد. بر اساس فاز متحرک و مواد مرجع سه نوع TLC برای سنجش مت‌امفتامین گزارش شده است. در جدول (۱-۱) مشخصات این سه نوع TLC ذکر شده است [۲۲].

جدول ۱-۱. انواع سیستم‌های TLC برای مت‌امفتامین

	Solvent systems (mobile phases)		R_f Methamphetamine
System A:	Methanol	100	0.35 (0.31)
	Concentrated ammonia	1.5	
System B:	Ethyl acetate	85	0.22 (0.42)
	Methanol	10	
	Concentrated ammonia	5	
System C:	Cyclohexane	75	(0.28)
	Toluene	15	
	Diethylamine	10	

۱- ۳- ۱- ۲. کروماتوگرافی گازی[1] (GC)

کروماتوگرافی گازی یک روش معتبر برای جداسازی و اندازه گیری مواد مخدر مـی باشـد[۲۳]. روش کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری جرمی، Gold standard شناسایی مواد مخدر در نمونه هـای بیولوژیک می‌باشد[۲۴].

کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری جرمی (GC-MS)[2]

GC-MS قطعی‌ترین روش تأیید وجود مت‌امفتامین در نمونه محسوب می‌شود. حساسیت این روش در بافت‌هایی نظیر خون ۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر، کبد و کلیه ۳۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر و ادرار ۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر و در پلاسما ۱ نانوگرم بر میلی لیتر گزارش شده است [۲۴, ۲۵].

۱-۳-۱-۳. کروماتوگرافی مایع با فشار بالا[3] (HPLC)

علاوه بر روش GC روش HPLC یکی از مهمترین روش‌های جداسازی و اندازه‌گیری مواد مخدر است. در این روش به طور معمول از ستون اکتادسیل سلیکا (C18) با طولی کمتر ۳۰ سانتی‌متر و قطری کمتر از ۵ میلی‌متر استفاده می‌شود و از بافر فسفات با pH برابر ۲-۳ (همراه با متانول یا استونیتریل ۲-۲۰ درصد، در مواردی که گروه الکیل در ماده‌ی مورد سنجش دارای گروه الکیل طویل می‌باشد) به عنوان فاز متحرک برای مواد مخدر صنعتی (از جمله مت‌امفتامین) استفاده می‌شود . دتکتور مورد استفاده در این روش Diode array detector یا دتکتور با طول موج متغیر[4] است و برای هر آزمایش ۳ تا ۴ ساعت وقت لازم است . حساسیت این روش ۰/۰۵-۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌باشد [۲۶].

با توجه به مشکلات کار در روش‌های کروماتوگرافی برای مثال گران قیمت بودن دستگاه‌ها، مواد، وسائل و احتیاج به نیروی متخصص (برای GC و HPLC)، این روش‌ها نمی‌توانند به عنوان روش‌های رایج تشخیص مت‌امفتامین در مایعات بیولوژیک بخصوص برای تعداد زیاد نمونه و در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی کارآمد باشند و با ظهور روش‌های سنجش ایمنی، امروزه این سنجش‌ها

[1] Gas Chromatography
[2] Chromatography–mass spectrometry
[3] High-performance liquid chromatography

[4] Variable wavelength detector

به عنوان روش‌های آسان، در دسترس، ارزان قیمت و با حساسیت بالا و دقت مطلوب، جایگزین روش-های وقت‌گیر و پر هزینه کروماتوگرافی شده است[۲۶].

۱- ۳- ۲. سنجش های ایمنی

سنجش‌های ایمنی روشی برای تشخیص، تعیین غلظت و نوع آنتی بادی یا آنتی ژن هستند. آنتی بادی به عنوان یک معرف شناساگر بیش از نیم قرن است که مورد توجه بوده است. ولی کار و تحقیق در خصوص سنجش‌های ایمنی به مفهوم امروزی آن از زمان برسون و یلو[1] در سال ۱۹۵۹ آغاز شد. این دانشمندان برای اولین بار برای اندازه‌گیری انسولین پلاسما از آنتی بادی ضد انسولین استفاده کردند[۲۷] . در ۲۰ سال گذشته، تحقیقات گسترده‌ای برای استفاده از آنتی بادی در اندازه‌گیری ملکول‌های مختلف (هورمون‌ها، نوروپپتیدها، هاپتن‌ها و مشتقات داروها ...) انجام شده است [۲۸, ۲۹]. در این بین، ابداع تکنیک‌های جدید، نشان‌های تازه، اصلاح روش‌های مزدوج سازی، روش‌های جداسازی نشان‌های آزاد و متصل و تولید آنتی‌بادی همواره در کانون توجه دانشمندان این حوزه بوده است [۲۸] . اولین سنجش‌های ایمنی به کمک عناصر رادیو اکتیو ^{125}I و یا ^{3}H به عنوان نشان[2] انجام شدند. پس از آن، نشانه‌های آنزیمی و مواد فلورسانس در سنجش‌های ایمنی مورد استفاده قرار گرفت [۳۰].

آنتی‌ژن و آنتی‌بادی دو جزء اصلی سنجش‌های ایمنی هستند که در ذیل به صورت مختصر بررسی می شوند:

آنتی‌ژن: ماده خارجی حاوی اشکال فضایی ویژه است. بخشی از آنتی‌ژن که آنتی‌بادی به آن متصل می‌شود را شاخص آنتی‌ژنیک[3] (اپی‌توپ) می‌گویند. به آنتی‌ژنی که بتواند پاسخ ایمنی را بر علیه خود تحریک کند، ایمونوژن گویند. مولکول‌هایی که دارای وزن کمتر از ۵۰۰۰ دالتون هستند، معمولاً ایمونوژن‌های خوبی نیستند به چنین مولکول‌هایی هاپتن گویند. این مولکول‌ها در صورت اتصال کووالانت به یک مولکول (پروتئینی) بزرگتر، که حامل گفته می‌شود، خاصیت ایمونوژن پیدا می‌کنند و علیه آن آنتی بادی ساخته می‌شود[۳۱].

آنتی بادی: گلیکوپروتئین سرمی از دسته گاماگلبولین‌ها موسوم به ایمونوگلبولین‌ها می‌باشند که به عنوان بخشی از پاسخ ایمنی بر علیه ایمونوژن ساخته می‌شود و قادر است اتصالی ویژه،

---
1 Yellow and Berson
2 Marker
3 Antigenic determinant

غیرکووالانس و برگشت پذیر با آنتی ژن برقرار کند[۳۲]. سرعت تولید آنتی بادی ۳۰۰۰ - ۳۰۰۰۰ مولکول به ازای هر سلول در ثانیه است.

آنتی‌بادی پلی‌کلونال: آنتی‌بادی که از سلول‌های مختلف مولد آنتی‌بادی ساخته شده‌اند و مجموعه ناهمگونی از آنتی‌بادی‌های مختلف‌اند که علیه اپی توپ‌های مختلف یک آنتی‌ژن می‌باشند.

کلون سلولی : مجموعه سلول‌های زنده که در کنار هم زندگی می‌کنند.

تک کلون: مجموعه‌ای از سلول‌های کاملاً یکسان و مشابه که همگی از یک سلول حاصل شده-اند.

آنتی‌بادی منوکلونال: آنتی‌بادی که فقط از یک تک کلون ساخته‌شده‌است و مجموعه‌ی کاملاً یکنواختی از آنتی‌بادی‌هایی است که در تمام اجزاء مشابه‌اند و همگی علیه یک اپی‌توپ خاص می-باشند [۲۱].

ایمونوگلبولین‌ها بر اساس تفاوت در زنجیره سنگین به پنج کلاس اصلی: IgA, IgG, IgD, IgE, IgM تقسیم می‌شوند. IgG مهمترین آنتی‌بادی در پاسخ ایمنی ثانویه برضد آنتی‌ژنهای وابسته به تیموس است که قادر به اپسونیزاسیون، آگلوتیناسیون و پرسیپیتاسیون آنتی‌ژن‌ها می‌باشند، در تولید آنتی‌بادی بر علیه مزدوج هاپتن-پروتئین حامل، عوامل چندی دخالت دارند که شامل:

۱) محل و شیمی فضایی پل به کاررفته بین هاپتن و پروتئین حامل
۲) نسبت مولی هاپتن به پروتئین حامل (مناسب‌ترین نسبت ۳۰ - ۱۰ مولکول هاپتن به ازای هر مولکول حامل می باشد).
۳) نوع و طول پل به کار رفته
۴) نوع پروتئین حامل
۵) روش به کار رفته برای ایمونیزاسیون
۶) واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی مهمترین مشخصه این دو ترکیب و پایه سنجش‌های ایمنی می‌باشد.

برای سنجش مولکول آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به یک عامل شناساگر نیاز می‌باشد. در دهه‌های اخیر روش‌هایی برای نشاندار کردن آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی ابداع شده که بر اساس نوع نشان به کار رفته به دو دسته کلی تقسیم می‌شوند:

۱- نشان‌های رادیواکتیو
۲- نشان‌های غیررادیواکتیو [۲۱]

۱- ۳- ۲- ۱. سنجش‌های ایمنی با رادیوایزوتوپ‌ها[1] (RIA)

RIA اولین بار در سال ۱۹۵۹ ابداع شد و در این روش آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی با ایزوتوپ‌های رادیواکتیو مثل ^{125}I، ^{3}H، ^{131}I و ^{35}Co نشاندار شده‌اند. از ویژگی‌های این روش حساسیت، ویژگی و تکرارپذیری آن است ولی آلوده‌کنندگی محیط زیست بشری یکی از مهمترین مشکلات و ضعف‌های این روش می‌باشد [۳۳, ۳۴].

۱- ۳- ۲- ۲. سنجش‌های ایمنی غیررادیوایزوتوپی

نشان‌های استفاده شده دراین سنجش‌ها که گسترش زیادی یافته‌اند، شامل: آنزیم‌ها، مواد فلورسانس‌زا، کوآنزیم‌ها، مهارکننده‌های آنزیمی، خاموش‌کننده‌های فلورسانس، پیش‌سازهای کیمولومینسانس، باکتریوفاژها، لاتکس‌ها، گلبول‌های قرمز، لیپوزوم‌ها، اتم‌های فلزی و رادیکال‌های آزاد پایدار، می‌شوند [۳۵].

۱- ۳- ۲- ۳. سنجش ایمنی با آنزیم[2](EIA)

آنزیم‌ها یک دسته از ترکیبات غیررادیواکتیواند که در سنجش‌های بیولوژیکی و بالینی کاربردهای فراوانی به عنوان نشان پیدا کرده‌اند. اصول و حساسیت EIA مثل RIA می‌باشد که اولین بار در سال ۱۹۷۱ توسط انگوال[3] ابداع گردید. آنزیم‌ها مولکول‌های پروتئینی با خاصیت کاتالیزوری هستند که در مقادیر ناچیز نیز قادر به تبدیل میزان قابل توجه سوبسترا به محصول واکنش می‌باشند و این تبدیل گاهی با تغییرات رنگی، فلورسانس یا لومینوسانس مشخص در سوبسترا یا یکی از اجزاء دیگر واکنش همراه است.

در واکنش اصلی در EIA، مولکول آنتی ژن با آنزیم نشاندار شده است و با آنتی ژن غیرنشاندار برای اتصال به آنتی بادی ویژه رقابت می‌کند. میزان تغییرات رنگی حاصل از تبدیل سوبسترا به محصول نشانگر میزان آنتی ژن نشاندار متصل به آنتی بادی است و رابطه عکس با مقدار آنتی ژن غیرنشاندار دارد [۲۱, ۳۶].

---

1 Radioimmunoassay
2 Enzyme Immunoassay
3 Engvall

انواع سنجش‌های ایمنی با آنزیم

این سنجش‌ها بر اساس واکنش کلی که در محلول انجام می‌شود به دو دسته تقسیم می‌شوند:

۱) سنجش ایمنی آنزیمی همگن[۱]

۲) سنجش ایمنی آنزیمی ناهمگن [۲]

این تقسیم بندی براساس توانایی یا عدم توانایی آنتی بادی برای ایجاد تغییرات در فعالیت آنزیم متصل به آنتی ژن می‌باشد[۲۱].

۱) سنجش EIA همگن

در این سیستم به جداسازی اجزاء واکنش نیازی نیست و فعالیت آنزیم در اثر واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. رایج‌ترین نوع EIA همگن، EMIT است. در این روش ردیاب یک آنتی ژن متصل به آنزیم است و اتصال آنتی‌بادی به کمپلکس آنتی ژن- آنزیم سبب غیرفعال شدن آنزیم می شود. آنتی ژن نشاندار و غیرنشاندار در اتصال به آنتی بادی رقابت می‌کنند و فعالیت آنزیم در آنتی ژن نشاندار متصل نشده به آنتی بادی حفظ می‌شود. پس فعالیت آنزیم متناسب با میزان غلظت آنتی‌ژن غیر استاندارد (آنالیت) می‌باشد [۲۱, ۲۹].

۲) سنجش EIA ناهمگن

در این سیستم چون بین علائم حاصل از آنتی‌ژن نشاندار متصل به آنتی‌بادی و غیرمتصل اختلافی وجود ندارد، پس مرحله جداسازی این دو جزء نیاز است. برای جداکردن آنتی ژن نشاندار متصل به آنتی‌بادی و غیرمتصل از روش‌های: رسوب با غلظت‌های بالای نمک (با سولفات آمونیوم، سولفات سدیم)، دناتوره کردن و رسوب پروتئین (با متانول، اتانول، استن و ...)، رسوب دادن (با پلی-اتیلن گلیکول، آنتی‌بادی ثانویه)، فاز جامد (لوله آزمایش، ذرات جامد)، جذب لیگاند آزاد (با استفاده از تالک، ذغال، سیلیکا و ...)، جداسازی فیزیکی (سانتریفوژ کردن، صاف کردن) استفاده می‌شود.

نوعی از EIA ناهمگن که آنتی‌بادی یا آنتی ژن به روی یک فاز جامد ثابت شده است ELISA نامیده می‌شود [۲۱, ۳۷].

---
[1] Homogeneous
[2] Heterogeneous

انواع EIA ناهمگن شامل: روش اتصال رقابتی، روش غیرمستقیم و روش ساندویچ می‌باشد.

۱) روش اتصال رقابتی

در این سیستم نمونه مورد بررسی که واجد آنتی‌ژن غیرنشاندار است به آنتی‌بادی ثابت شده بر روی سطح جامد اضافه می‌شود و همزمان و یا با فاصله زمانی، آنتی‌ژن نشاندار نیز اضافه می‌شود. بعد از انکوباسیون و شستشو (مرحله جداسازی)، فعالیت آنزیم باقیمانده بر روی فاز جامد، با افزودن سوبسترای اختصاصی سنجیده می‌شود. فعالیت آنزیم رابطه عکس با غلظت آنتی‌ژن غیرنشاندار دارد [۲۱, ۳۸]

۲) روش غیر مستقیم

این سیستم برای بررسی وجود آنتی‌بادی در نمونه مورد بررسی طراحی شده است. با اضافه کردن نمونه حاوی آنتی‌بادی بر آنتی‌ژن ثابت شده روی سطح جامد و طی شدن زمان انکوباسیون، عمل شستشو را انجام داده و سپس آنتی‌بادی ثانویه نشاندار افزوده می‌شود. پس از انکوباسیون و شستشوی مجدد، فعالیت آنزیم باقی مانده بر سطح جامد با اضافه کردن سوبسترای ویژه‌ای سنجیده می‌شود که نسبت مستقیم با غلظت آنتی بادی موجود در نمونه دارد [۲۱, ۳۸].

۳) روش ساندویچ

در این روش آنتی‌ژن (که بیشتر از یک شاخص آنتی ژنیک دارد) برروی آنتی‌بادی ثابت شده روی سطح جامد اضافه می‌شود و بعد از انکوباسیون و شستشو، آنتی‌بادی نشاندار دومی (علیه یک اپی‌توپ دیگر آنتی ژن می‌باشد) را به سیستم می‌افزایند و پس از انکوباسیون و شستشوی مجدد، فعالیت آنزیم‌های متصل به آنتی‌ژن را به کمک سوبسترای ویژه می‌سنجند. مقدار فعالیت آنزیمی رابطه مستقیم با میزان آنتی‌ژن موجود در نمونه دارد [۲۱, ۳۸]

۱-۴. انواع سنجش‌های ایمنی برای مت‌امفتامین

با تولید انواع آنتی‌بادی های پلی‌کلونال و منوکلونال با تمایل مناسب برای مت‌امفتامین، انواع روش‌های سنجش ایمنی برای مت‌امفتامین تهیه شده است.

۱- ۴- ۱. رادیوایمنواسی

با استفاده از روش RIA می‌توان مت‌امفتامین را با غلظت‌های در حد نانوگرم بر میلی‌لیتر در مایعات بیولوژیک شناسایی کرد[۳۴] همچنین این روش برای شناسایی مت‌امفتامین در نمونه مو، با حساسیت ۵ نانوگرم در ۱۰ میلی‌گرم مو نیز گزارش شده است [۳۹].

۱- ۴- ۲. لاتکس آگلوتیناسیون مهاری

در این روش با استفاده از ذرات لاتکس پوشیده شده با آنتی بادی بر علیه مت‌امفتامین (Latex-Ab) و مت‌امفتامین کنژوگه با آلبومین سرم خرگوش (Latex-MA)، از طریق فرایند آگلوتیناسیون مهاری، مت‌امفتامین در نمونه ادرار افراد سوءمصرف‌کننده شناسایی می‌شود. جواب تست بعد از ۵-۴ دقیقه پس از اضافه کردن ذرات لاتکس مذکور به نمونه ادرار فرد مشخص می‌شود. اگر در نمونه مت-امفتامین وجود نداشته باشد، ذرات لاتکس حاوی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به یکدیگر متصل شده و آگلوتیناسیون رخ می‌دهد ولی اگر متامفتامین در نمونه وجود داشته باشد انگاه با آنتی مت‌امفتامین متصل به ذرات لاتکس واکنش داده و از اتصال آنها به ذرات لاتکس حاوی مت‌امفتامین جلوگیری کرده و در نتیجه آگلوتیناسیون رخ نمی‌دهد. حساسیت این تست، ۰/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر ادرار گزارش شده است [۴۰].

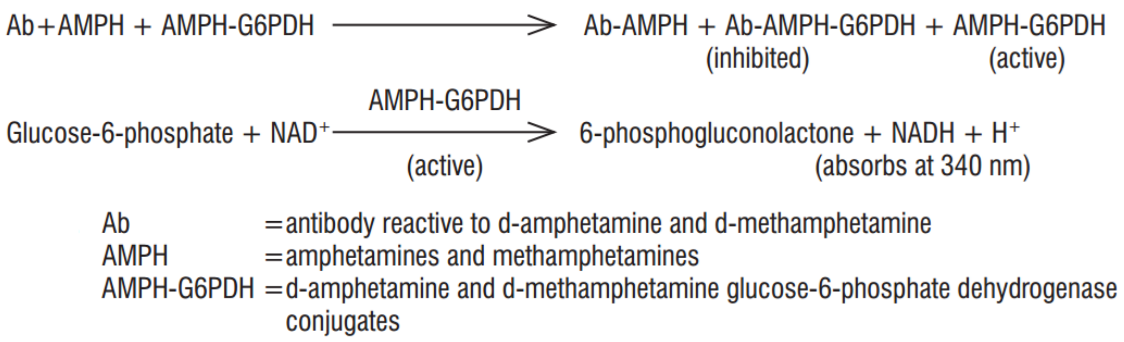
۱- ۴- ۳. هماگلوتیناسیون مهاری

اساس این روش مشابه لاتکس آگلوتیناسیون مهاری می‌باشد ولی در اینجا آنتی ژن و آنتی بادی به گلبول‌های قرمز گوسفند متصل می‌شوند. حساسیت این تست برای مت‌امفتامین ۱ نانوگرم در میلی لیتر ادرار گزارش شده است [۴۱].

۴-۴. سنجش ایمنی با آنزیم (EIA)

۱-۴-۴-۱. سنجش EIA همگن

روش EMIT با حساسیت ۱ mg/L (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) برای شناسایی مت‌امفتامین در ادرار گزارش شده است [۴۲]. در این روش از آنزیم گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز استفاده می‌شود.



۱-۴-۴-۲. سنجش EIA ناهمگن

از روش ELISA به صورت گسترده برای شناسایی مت‌امفتامین در مایعات بیولوژیک استفاده می‌شود [۴۳-۴۵]. در این روشها از آنزیم پروکسیداز گیاهی (HRP)[۱] استفاده می_شود و حساسیت در حد ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است .

۱-۴-۵. ایمنوکروماتوگرافی

یکی از روش‌های سنجش ایمنی، ایمنوکروماتوگرافی است که تلفیقی از روش کروماتوگرافی و سنجش‌های ایمنی می‌باشد و مزایای هر دو روش را دارا می‌باشد [۴۶].

۱-۴-۵-۱. سنجش‌های سریع[۲]

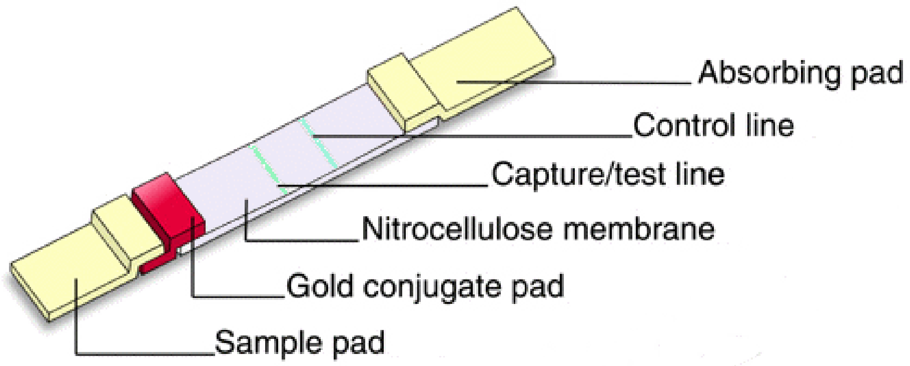
سنجش‌های سریع شکلی از ایمنوکروماتوگرافی می‌باشند . استفاده راحت، عدم نیاز به نیروی متخصص، هزینه کم و انجام سریع از مزایای سنجش‌های سریع هستند، از این رو سنجش‌های سریع

[1] Horseradish peroxidase
[2] Rapid test

دارای طرفداران زیادی می‌باشد. امروزه محصولات بسیار متنوع از سنجش‌های سریع در بازار عرضه شده است ولی به دلیل قابلیت توسعه که در زمینه این سنجش‌ها وجود دارد هنوز مطالعات در این حوزه ادامه داشته و صورت می‌گیرد.

۱- ۴- ۵- ۱- ۱. ساختار یک نوار سنجش سریع

یک نوار (strip) سنجش سریع از شش جزء مختلف تشکیل شده است. نمونه به جزء اول، که به پد نمونه موسوم است، افزوده می‌شود. پد نمونه به پد کونژوگه متصل است. براساس نوع تست در پد کونژوگه آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن نشانه‌دار حضور دارد. نمونه بعد از عبور از این بخش وارد غشاء می‌شود. مهمترین عامل حرکت نمونه در غشاء خاصیت موئینگی آن است. روی غشا خط تست و خط کنترل قرار دارد. عملکرد خط کنترل برای تأیید صحت جواب تست می‌باشد. در قسمت انتهایی غشا جزء ششم قرار دارد که به پد جاذب معروف است و معرف‌های اضافی را جذب می‌نماید. کلیات مربوط به یک سنجش سریع در شکل ۱- ۴ نشان داده شده است.



شکل ۱-۳. نوار (strip) سنجش سریع

۱) آنتی‌بادی

از سه نوع آنتی‌بادی می‌توان در سنجش‌های سریع استفاده کرد: منوکلونال، پلی‌کلونال و آنتی-بادی‌های نوترکیب. اساس طبقه‌بندی براساس شیوه تولید این آنتی‌بادی‌هاست. آنتی‌بادی‌های نوترکیب ممکن است یک آنتی‌بادی کامل نباشند و همه اجزای آنتی‌بادی را نداشته باشند، ولی لزوماً قسمت‌های F_{ab} را دارند. این نوع از آنتی‌بادی‌ها توسط تکنیک‌های DNA نوترکیب تولید می‌شوند.

برای اینکه یک آنتی‌بادی را بتوان در سنجش سریع به کار برد، بایست آن را به شکل مطلوب تخلیص کرد. آنتی‌بادی‌های منوکلونال بهترین انتخاب هستند [۴۷].

۲) خط تست

بنا به نوع تست، آنتی ژن یا آنتی بادی در خط تست قرار می‌گیرد. در بسیاری از مواد نتایج تست را می‌توان با چشم غیرمسلح نیز قرائت نمود و خط ایجاد شده حالت شفاف و واضح دارد. در صورتی که خط تست واضح نباشد، نتایج نیز غیرقابل تفسیر خواهند بود به منظور اینکه خط تست دارای دقت و کیفیت قابل اعتماد باشد بایست یک سری فاکتورها اپتیموم‌سازی شوند. در صورتی که در تست، خط کنترل نیز باشد، همان اصول بایست رعایت شود.

نخست اینکه پروتئین متصل به غشاء در خط تست بایست به مقدار کافی باشد. در صورتی که مقدار پروتئین کم باشد، خط تشکیل شده ضعیف بوده و موجب کاهش حساسیت تست می‌شود. همچنین در صورتی که مقدار زیادی پروتئین به غشاء متصل شود، تمام جایگاه‌های اتصال به پروتئین در منطقه خط تست اشباع می‌شوند و از این رو این پروتئین‌ها به نواحی مجاور منتشر شده و موجب افزایش عرض خط تست می‌شود. پروتئین‌ها بایست در بافر انتخاب شده محلول باشند و قدرت یونی، اسیدیته و عوامل رسوب دهنده پروتئین‌ها می‌توانند اتصال پروتئین به غشاء را تحت تأثیر قرار دهند [۴۸].

۳) غشاء

یکی از مهمترین قسمت‌های مربوط به سنجش‌های سریع غشای استفاده شده در این سنجش- هاست. غشاء بسیاری از نیازهای مربوط به یک سیستم سنجش از قبیل فیکس نمودن مولکول‌ها، نگهداری طولانی مدت و کوتاه مدت، برهمکنش مولکول‌ها با یکدیگر در روی سطح (بدون تأثیر بر خصوصیات شیمیایی آن‌ها) را فراهم می‌سازد. سلولز، استات سلولز، پلی‌اتر سولفون و نایلون مورد آزمون قرار گرفته‌اند ولی اغلب از نیتروسلولز مورد استفاده قرار می‌گیرد. تمامی غشاهای مورد استفاده عموماً ضخامتی حدود ۱۰۰ میکرومتر دارند و میانگین اندازه منافذ آن‌ها از ۱۰- ۰/۵۰ میکرومتر است و حداقل به صورت نسبی می‌توانند به مولکول‌های مختلف متصل شوند. نیتروسلولز نسبت به غشاهای دیگر قادر است مقدار بیشتری آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن‌های پروتئینی را در روی خود نگه دارد و از این رو

نسبت به سایر غشاهای سلولز ترجیح داده می‌شود. هم چنین بلوک نمودن این غشاها نسبت به غشاهای نایلونی بسیار آسان‌تر است[۴۹].

تاریخچه غشاهای نیتروسلولزی از دهه ۱۹۶۰ شروع شد. در این دهه قابلیت اتصال نیتروسلولز به مواد مختلف مورد توجه قرار گرفت. از آن زمان به بعد غشاهای نیتروسلولز برای بلاتینگ و سنجش-های ایمنی مورد استفاده قررا می‌گیرند [۵۰].

۴) پد نمونه و پد کونژوگه

عملکرد پد نمونه این است که حرکت محلول نمونه بر پد کونژوگه را تضمین نماید. همچنین این پد را می‌توان طوری طراحی نمود که از ورود مایع اضافی به درون پد کونژوگه جلوگیری نماید. یک پد نمونه از فیبرهای سلولز ساخته می‌شود و می‌توان آن را طوری پردازش نمود که ویسکوزیته نمونه را افزایش دهد. افزایش ویسکوزیته می‌تواند به اتصال آنتی‌ژن- آنتی‌بادی کمک نماید. عوامل بلوک کننده را نیز می‌توان بر روی پد نمونه قرار داد. پد کونژوگه معمولاً از فیلترهای غیرمواج نظیر فیبرهای شیشه‌ای ساخته می‌شود. این فیلترها دارای میل اتصال غیراختصاصی جزئی هستند، خصوصیات جریان آن‌ها ثابت است و حجم بستر مشخصی دارند[۵۱].

۵) پد جاذب

عملکرد پد جاذب این است که مقدار و سرعت محلولی را که از غشاء عبور می‌نماید، افزایش دهد. در واقع پد جاذب حجم عبوری مایع از روی خط تست را افزایش می‌دهد. افزایش عبور مایع از روی خط تست سبب می‌شود تا ذراتی را که خوب به خط تست متصل نشده‌اند شستشو داده و از روی خط تست حذف نمود. که این عمل موجب کاهش رنگ زمینه تست می‌شود. جنس پد جاذب به اندازه بقیه اجزاء تست اهمیت ندارد. هر چیزی که به عنوان پد جاذب استفاده می‌شود بایست خاصیت جذب رطوبت را داشته باشد. برای مثال فیلترهای سلولز را می‌توان برای پد جاذب استفاده نمود [۵۱].

۶) نشانه

نشانه جزء اصلی تست است به این دلیل که اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن با چشم غیرمسلح و بدون استفاده از نشانه قابل رویت نیست. ذرات طلا معمول‌ترین ذراتی هستند که به عنوان نشانه در

تست‌های سنجش سریع ایمنوکروماتوگرافی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما ذرات دیگری مثل ذرات لاتکس، کربن و سلنیوم نیز می‌توانند در این سیستم به کار گرفته شوند. ذرات پارامغناطیسی، جدیدترین نشانه‌هایی هستند که در سنجش‌های سریع مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اگرچه اساس و نیز رفتارهای مولکولی تمامی نشانه‌ها با هم متفاوت است اما هر مولکولی که به عنوان نشانه به کار برده می‌شود بایست بتواند به آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی مورد نظر اتصال یابد. همچنین کونژوگه‌ای که تولید می‌شود بایست در شرایط محیط پایداری قابل قبولی داشته باشد [۵۲].

نشانه باید در شرایط رطوبتی متفاوت و نیز در صورت اتصال به غشاء پایدار بماند. همچنین اندازه آن بایست به اندازه کافی کوچک باشد تا بتواند برای استفاده در غشاء متناسب باشد. از آن جائی که سنجش سریع بایست سریع و نیز ارزان باشد مولکول نشانه بایست به راحتی قابل مشاهده باشد [۵۳] . در این مطالعه نانوذرات طلا به عنوان نشان مورد استفاده قرار گرفتند که تقریباً تمامی این فاکتورها را دارند.

طلای کلوئیدی، طلا در حد نانوذرات است که به صورت یکنواخت در سرتاسر محلول پراکنده شده است و تفاوت های مختلفی با توده فلزی طلا دارد. مهمترین خصوصیت متفاوت آن تغییر رنگ آن است. طلای فلزی زرد رنگ است اما نانوذرات طلا که قطر تقریبی آن‌ها حدود ۱۰ نانومتر باشد در محلول به رنگ قرمز تیره هستند. در صورتی که اندازه ذرات به حدود ۱۰۰ نانومتر افزایش یابد یا شکل نانوذرات تغییر نماید رنگ محلول طلا نیز تغییر می‌یابد. برای مثال ذرات کلوئیدی استوانه‌ای شکل تقریباً رنگ آبی دارند. این تغییر رفتار را می‌توان با توجه به پدیده جذب نور توجیه نمود. در سطح فلزات یک باند هادی وجود که در آن الکترون‌ها به صورت آزاد حرکت می‌کنند[۵۴]. زمانی که قطر نانو ذرات طلا کاهش می‌یابد این الکترون‌ها که در روی ذرات مختلف قرار دارند کنار همدیگر قرار گرفته و زمینه جذب نور را فراهم می‌سازند. این پدیده را پدیده جذب پلاسمون سطحی می‌نامند. مقالات مرتبط با آماده‌سازی ذرات کلوئیدی طلا در بانک‌های زیستی بسیار فراوان است. نانوذرات طلا را می‌توان با استفاده از دو روش متفاوت تولیدکرد. برای مثال می‌توان یک توده طلا را با استفاده از تابش‌های یونی از هم تجزیه نمود یا اینکه طلای کلوئیدی را می‌توان با فرایندهای شیمیایی تولید نمود. در روش تابش یونی کنترل حجم و نیز اندازه و شکل نانو ذرات تولید شده بسیار سخت است. زمانی که ذرات طلا در سنجش‌های سریع مورد استفاده قرار می‌گیرند بایست اندازه ذرات بسیار نزدیک به هم باشد که این امر تنها از طریق مسیر سنتتیک میسر است. یکی از روش‌های سنتتیک روش احیای سیترات است که برای نخستین بار در سال ۱۹۵۱ معرفی گردید[۵۵]. در سال ۱۹۷۳ مشخص گردید که اندازه نانوذرات طلا را می‌توان با توجه به مقدار طلا در مقایسه با سایر مواد کنترل

نمود. به دلیل سادگی روش هنوز از این روش استفاده می‌شود. ذرات طلا را می‌توان با استفاده از سدیم بروهیدرات در حضور تیول‌های پایدار کننده، نیز احیاء نمود. طلای کلوئیدی را می‌توان برای اهداف مخلف تولید نمود. این ماده به عنوان عامل رنگ‌آمیزی در صنعت شیشه کاربرد دارد. در شیمی طلای کلوئیدی می‌تواند برای کاتالیز برخی از واکنش‌های شیمیایی استفاده شود. استفاده از طلای کونژوگه شده با پروتئین‌ها حدود چند دهه پیش آغاز گردید. در اوایل محققین متوجه شدند که مایع مغزی نخاعی از رسوب نانوذرات طلا جلوگیری می‌نماید و اگر مایع دچار اختلال بوده و طبیعی نباشد این رسوب اتفاق خواهد افتاد. این مشاهده موجب توسعه طلای کلوئیدی به عنوان نشانه‌ای برای پروتئین‌های مختلف گردید [۵۶].

طلای کلوئیدی به عنوان جزئی از سیستم‌های اندازه‌گیری متنوع مورد استفاده قرار گرفته است. به دلیل ظرفیت بالای ذرات طلا برای اتصال به پروتئین‌ها از این ذرات می‌توان به عنوان جزئی از تکثیر سیگنال استفاده کرد. یکی از روش‌ها این است که ذرات کلوئیدی طلا ساخته شوند و سپس آنتی‌بادی‌ها با این سطوح متصل شوند. رویکرد دیگر این است که از طلای کلوئیدی به عنوان مولکول حامل برای بسیاری از مولکول‌های نشانه استفاده شده است. در برخی مطالعات ذرات طلا با کمپس-های آنتی‌بادی- پراکسیداز پوشانده شده است و زمانی که آنتی‌بادی به آنتی‌ژن متصل می‌شود سیگنال تولید می‌شود و سپس سیگنال تکثیر می‌شود. علاوه بر موارد گذشته، سیگنال ایجاد شده را می‌توان با رسوب ذرات نقره بر سطح ذرات طلا تقویت نمود. این استراتژی می‌تواند برای افزایش حساسیت استفاده شود. برای مثال با این روش حساسیت سیستم استرپتوآویدین- بیوتین از ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت. پوشش‌های نقره‌ای در محلول‌های اسیدی حل می‌شوند و می‌توان آن‌ها را با ولتامترهای آندی اندازه‌گیری کرد. هم چنین ذرات نقره می‌توانند مثل پل بین ذرات طلا قرار گیرند و اندازه‌گیری مقدار هدایت جریان را آسان‌تر می‌سازد. در این مطالعه طلای کلوئیدی به عنوان نشانه مورد استفاده قرار می‌گیرند. ولی ما در این سیستم از مکانیسم‌های افزایش سیگنال استفاده نخواهیم کرد. دلیل استفاده از این سیستم آن است که بسیار ساده بوده و تنها به یک مرحله برای شناسایی سیگنال نیاز دارد. هم چنین برای خواندن نتایج یه هیچ دستگاه دیگری نیاز نیست. زمان مورد نیاز برای انجام سنحش با این روش بسیار کم است و کونژوگه-های تولید شده برای مدت‌های طولانی قابل نگهداری است. هم چنین این روش بسیار ارزان است. همچنین در مطالعاتی که به مقایسه طلای کلوئیدی با نتایج حاصل از ELISA پرداخته‌اند مطابقت بسیار زیادی یافته شده است.

۴- ۵- ۱- ۲. ساز و کار سنجش‌های سریع

۱- ۴- ۵- ۱- ۲- ۱. روش ساندویچی

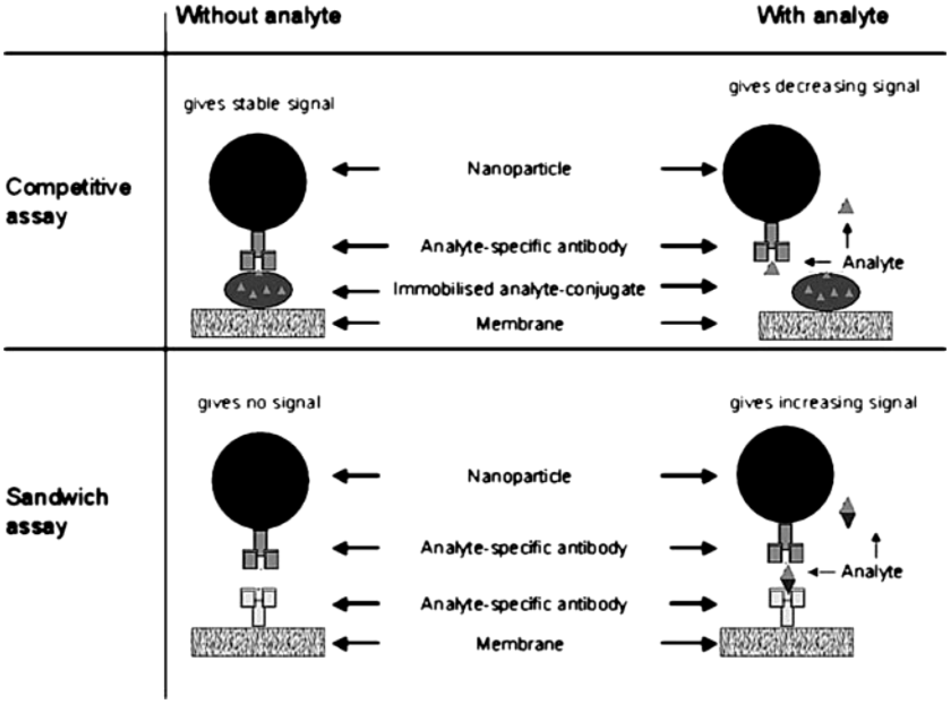
در این فرمت از سنجش‌های سریع، نانوذرات به آنتی بادی بر علیه آنالیت (Ab-1) مورد بررسی متصل می‌شوند و در پد کنژوگه قرار می‌گیرند. آنتی بادی دیگری بر علیه آنالیت (Ab-2) مورد نظر در خط تست قرار می‌گیرد و آنتی بادی بر علیه ایمنوگلوبولین در خط کنترل گذاشته می‌شود.

در صورت وجود آنالیت مورد نظر در نمونه مورد سنجش خط تست تشکیل می‌شود (شکل ۱-۴) [۵۷].

۱- ۴- ۵- ۱- ۲- ۲. روش رقابتی

در این فرمت از سنجش‌های سریع نانوذرات به آنتی بادی بر علیه آنالیت مورد بررسی متصل می‌شوند و در پد کنژوگه قرار می‌گیرند. و آنتی ژنی تهیه شده از آنالیت مورد نظر در خط تست قرار داده می‌شود و خط کنترل نیز مانند فرمت ساندویچی بعد از خط تست گذاشته می‌شود.

در صورت وجود آنالیت مورد نظر در نمونه مورد سنجش به آنتی بادی موجود در پد کنژوگه متصل شده و مانع اتصال آنتی بادی نشان‌دار مذکور به خط تست می‌شود در نتیجه در نمونه های مثبت خط تست دیده نمی‌شود (شکل ۴-۱)[۵۷]. این فرمت از سنجش سریع مورد استفاده برای سنجش مواد مخدر بوده و در مطالعه حاضر نیز از همین فرمت استفاده شده است.



شکل ۱-۴. مقایسه فرمت رقابتی و ساندویچی در سنجش ایمنوکروماتوگرافی

۱- ۵. نمونه مورد استفاده در آزمایشات اعتیاد

همان طور که ذکر شد آزمایشات اعتیاد با استفاده از نمونه‌های بیولوژیکی متفاوت مثل ادرار، خون، سرم، بزاق، عرق، مو و بافت‌های جامد انجام می‌شود، ولی در این بین استفاده از نمونه ادرار معمول‌تر می‌باشد.

۱- ۵- ۱. ادرار

معمولاً آزمایش‌های اعتیاد با نمونه ادرار انجام می‌شود، ولی استفاده از نمونه ادرار دارای معایبی می‌باشد:

۱) به دلیل اینکه در هنگام نمونه‌گیری ناظر نمی‌تواند به راحتی حضور داشته باشد، می‌توان در آن تقلب کرد.

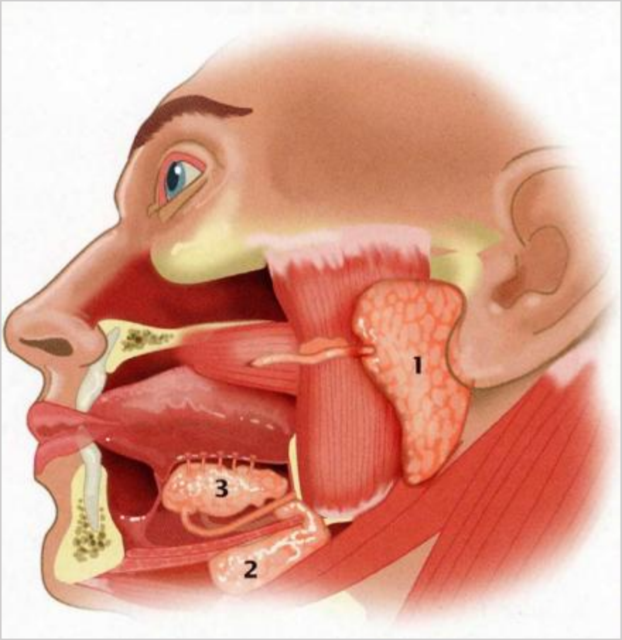
۲) به راحتی می‌توان آن را رقیق کرد.

۳) غلظت دارو در ادرار متناسب با غلظت آن در خون نیست و از طریق نمونه ادرار نمی‌توان فردی که به تازگی مصرف کرده را شناسایی کرد [۵۸].

مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از نمونه بزاق برای آزمایشات اعتیاد مناسبتر است. در واقع از زمان به وجود آمدن آزمایش‌های اعتیاد این علاقه وجود داشت که از نمونه بزاق (oral fluid) استفاده شود. یکی از اولین مقالاتی که درباره سنجش‌های ایمنی با موضوع غربالگری سوءمصرف مواد مخدر به چاپ رسید از نمونه بزاق استفاده کرده بود. در سال ۱۹۹۰ اولین سنجش سریع برای مواد مخدر در نمونه بزاق تولید شد و در شروع قرن ۲۱ پیشرفت‌های قابل توجهی در این زمینه مشاهده شد [۵۹].

۱- ۵- ۲. بزاق

بزاق یک ترکیب پیچیده است که غالب آن از ۳ جفت غده بزاقی ترشح می‌شود (شکل ۱-۶) [۶۰] داروها از طریق انتشار ساده از خون وارد بزاق می‌شوند. فاکتورهای که در انتشار دارو به بزاق موثرند، شامل: اندازه و شکل دارو و بار الکتریکی آن، میزان دارو که در پلاسما به پروتین متصل می-شود، میزان حلالیت دارو در چربی و همچنین pH خون و بزاق است [۵۸, ۶۱].



شکل ۱-۵. موقعیت آناتومیک سه جفت غده اصلی بزاقی.۱-

غدد بناگوشی ۲- غدد تحت الفکی و ۳-غدد زیرزبانی

مزایای استفاده از بزاق به عنوان نمونه برای آزمایشات اعتیاد شامل موارد زیر می‌باشد :

۱) نمونه گیری از بزاق یک روش غیرتهاجمی است

۲) در هر مکانی قابل نمونه گیری است و چون به راحتی در حضور ناظر انجام می یرد امکان تقلب در آن بسیار پایین است

۳) مهمترین مزیت آن این است که غلظت دارو در بزاق متناسب با غلظت دارو در خون است (مطالعات نشان می‌دهد وقتی مت‌امفتامین در سرم قابل شناسایی است در بزاق نیز یافت می‌شود). از این طریق می توان فردی که به تازگی مواد مصرف کرده و اثر دارو در او وجود دارد را شناسایی کرد. این امر برای شناسایی رانندگان تحت تاثیر مواد بسیار حائز اهمیت است [۶۲, ۶۳].

از آنجا که سنجش ایمنو کروماتوگرافی روشی دقیق و سریع برای تشخیص مواد مخدر بوده و همان طور که ذکر شد بزاق نیز نمونه مناسبی برای این گونه سنجش‌ها می‌باشد، از این رو هدف ما در تحقیق حاضر طراحی سنجش ایمنوکروماتوگرافی حساس به منظور اندازه گیری بالینی مت‌امفتامین در نمونه بزاق می‌باشد.

فصل دوم

مواد و روش‌ها

۲-۱. مواد، وسایل و دستگاه‌ها

۲-۱-۱. مواد شیمیایی مورد نیاز جهت سنتز مشتق مت‌امفتامین (METH)

مت‌امفتامین، دی کلرومتان (CH_2Cl_2)، تری‌اتیل‌آمین (TEA)، استیل‌کلراید، اسیدکلریدریک (HCl)، آب نمک اشباع، اتیل‌سوکسینیل کلراید، آلومینیوم‌کلراید ($AlCl_3$)، منیزیم سولفات ($MgSO_4$)، تری‌هیدروفوران(THF)، سدیم‌بروهیدرات[۱] ($NaBH_4$)، استونیتریل، تری‌متیل‌سیلیل‌کلراید[۲] (Me_3SiCl)، سدیم یدات(NaI)

۲-۱-۲. مواد مورد نیاز جهت سنتز ایمنوژن (BSA-METH) و تولید آنتی بادی

آلبومین سرم گاوی (BSA)، ۱-اتیل-۳-(۳- دی متیل آمینوپروپیل) کربودی ایمید[۳] (EDC)، N-هیدروکسی‌سوکسینماید[۴] (NHS)،دی‌متیل‌فورمامید (DMF)، بافر PBS، کیسه دیالیز، ادجونت کامل فروند، ادجونت ناقص فروند

۲-۱-۳. بافرها و محلول‌ها

۲-۱-۳-۱. بافرهای ELISA

بافر PBS: ۱۰ گرم NaCl، ۱/۴۴ گرم Na2HPO4، ۰/۲۵ گرم KCl، ۰/۲۵ گرم KH2PO4 در یک لیتر آب، مقطر pH ۷/۲.

---

[1] Sodium borohydride
[2] TrimethylSilylchloride
[3] 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
[4] N-hydroxysuccinimide

بافر PBST: بافر PBS حاوی ۰/۱٪ Tween 20.

بافر EIA: PBS حاوی ۰/۱ ٪ BSA.

محلول بلاک‌کننده (بلاکر): بافر PBS حاوی ۵٪ شیر خشک بدون چربی.

محلول متوقف کننده واکنش الایزا: محلول ۲ نرمال اسیدکلریدریک.

۲-۱-۳-۲. معرف برادفورد

۱۰۰ میلی‌گرم رنگ کوماسی بریلیانت بلو G250 را در ۵۰ml متانول حل کرده و پس از صاف کردن با فیلتر واتمن شماره ۱ به آن ۱۰۰ ml اسید فسفریک(w /v) ۸۴٪ افزوده و با آب مقطر به حجم یک لیتر می‌رسانیم.

۲-۱-۳-۳. بافرهای تخلیص آنتی‌بادی

۱) مواد و محلول های مورد نیاز:

۲) بافر فسفات ۱۷/۵ میلی‌مولار و۶/۳ pH

۳) برای تهیه این بافر بایستی ۱/۸۷ گرم از نمک NaH_2PO_4 و ۰/۲۷۲ گرم از نمکNa_2HPO_4 در آب مقطر حل و به حجم یک لیتر رسانده شود.

۴) محلول اسید کلریدریک ۰/۵ نرمال

۵) محلول هیدروکسید سدیم ۰/۵ نرمال

۶) سولفات آمونیوم

۷) رزین دی‌اتیل آمینو اتیل سلولز

۲-۱-۳-۴. بافرهای SDS-PAGE

محلول استوک اکریل آمید: ۳۰ گرم اکریل آمید و ۰/۸ گرم بیس اکریل آمید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و با کاغذ فیلتر واتمن شماره ۱ صاف شد.

بافر ژل پایین: ۱۸/۲ گرم تریس باز و ۰/۴ گرم SDS در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH۸/۸.

بافر ژل بالا: ۶/۱ گرم تریس باز و ۰/۴ گرم SDS در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH۶/۸.

بافر مخزن: ۳ گرم تریس باز، ۱۴/۴ گرم گلایسین و ۱ گرم SDS در یک لیتر آب مقطر. pH۸/۳.

بافر نمونه احیایی ۵X: ۱۰ میلی‌لیتر بافر ژل بالا، ۵ میلی‌لیتر گلیسرول، یک گرم SDS، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول بروموفنل و ۱ میلی‌لیتر ۲-مرکاپتواتانل. حجم نهایی به وسیله آب مقطر به ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

محلول ۱۰٪ TEMED: ۱۰۰ میکرولیتر TEMED در ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر به صورت تازه آماده شد.

محلول ۱۰٪آمونیوم پرسولفات: ۱۰۰ میلی‌گرم در ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر به صورت تازه تهیه شد.

۲-۱-۳-۵. محلول‌های رنگ‌آمیزی کوماسی بلو

محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بلو R250 : ۰/۲۵ گرم کوماسی بلو R250 در ۱۲۵ میلی‌لیتر اتانل حل شده و به آن ۲۵ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد.

محلول رنگ‌بر: ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال و ۸۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه.

۲-۱-۴. مواد مورد نیاز جهت طراحی نوار های سنجش سریع

۲-۱-۴-۱. سنتز نانوذرات طلا کنژوگه به آنتی بادی

کلرید طلا، سیترات سدیم ۱٪، کربنات پتاسیم

۲-۱-۴-۲.اجزاء نوار سنجش سریع

کاغذ نیتروسلولز، پد جاذب،پد کنژوگه،پد نمونه، کارت پشتی[1]

[1] Backing card

۲-۱-۵. وسایل

مورد رفلاکس، مگنت، فلاسک، دما سنج، دکانتور، میکروتیوب (0.5 ml ، 1.5 ml)، فالکون (15 ml، 50 ml)، پیپت مدرج (1 ml، 2 ml، 5 ml)، بشر، ارلن، استوانه مدرج،پلیت الایزا (از نوع Maxisorp محصول Nunc)، سرسمپلر (زرد، آبی، کریستالی)و ...

۲-۱-۶. دستگاه‌ها

هیتر-استیرر، روتاری خلاء، دستگاه IR، دستگاه سانتریفوژ (معمولی)،دستگاه اسپکتروفتومتر، انکوباتور، فور، یخچال، فریزر معمولی و ۷۰- درجه،دستگاه الکتروفور، دستگاه قرائت‌گر الایزا،جت پیرینتر و ...

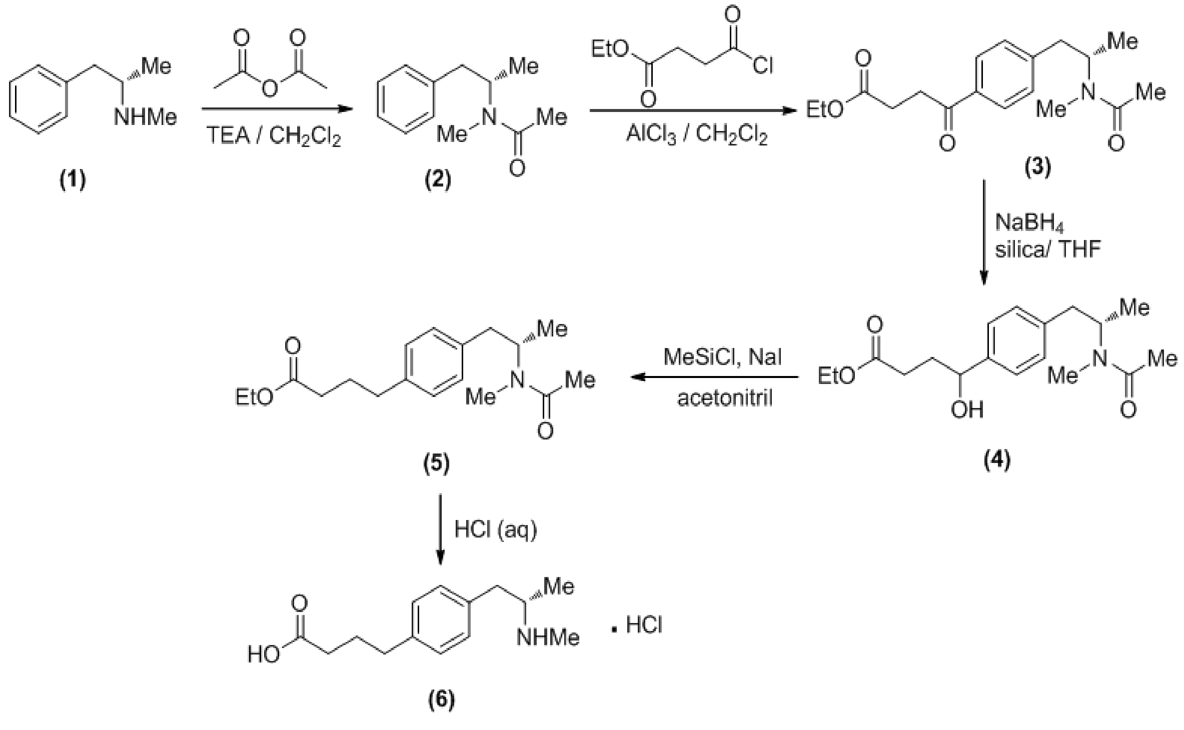
۲-۲. روش‌ها

۲-۲-۱. تهیه ایمنوژن

با توجه به وزن مولکولی پایین متامفتامین، این مولکول به عنوان هاپتن محسوب می شود. برای تهیه ایمنوژن این مولکول، باید آن را از طریق یک پل چند کربنه به مولکول پروتینی بزرگ (حامل) متصل نماییم. در جهت انجام این کار ابتدا باید متامفتامین به مشتق (S)-۴- [۲-(متیل آمینو)پروپیل] بنزنبوتانوئیک، که حاوی گروه کربوکسیل می‌باشد، تبدیل شود.

۲-۲-۱-۱.تهیه مشتق (s)-۴-[۲-(متیل آمینو) پروپیل]بنزن‌بوتانوئیک‌هیدروکلراید (METH)

مشتق متامفتامین از طریق واکنش های نشان داده شده در شکل ۲-۱ ،که بر اساس طرح بایرنس-بلانک[1] است، تهیه شد و محصول هر مرحله توسط TLC و دستگاه IR به تأیید رسید [۶۴].



شکل ۲-۱. مسیر سنتز مشتقMETH

---

[1] Byrnes-Blake

۲-۲-۱-۱-۱. تهیه (s)-N-متیل-N(۱-متیل-۲-فنیل اتیل) استامید (محصول ۲)

ابتدا متامفتامین (1) (۱ گرم،۶/۶۸ میلی مول) در ۵۰ میلی لیتر دی‌کلرومتان (CH2Cl2) حاوی پنج اکی والنت (۵/۲ میلی‌لیتر) تری اتیل آمین (TEA) حل شد. به محلول حاصل در حال هم خوردن، استیل کلراید (۰/۶۲ گرم ، ۹ میلی مول) به صورت قطره قطره و طی ۱۰ دقیقه افزوده شد. سپس محلول حاصل به مدت یک شب در دمای اتاق در حال هم خوردن توسط مگنت،باقی گذاشته شد.در مرحله بعد حلال توسط خلاء برداشته شد و مخلوط حاصل در ۳۰ میلی لیتر دی کلرومتان حل شد و سپس دو بار با HCl یک نرمال، آب نمک اشباع و آب مقطر شسته شد و توسط $MgSO_4$ خشک شد.در نهایت دی‌کلرومتان توسط خلاء برداشته شد و S-(+)-N-استیل‌متامفتامین(2) که روغنی با رنگ قهوه‌ای روشن می باشد، حاصل شد .

۲-۲-۱-۱-۲. تهیه (S)-۴-[۲-(استیل متیل آمینو)پروپیل]-γ -اکسوبنزن بوتانوئیک اسید اتیل استر(محصول ۳)

محصول به دست آمده از مرحله اول (۰/۸ گرم ، ۴/۱۸ میلی مول) در ۲۰ میلی لیتر دی کلرومتان حل شد.به محلول حاصل در دمای صفر درجه سانتی گراد،اتیل‌سوکسینل‌کلراید (۱/۶ گرم ،۹/۷۳ میلی مول) اضافه شد و به دنبال آن $AlCl_3$ (۳/۲ گرم ، ۲۴/۳۶ میلی مول) در سه بخش افزوده شد. سپس محلول حاصل به مدت یک شب در دمای اتاق در حال هم خوردن توسط مگنت، باقی گذاشته شد. سپس در دمای صفر درجه سانتی گراد HCl (۱۲ میلی لیتر) سه مولار و دی کلرومتان (۲۰ میلی لیتر) به مخلوط واکنش اضافه شد. در مرحله بعد لایه آلی جدا شد و سه بار با HCl (۲۰ میلی لیتر) سه مولار و آب مقطر (۴۰ میلی لیتر) شسته شد و در نهایت توسط $MgSO_4$خشک گردید.

۲-۲-۱-۱-۳.تهیه‌اتیل-۴-هیدروکسیل-۴-۴-(S)-۲-[-(N-متیل‌استامید)پروپیل]بوتانوات (محصول ۴)

محصول به دست آمده از مرحله قبل (۰/۶ گرم ، ۲/۸ میلی مول) در هیدروفوران (۵ میلی مول) حل شد و $NaBH_4$ (۰/۱۸۵ گرم ، ۵ میلی مول) به آن اضافه شد. سپس محلول حاصل به مدت یک شب در دمای اتاق در حال هم خوردن توسط مگنت، باقی گذاشته شد. سپس HCl (۱۲ میلی لیتر) سه مولار و دی‌کلرومتان (۲۰ میلی لیتر) به مخلوط واکنش اضافه شد. در مرحله بعد لایه آلی جدا شد

و سه بار با HCl (۲۰ میلی لیتر) سه مولار و آب مقطر (۴۰ میلی لیتر) شسته شد و در نهایت توسط $MgSO_4$خشک گردید.

۲-۲-۱-۱-۴. تهیه (S)-اتیل-۴-(۴-(۲۰(متیلاستامیدو)پروپیل)فنیل)بوتانوات (محصول ۵)

مخلوط تری‌متیل‌سیلیل‌کلراید (۱/۵۴ گرم ، ۱۲ میلی مول)، سدیم یدات(۱/۸ گرم، ۱۲ میلی مول) و استونیتریل (۰/۶، ۱۲ میلی مول) به محصول به دست آمده از مرحله قبل (۰/۶۲۴ گرم، ۲ میلی مول) حل شده در هگزان اضافه شد. سپس محلول حاصل به مدت یک شب در دمای اتاق در حال هم خوردن توسط مگنت، باقی گذاشته شد. سپس توسط آب مقطر رقیق شده و توسط اتر خالص شد و محصول (۵) حاصل گردید.

۲-۲-۱-۱-۵. تهیه (S)-۴-[۲-(متیل آمینو)پروپیل] بنزن بوتانوئیک هیدروکلراید(محصول ۶)

محصول (۵) (۰/۶۱ گرم ، ۲ میلی مول) را در ۱۲ میلی لیتر HCl۶ مولار حل شد و به مدت ۷۲ ساعت رفلاکس گردید. سپس بعد از سرد شدن در دمای اتاق، حلال توسط خلاء برداشته شد.بعد از آن توسط کریستاله شدن با اتر و در پی آن استونیتریل خالص گردید و در نهایت جامدی بی رنگ (محصول ۶) با نقطه ذوب ۱۳۰-۱۳۲ درجه سانتی گراد حاصل شد.

۲-۲-۱-۲. مزدوج‌کردن (S)-۴-[۲-(متیل آمینو)پروپیل]بنزن بوتانوئیک هیدروکلراید (METH) با BSA به روش کربو دی ایمید

۱) ابتدا(S)-۴- [۲-(متیل آمینو)پروپیل] بنزن بوتانوئیک هیدروکلراید (۰/۵ میلی گرم) و EDC (۰/۵ میلی گرم) و NHS(۰/۵ میلی گرم) در ۱ میلی لیتر آب مقطر حاوی ۰/۵ میلی لیتر DMF حل شدند و سپس pH محلول (توسط NaOHیا HCl ۰/۵ نرمال) در pH=۵ تنظیم گردید و توسط مگنت به مدت یک ساعت هم زده شد.

۲) BSA (۰/۵ میلی گرم) در ۲ میلی لیتر بافر PBS با pH=۷/۴ حل شد.

۳) محلول مرحله یک به صورت قطره قطره و طی ۳۰ دقیقه به محلول BSAکه توسط مگنت در حال مخلوط شدن می باشد ، افزوده شده وسپس محلول حاصل به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد (در یخچال) در حال مخلوط شدن توسط مگنت باقی گذاشته شد.

۴) سپس محلول مرحله قبل در کیسه دیالیز ریخته و به مدت ۴۸ ساعت مقابل بافر PBS با pH=۷/۴دیالیز شد (بافر دیالیز ۴ بار تعویض شد).

نکته: در هر مرحله بافر دیالیز توسط نوارهای سنجش سریع مت‌امفتامین تجاری ، به منظور تایید خروج مت‌امفتامین اضافه (غیر کونژوگه) از کیسه دیالیز، بررسی شد.

۲-۲-۱-۲-۱. محاسبه تعداد METH متصل به BSA

با اندازه گیری جذب نوری در ۲۷۸ نانومتر و بر طبق روش ارلنگر و همکاران تعداد METHمتصل به BSA به طریق زیر محاسبه شد.اختلاف جذب نوری ایمنوژن و BSA با غلظت مشخص و یکسان در طول موج ۲۷۸ نانومتر نشان‌گر جذب نوری METH بهBSA می باشد.
با داشتن این اختلاف جذب و نیز ضریب جذب خاموشی METH در ۲۷۸ نانومتر از معادله بیر-لامبرت برای محاسبه غلظت مولی METH در نمونه ی ایمنوژن استفاده شد .

۲- ۲- ۲. ایمن کردن خرگوش‌ها

دو عدد خرگوش از موسسه‌ی رازی تهیه‌شد و به هر یک در ۱۱ نوبت ایمنوژن سنتز شده تزریق شد. فاصله تزریق اول و دوم ۳۰ روز وبعد از آن هر ۱۵ روز یکبار تزریق صورت گرفت. مقدار آنتی ژن در تزریق اول ۵۰۰ میکروگرم و در تزریق‌های بعدی ۲۵۰ میکروگرم بود. در تزریق اول از ادجوانت کامل فروند استفاده شد، در تزریق‌های بعد از ادجوانت ناقص فروند استفاده‌شد. تزریق اول به صورت زیرپوستی و در ناحیه پشت، نزدیک گردن در چند نقطه انجام شد و تزریق‌های بعدی به صورت ماهیچه‌ای در ناحیه ران خرگوش انجام شد. خون گیری در روز قبل از تزریق و از تزریق سوم به بعد چهار روز بعد از هر تزریق انجام شد. لوله‌های حاوی خون حیوانات در دمای$37^{\circ}C$ به مدت یک ساعت نگهداری شده و سپس با سانتریفوژ دور ۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سرم جدا شد.

۲-۲-۳. تست های الایزا به منظور بررسی آنتی بادی

۲-۲-۳-۱. الایزا به منظور به دست آوردن غلظت مناسب آنتی ژن کت[1] شده در کف چاهک‌ها

۱) ابتدا پروتئین حامل و ایمنوژن هر کدام در غلظت های ۱،۲ و ۰/۱ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر بافر بی کربنات(pH 9.6) تهیه شد و به هر چاهک الایزا ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد و به مدت یک شب در دمای ۳۷°C قرار گرفت.

۲) محتویات پلیت خالی‌شده و ۱ بار شست و شو با PBS انجام شد.باقی‌مانده محلول شستشو داخل چاهک‌ها با کوباندن بر روی حوله تمیز خالی شد (Tapping).

۳) بافر بلاک کننده به چاهک‌ها اضافه شد به طوری که چاهک‌هاکاملاً پر شدند.

۴) مرحله ۲ تکرار شد.

۵) از سرم حیوان پس از تزریق ایمنوژن و همچنین سرم نرمال با غلظت‌های ۱/۱،۱۰۰۰/۵۰۰، ۱/۲۰۰۰، ۱/۴۰۰۰ و ۱/۸۰۰۰ به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به صورت دوتایی (Duplicate) اضافه شد.

۶) پلیت به مدت ۱/۵ ساعت در ۳۷°C به آرامی شیک شد.

۷) محتویات پلیت خالی شده و ۳ تا ۵ بار شست و شو با PBS یا PBST انجام شد.باقی مانده محتویات چاهک ها با کوباندن روی حوله تمیز خالی شد.

۸) آنتی بادی ثانویه بارقت مورد نظر به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد.

۹) پلیت به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷°C به آرامی شیک شد.

۱۰)مراحل ۷ تکرار شد.

۱۱)سوبسترای TMBبه مقدار ۵۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و پلیت در ۳۷°C نگهداری شد تا واکنش رنگی به میزان مناسب پیش رود.

۱۲)واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از HCl ۲ نرمال به هر چاهک متوقف شد.جذب نوری در ۴۵۰nm-۶۳۰ قرائت شد.

[1] coat

۲-۲-۳-۲. تعیین تیتر آنتی‌بادی پلی‌کلونال موجود در سرم از تزریق سوم به بعد به روش الایزا

۱) از آنجا که در مرحله قبل مناسبترین غلظت آنتی ژن غلظت ۰/۱ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر تعیین شد، پروتئین حامل و ایمنوژن هر کدام در غلظت ۰/۱ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر بافر بی کربنات (pH 9.6) تهیه شد و به هر چاهک الایزا ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد و به مدت یک شب در دمای ۳۷ °C قرار گرفت.

۲) مراحل ۲ تا ۱۲ مشابه پروتکل ۲-۲-۳-۱ تکرار گردید.

۲-۲-۳-۳. تعیین درصد مهار رقابتی آنتی‌بادی توسط مت امفتامین حل شده دربزاق(تهیه منحنی استاندارد مت‌امفتامین)

۱) در هر چاهک ۰/۱ میکروگرم از ایمنوژن کت گردید ودر دو چاهک ۰/۱ میکروگرم BSA به عنوان کنترل کت شد.

۲) مراحل ۲، ۳ و ۴ از پروتکل قبل تکرار شد.

۳) در هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی با غلظت ۱/۱۰۰۰ و ۵۰ میکرولیتر از بزاق حاوی مت‌امفتامین با غلظت‌های صفر،۱۰۰pg،۲۵۰pg،۵۰۰pg، ۱ ng، ۲ ng، ۱۰ngدر ۵۰ میکرولیتر اضافه شد (به چاهک‌های حاوی BSA مقدار ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی با غلظت ۱/۱۰۰۰ و ۵۰ میکرولیتر بزاق فاقد مت‌امفتامین اضافه شد) .

۴) سایر مراحل مشابه پروتکل ۲-۲-۳-۱ صورت گرفت.

۲-۲-۳-۴. تعیین تغییرات درون و بین سنجش[1]، برای تست الایزای تشخیص مت‌امفتامین در بزاق

برای تعیین تغییرات درون و بین سنجش برای سنجش الایزای تشخیص مت‌امفتامین در بزاق، پروتکل مرحله قبل در دو روز متوالی و در هر روز سه بار هم زمان انجام شد و سپس با استفاده از نتایج حاصل ضریب تغییرات درون و بین سنجش محاسبه شد.

---
[1] Inter and intra assay variations

۲-۲-۴. تخلیص آنتی‌بادی

۲-۲-۴-۱. آماده‌سازی رزین مبادله‌کننده آنیون دی‌اتیل‌آمینواتیل سلولز

۱ گرم از DEAE سلولز را در یک بشر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزودیم. آن را به آرامی هم زده و سپس مدتی بی‌حرکت قراردادیم، تا اینکه ذرات درشت‌تر ته‌نشین شده، ولی ذرات ریز به صورت معلق باقی ماندند.این ذرات را با دکانته کردن همراه با آب مقطر خارج نمودیم.این کار آن قدر تکرار شد تا اینکه محلول رویی صاف و شفاف ماند و سپس حدود سه برابر حجم ژل به آن HCl ۰/۵ نرمال افزوده و برای نیم ساعت آن را به آرامی به هم زدیم و به دنبال آن، آن را بر روی کاغذ صافی معمولی ریخته و آن قدر با آب مقطر شستشو دادیم تا pH محلول زیر صافی کاملاً خنثی شد.

در مرحله‌ی بعد، ژل را از روی کاغذ صافی به بشر انتقال داده و حدود سه برابر حجم ژل به آن محلول NaOH ۰/۵ نرمال افزوده و مثل مراحل HCl عمل شد.ژل روی صافی را در بافر فسفات ۱۷/۵ میلی‌مولار و pH = ۶/۳غوطه‌ور نموده و پس از هم زدن ملایم به مدت نیم ساعت، آن را بی‌حرکت قراردادیم تا ژل ته‌نشین شود.سپس بافر رویی را تعویض کرده و این عمل را تکرار کردیم تا جایی که pH محلول رویی برابر ۶/۳ شود.در این حالت ژل آماده استفاده است.

۲-۲-۴-۲. مراحل تخلیص

۱) جداسازی پروتئین‌ها از سرم:

برای این منظور از نمک سولفات آمونیوم ۳۳٪ استفاده شد.به ازای هر میلی‌لیتر سرم ۳۳٪ گرم سولفات آمونیوم وزن کرده و به صورت پودر بسیار نرم در آوردیم.سپس آن را آرام‌آرام به سرم مورد نظر که بر روی همزن مغناطیسی در حال به هم خوردن بود، افزودیم.بعد از آن، به منظور کامل شدن عمل رسوب‌گذاریپروتئین‌ها، هم زدن ملایم نمونه را به مدت نیم ساعت ادامه یافت.

برای جدا کردن رسوب از محلول رویی آن را در دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد و سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ کردیم؛ محلول رویی را بیرون ریخته و رسوب را در حداقل مقدار بافر فسفات مذکور حل نمودیم؛ سپس این محلول را به کیسه‌ی دیالیز با اندازه‌ی منافذ ۱۲ کیلودالتون انتقال داده و در برابر همین بافر فسفات به مدت ۲۴ ساعت با سه بار تعویض دیالیز کردیم.

۲) جداسازی گاماگلوبولین‌ها از سایر پروتئین‌ها با استفاده از رزین مبادله‌کننده‌ی یونی:

ابتدا میزان پروتئین محلول دیالیز شده به روش براد فورد اندازه‌گیری شد.و با توجه به اینکه به ازای هر ۷۵ میلی‌گرم پروتئین ۲ میلی‌لیتر ژل لازم بود، میزان مورد نیاز ژل را در یک فالکون ۱۵ میلی‌لیتری قرار داده و کروماتوگرافی به صورت Batch در آن انجام شد. بدین ترتیب که پروتئین دیالیز شده را بر روی ژل قرار داده و چندین مرتبه فالکون را تکان داده و نیم ساعت آن رابی‌حرکت گذاشتیم. پس از ته‌نشین شدن ژل فاز بالایی را که حاوی گاماگلوبولین ها بود را جدا کردیم.

پس از تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد، نمونه‌ی تخلیص شده بر روی ژل SDS-PAGE آنالیز شد.

۲-۲-۴-۳. تهیه ژل‌های SDS-PAGE

برای تهیه ژل تفکیک‌کننده ۱۲/۵٪ مطابق جدول ۲-۱ عمل شد.

جدول ۲-۱. مواد لازم جهت تهیه ژل تفکیک‌کننده برای SDS-PAGE

	بافر ژل پایین	محلول اکریل آمید	آب مقطر	محلول TEMED ۱۰٪	محلول آمونیوم پرسولفات ۱۰٪
ژل۱۲/۵٪	۳	۴/۹	۴/۱	۰/۰۵	۰/۰۵

جدول ۲-۲. مواد لازم جهت تهیه ژل متراکم‌کننده برای SDS-PAGE

	بافر ژل بالا	محلول اکریل آمید	آب مقطر	محلول TEMED ۱۰٪	محلول آمونیوم پر سولفات ۱۰٪
ژل ۴٪	۱/۲۵	۰/۶۵	۳/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۱

۲-۲-۴-۴.رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو

ژل پس از شست و شو با آب مقطر به مدت ۰/۵ ساعت در محلول رنگ‌آمیزی قرار داده شد.

محلول رنگ‌آمیزی تخلیه‌شده و پس از شست و شو با آب مقطر محلول رنگ بر اضافه شد. محلول رنگ بر چند بار تعویض شد تا زمانی که زمینه ژل کاملاً شفاف شد.

۲-۲-۵. آماده کردن نوار[1] سنجش سریع

۲-۲-۵-۱.تهیه نانوذرات طلا

۱) ابتدا ۰/۰۱ گرم از نمک طلا وزن شده و در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه حل گردید.
۲) ۹۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه به محلول فوق افزوده گردید.
۳) به مدت ۵ دقیقه محلول 1X همراه با استیر شدن حرارت داده شد.
۴) حدود ۲ میلی لیتر محلول سیترات سدیم ۱٪ به محلول فوق افزوده شد.
۵) محلول فوق به مدت ۱۰ دقیقه مجدداً همراه با حرارت دادن استیر گردید.
۶) زمانی که رنگ محلول به قرمز تیره درآمد نانوذرات طلا تشکیل شده است.

۲-۲-۵-۲. تعیین pH و غلظت مناسب برای مزدوج ساختن آنتی‌بادی با نانوذرات طلا

۱) برای تعیین pH و غلظت آنتی بادی مناسب برای کونژوگاسیون ابتدا در یک پلیت ۹۶ خانه الایزا شیب غلظت آنتی‌بادی خالص از ۲۰۰ میکروگرم تا ۱۲/۵ میکروگرم ایجاد شد.
۲) سپس در روی همین غلظت‌ها شیب pH با استفاده از محلول کربنات پتاسیم ۱٪ ایجاد گردید. به هر چاهک حدود ۱۰۰ میکرولیتر از نانورات طلا تشکیل شده افزوده گردید.
۳) بعد از ۱۰ دقیقه به هر چاهک ۱۰۰میکرولیتر از محلول سدیم کلراید 1M افزوده گردید.

۲- ۲- ۵- ۳. اتصال آنتی‌بادی به نانوذرات طلا

۱) محلول از آنتی بادی با نانوذرات طلا روی یک استیرر به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق هم زده شد.
۲) سپس محلول فوق به فالکون‌های ۱۵ منتقل شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه در دوره ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید.
۳) محلول رویی دور ریخته شد و هم حجم با محلول قبل محلول PBS افزوده کردید.
۴) مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه در دوره ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید.

---
[1] strip

۵) سپس محلول قبل همانند مرحله قبل خالی شده و به جای آن در ۲ میلی لیتر از PBS حل گردید. از این محلول برای تهیه نوارها استفاده گردید.

۲- ۲- ۵- ۴. تهیه نوارهای سنجش سریع

ایمنوژن مورد نظر با دستگاه جت پرینتر روی کاغذ نیتروسلولز در جایگاه خط تست و پروتئین A در جایگاه خط کنترل کت گردید و سپس به مدت یک ساعت در دمای $۶۰^{\circ}C$ قرار گرفت. آنتی بادی تخلیص شده نشان‌دار شده با طلا در حجم ۱۰ میکرولیتر به ازای هر نوار روی قسمت پد نمونه روی نوار قرار گرفت.

۲-۲-۵- ۵. طراحی نوار ادراری با استفاده از آنتی ژن تولیدی و آنتی بادی تجاری نشان دار با نانوذرات طلا

در این مرحله با استفاده از کاغذ نیتروسلولز کت شده با آنتی ژن سنتز شده و آنتی بادی تجاری نشان دار شده با طلا، نوار تست تهیه شد. سپس نمونه ادرار با غلظت های مختلف مت‌امفتامین (۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۰ و صفر نانوگرم بر میلی لیتر) تهیه شد و به مقدار ۲۰میکرولیتر از هر غلظت روی نوار ریخته شد و با این روش نقطه cut off تست تعیین گردید.

۲-۲-۵- ۶. طراحی نوار ادراری آنتی بادی پلی کلونال تولیدی نشان دار شده با طلا، برای تشخیص مت‌امفتامین در ادرار و مقایسه آن با تست تجاری مشابه

در این مرحله تست توسط آنتی بادی پلی کلونال تخلیص شده از سرم خرگوش و نشان دار شده با نانوذرات طلا تهیه شد . سپس نمونه ادرار با غلظت های مختلف مت امفتامین(۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۰، ۳۰و صفر نانوگرم بر میلی لیتر) تهیه شد و به مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت روی نوار تهیه شده و نوار تجاری ریخته شد.

۲-۲-۵- ۷. طراحی نوار بزاقی با استفاده از آنتی ژن سنتز شده و آنتی بادی پلی کلونال تولیدی نشان دار شده با طلا، برای تشخیص مت‌امفتامین در نمونه بزاق و مقایسه آن با تست تجاری مشابه

در این مرحله نوار تست با استفاده از کاغذ نیتروسلولز کت شده با آنتی ژن سنتز شده و آنتی بادی پلی کلونال تخلیص شده از سرم خرگوش و نشان دار شده با نانوذرات طلا تهیه شد. سپس نمونه بزاق با غلظت های مختلف مت‌امفتامین (۵۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۵ و صفر نانو گرم بر میلی لیتر) و همچنین نمونه بزاق حاوی محلول BSA (۱ mg/ml) تهیه شد و به مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت رو نوار تهیه شده و نوار تجاری ریخته شد و با این روش نقطه cut off سنجش تعیین گردید.

۲-۲-۵- ۸. تعیین اختصاصیت و حساسیت

برای تعیین اختصاصیت و حساسیت تست طراحی شده، ۲۵ نمونه بزاق منفی (فاقد مت‌امفتامین) و ۲۵ نمونه مثبت (که میزان ۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر مت امفتامین در آن حل شد) استفاده گردید. در مرحله بعدی با استفاده از فرمول‌های ارائه شده در قسمت زیرین حساسیت و اختصاصیت تست مورد نظر مورد ارزیابی قرار گرفت.

$$\text{sensitivity} = \frac{\text{number of true positives}}{\text{number of true positives} + \text{number of false negatives}}$$

$$\text{specificity} = \frac{\text{number of true negatives}}{\text{number of true negatives} + \text{number of false positives}}$$

$$\text{accuracy} = \frac{\text{number of true positives} + \text{number of true negatives}}{\text{number of true positives} + \text{false positives} + \text{false negatives} + \text{true negatives}}$$

۲-۲-۵-۹.بررسی واکنش متقاطع آنتی‌بادی

در این مرحله واکنش آنتی‌بادی با مولکول‌های دارویی و برخی استرویدها نظیر کورتیزول، تستسترون و پروژسترون، با استفاده از نوارهای سنجش سریع بررسی شد.

فصل سوم

نتایج و یافته‌ها

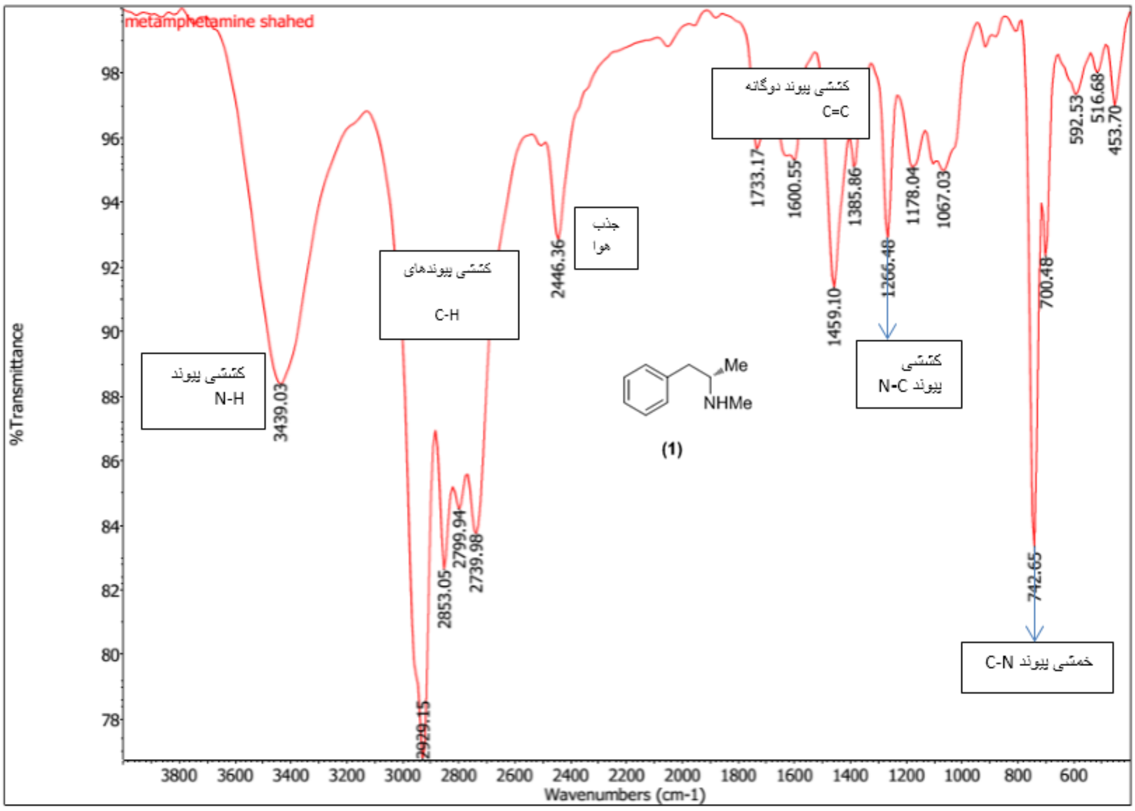
۳-۱. تهیه ایمنوژن

۳-۱-۱. سنتز مشتق METH

همان طور که در بخش ۲-۲-۱-۱ ذکر شد، سنتز مشتق METH شامل پنج مرحله می باشد. محصول هر مرحله توسط IR به تایید رسید.

(۱). متامفتامین

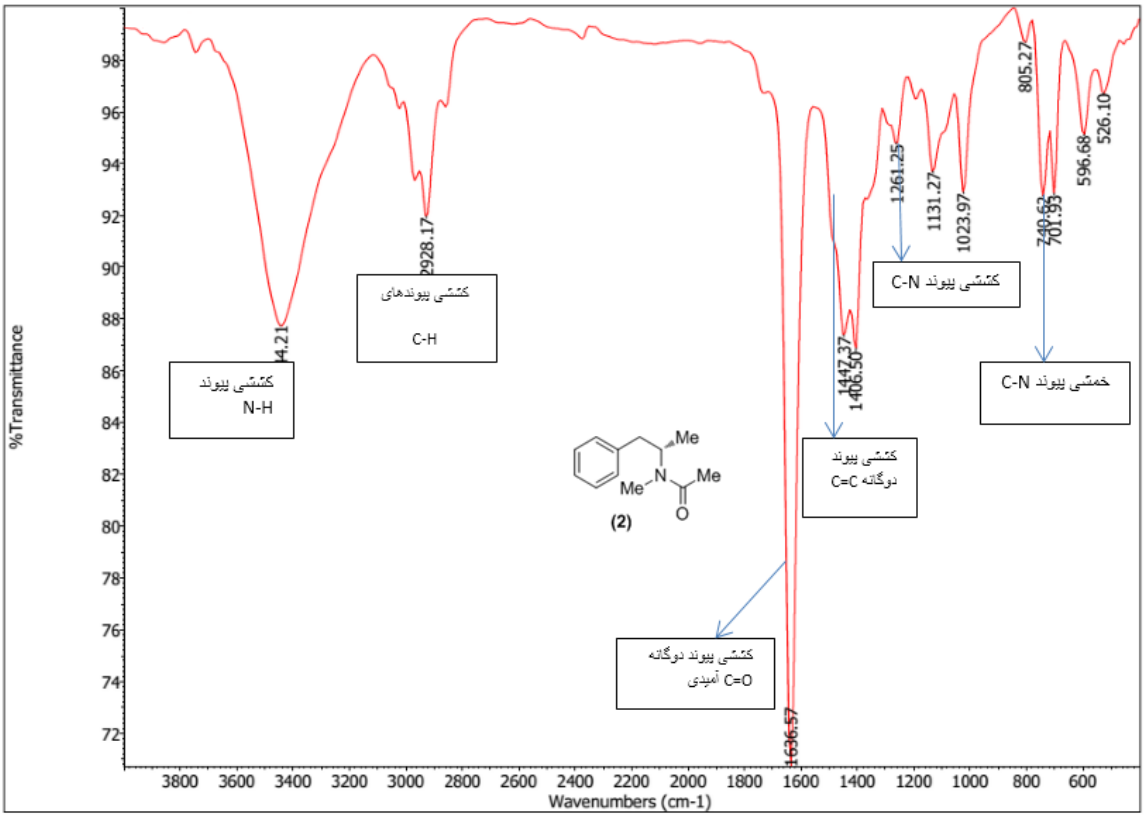
در ابتدا ماده اولیه مورد استفاده، توسط IR بررسی شد.



شکل ۳-۱. طیف IR مربوط به متامفتامین اولیه

(۲). (s)-N-متیل-N(۱-متیل-۲-فنیل اتیل) استامید

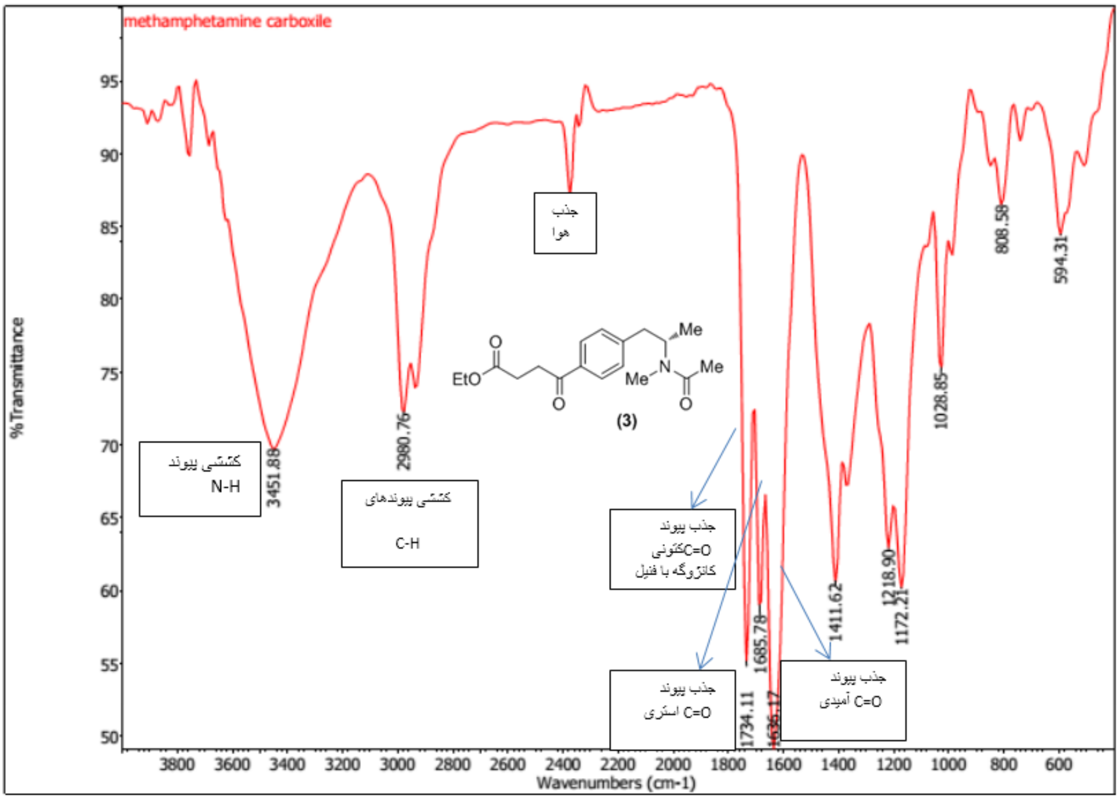
برای جلوگیری از شرکت کردن گروه (NH-) موجود در متامفتامین، در مراحل بعدی مسیر، در اولین واکنش هدف پوشاندن گروه (NH-) بوده است. همان طور که در بخش ۲-۲-۱-۱-۱ ذکر شد، برای این منظور از استیل‌کلراید به عنوان عامل پوشاننده استفاده شد. همان طور که در شکل مشخص است، پیک در ناحیه۱۶۳۶/۵۷ (کششی پیوند دوگانه C=O آمیدی) موید اتصال گروه استیل به گروه (NH-) موجود در متامفتامین می باشد.



شکل ۳-۲. طیف IR مربوط به (s)-N-متیل-N(۱-متیل-۲-فنیل اتیل) استامید. پیک در ناحیه۱۶۳۶/۵۷ (کششی پیوند دوگانه C=O آمیدی) موید اتصال گروه استیل به گروه (NH-) موجود در متامفتامین می باشد.

(۳). (S)-۴-[۲-(استیل متیل آمینو)پروپیل]-γ-اکسوبنزن بوتانوئیک اسید اتیل استر

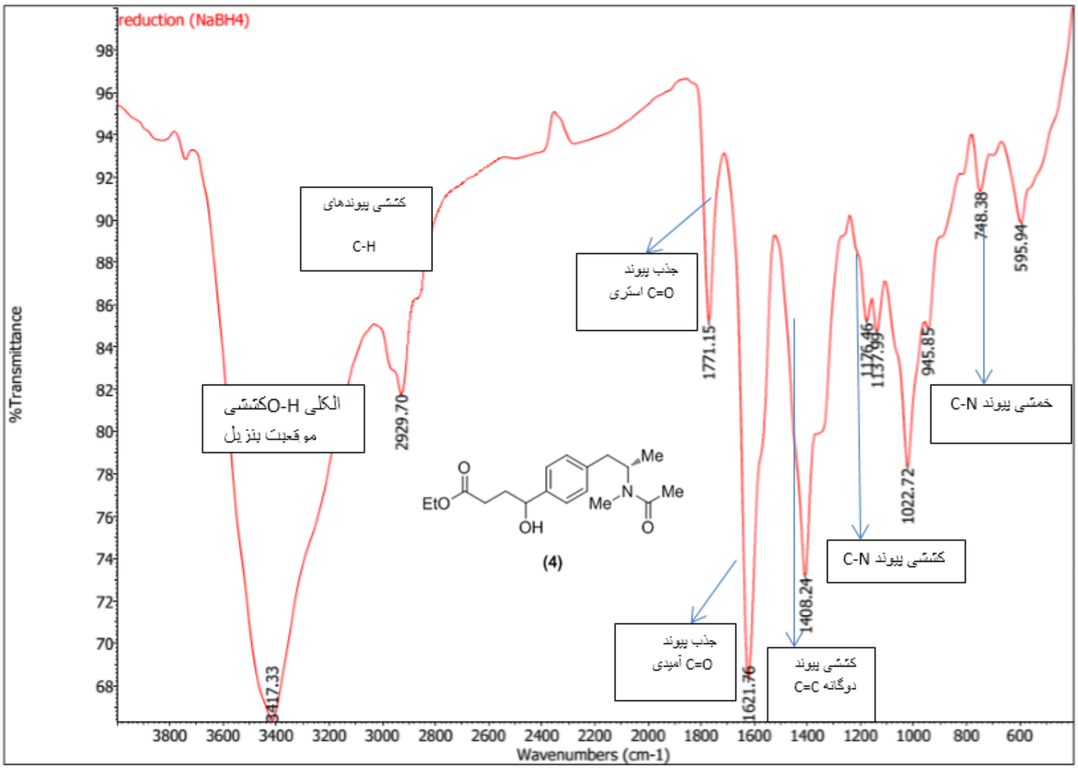
در این مرحله هدف اتصال گروه اتیل سوکسینات به حلقه بنزن موجود در مولکول مورد نظر بوده است. وجود پیک در نواحی ۱۷۳۴/۱۱ (جذب پیوند C=O کتونی کانژوگه با فنیل) و ۱۶۸۵/۷۸ (جذب پیوند C=O استری) موید اتصال گروه اتیل سوکسینات به گروه فنیل مولکول مورد نظر می باشد.



شکل ۳-۳. طیف IR مربوط به (S)-۴- [۲-(استیل متیل آمینو)پروپیل]-γ -اکسوبنزن بوتانوئیک اسید اتیل استر. وجود پیک در نواحی ۱۷۳۴/۱۱ (جذب پیوند C=O کتونی کانژوگه با فنیل) و ۱۶۸۵/۷۸ (جذب پیوند C=O استری) موید اتصال گروه اتیل سوکسینات به گروه فنیل مولکول مورد نظر می باشد.

(۴). اتیل -۴- هیدروکسل-۴-۴-(S)-۲-]-(N-متیل استامید) پروپیل] بوتانوات

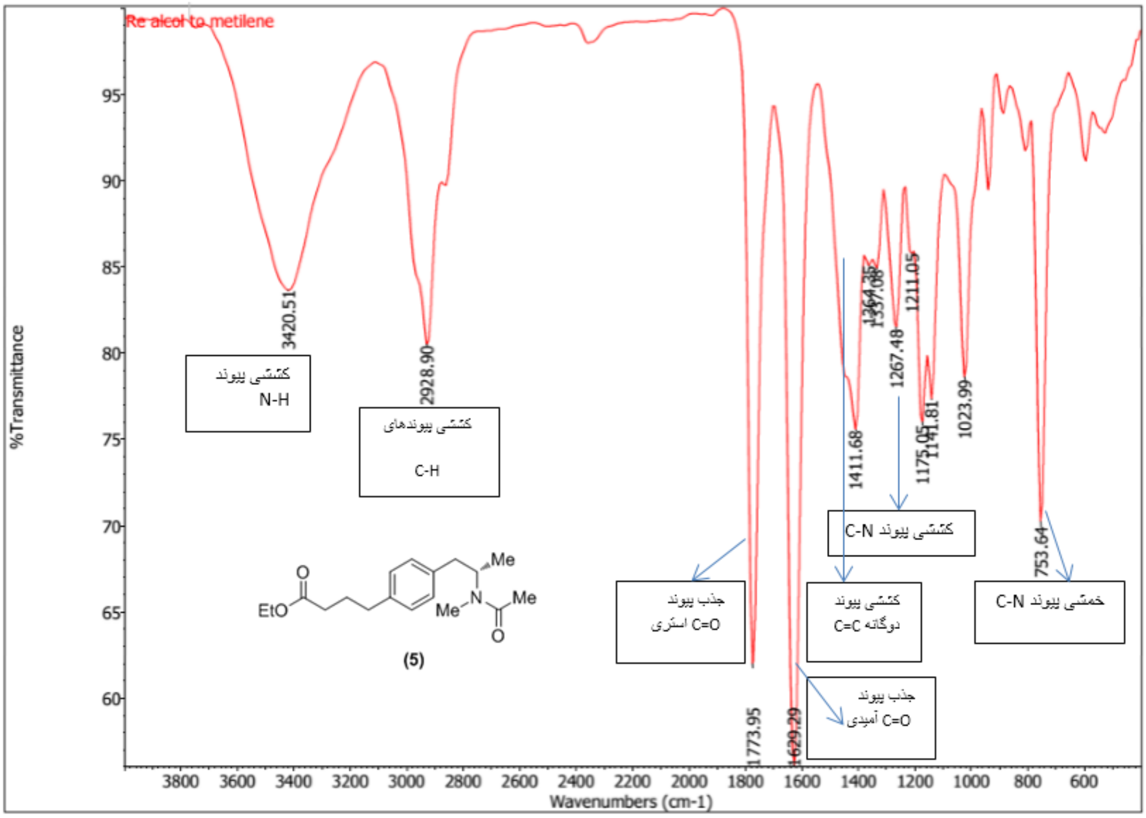
در این مرحله هدف احیای گروه کتون متصل به فنیل به گروه هیدروکسیل بوده است . برای این منظور از عامل احیا کننده NaBH4 استفاده شد. وجود پیک در ناحیه ۳۴۱۷/۳۳ (کششی O-H در موقعیت بنزیل) موید احیای گروه کتونی به گروه هیدروکسیل می باشد.



شکل ۳-۴. طیف IR مربوط به اتیل -۴- هیدروکسل-۴-۴-(S)-۲-]-(N-متیل استامید) پروپیل] بوتانوات. وجود پیک در ناحیه ۳۴۱۷/۳۳ (کششی O-H در موقعیت بنزیل) موید احیای گروه کتونی به گروه هیدروکسیل می باشد.

(۵). (S)-اتیل-۴-(۴-(۲۰(متیل استامیدو)پروپیل)فنیل) بوتانوات

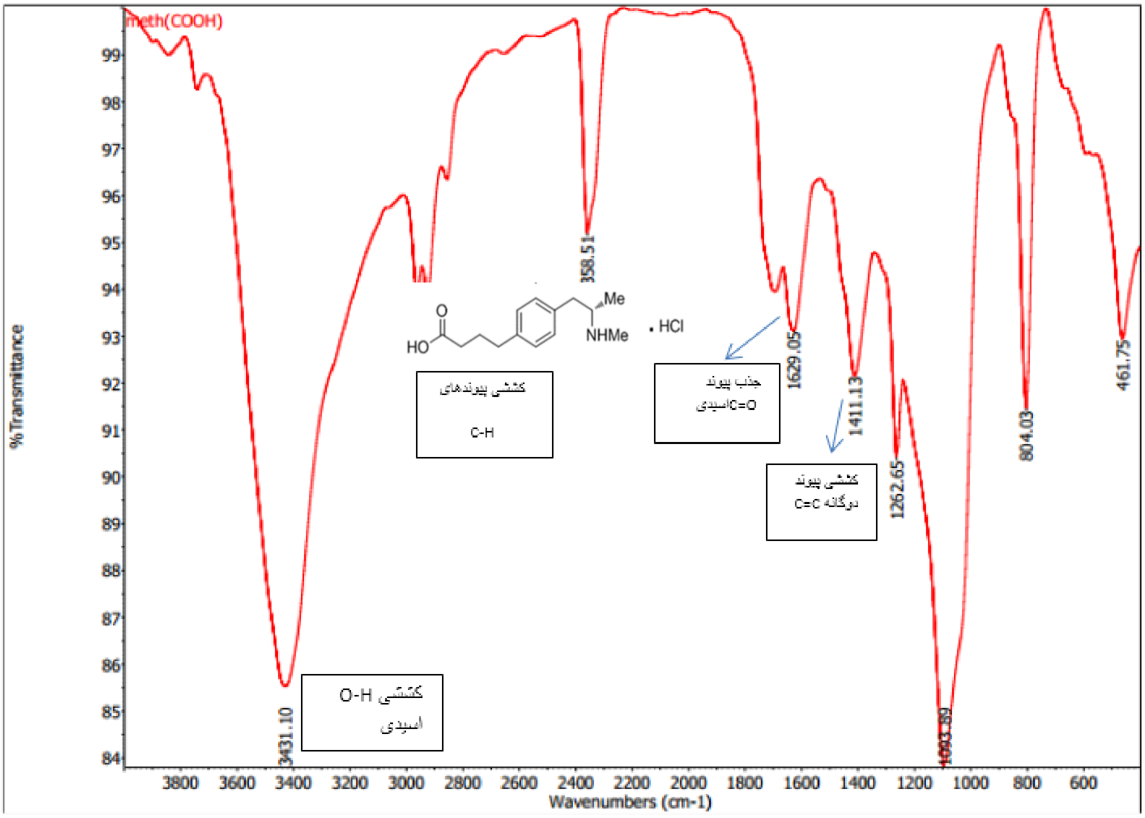
در این مرحل هدف احیای گروه هیدروکسل بوده است. حذف پیک مربوط به گروه هیدروکسیل در ناحیه ۳۴۱۷/۳۳ موید انجام واکنش احیا می‌باشد.



شکل ۳-۵. طیف IR مربوط به (S)-اتیل-۴-(۴-(۲۰(متیل استامیدو)پروپیل)فنیل) بوتانوات. حذف پیک مربوط به گروه هیدروکسیل در ناحیه ۳۴۱۷/۳۳ موید انجام واکنش احیا می باشد.

(۶). (S)-۴- [۲-(متیل آمینو)پروپیل] بنزن بوتانوئیک هیدروکلراید (METH)

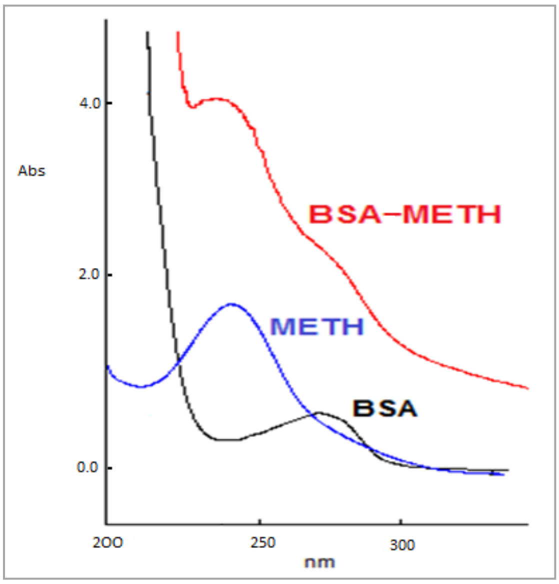
در مرحله آخر هدف حذف استیل پوشاننده گروه (**NH**-) و تشکیل گروه کربوکسیل در انتهای زنجیره کربنی اضافه شده، بوده است. حذف پیک در ناحیه ۱۶۳۶/۵۷ موید برداشته شدن عامل استیل از روی گروه(NH-) می باشد. همچنین وجود پیک در نواحی ۱۶۲۹/۰۵ (جذب پیوند C=O اسیدی و ۳۴۳۱/۱۰ (کششی O-H اسیدی) موید تشکیل گروه کربوکسیل می باشند



شکل ۳-۶. طیف IR مربوط به مشتق METH. حذف پیک در ناحیه ۱۶۳۶/۵۷ موید برداشته شدن عامل استیل از روی گروه(NH-) می باشد. همچنین وجود پیک در نواحی ۱۶۲۹/۰۵ (جذب پیوند C=O اسیدی) و ۳۴۳۱/۱۰ (کششی O-H اسیدی) موید تشکیل گروه کربوکسیل می باشند.

۳-۱-۲. مزدوج کردن مشتق METH با BSA و محاسبه تعداد METH متصل شده به BSA

جذب نوری مزدوج METH-BSA، BSA و METH در گستره طول موج ۲۰۰-۳۵۰ نانومتر با غلظت ۱ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد (شکل ۳-۷). سپس با استفاده از جذب نوری BSA (۰/۸۷)و METH-BSA(۱/۹۰) در طول موج ۲۷۸ نانومتر و همچنین ضریب خاموشی METH (۳۹۵۲) در ۲۷۸ نانومتر با استفاده از قانون بیر-لامبرت ، تعداد METH متصل شده به BSA محاسبه شد.



شکل ۳-۷. طیف جذب نوری مزدوج METH-BSA

$A=\varepsilon Cl$

A= جذب نوری

ε = ضریب خاموشی مولی

C = غلظت مولار نمونه

l= طول مسیر عبور نور از نمونه (1 cm)

$A = 1.9 - 0.87 = 1.02$

$C = \frac{A}{\varepsilon l} = \frac{1.02}{3952} = 2.58 \times 10^{-4}$ مولار

وزن مولکولی BSA ۶۶۵۰۰ دالتون فرض شده در نتیجه غلظت مولار BSA برابر:

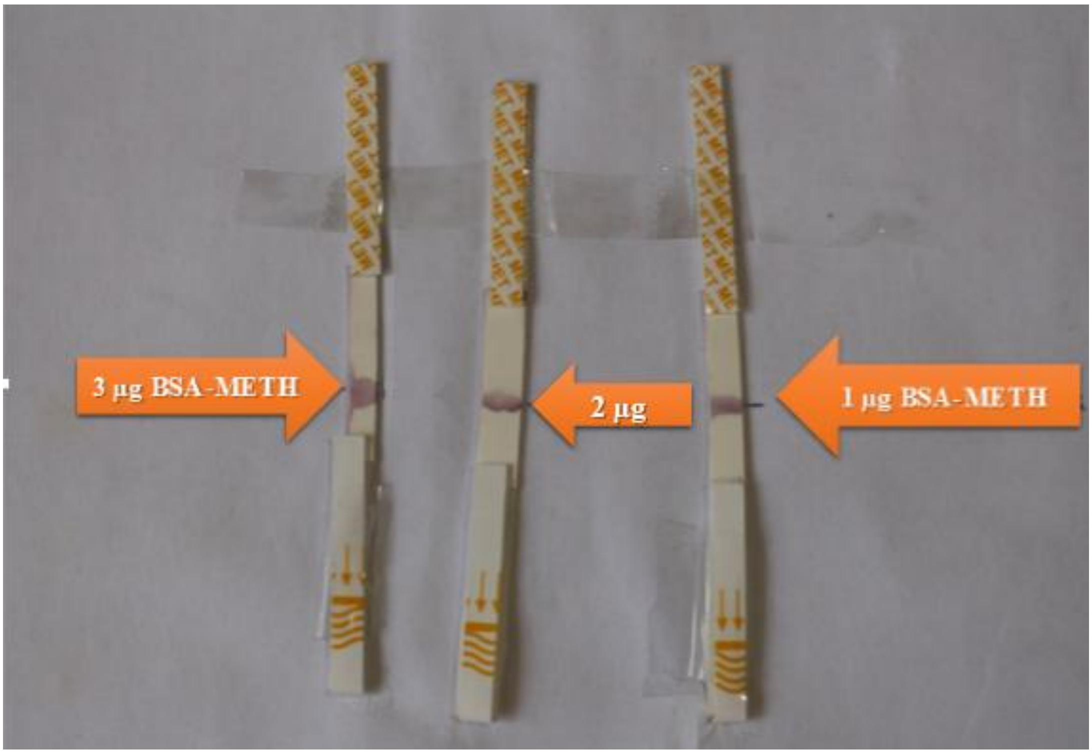
غلظت مولار BSA $= \frac{1}{66500} = 1.50 \times 10^{-5}$ مولار

تعداد METH متصل شده به BSA= $\frac{2.58\times10^{-4}}{1.50\times10^{-5}} \sim 17.2$

به هر مولکول BSA، ۱۸-۱۷ مولکول METH متصل شده است

۳- ۱- ۳. تایید تشکیل مزدوج METH-BSA با استفاده از آنتی بادی تجاری نشان‌دار با نانوذرات طلا بر روی نوار سنجش سریع

در این مرحله ایمنوژن سنتز شده (مزدوج METH-BSA) روی کاغذ نیتروسلولز کت شد و واکنش آن با آنتی بادی تجاری نشان دار با نانوذرات طلا مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳-۸).



شکل ۳-۸. واکنش مزدوج METH-BSA با آنتی بادی تجاری نشان دار با نانوذرات طلا بر روی نوار سنجش سریع. تشکیل خط موید تشکیل مزدوج METH-BSA می باشد.

۳-۲. نتایج ایمن سازی خرگوش ها

۳-۲-۱. جدول زمان بندی تزریق و خون گیری

همان طور که در بخش ۲-۲-۲ ذکر شد، به دو خرگوش تهیه شده از موسسه رازی در ۱۱ نوبت ایمنوژن سنتز شده تزریق شد و پس از تزریق سوم از هر دو خرگوش، در ۹ نوبت خون‌گیری صورت گرفت. زمان‌بندی تزریق‌ها و خون‌گیری های انجام شده در جدول ۳-۱ گرد آوری شده است.

۳-۲-۳.تعیین تیتر آنتی‌بادی پلی‌کلونال بعد از سومین تزریق ایمنوژن به خرگوش‌ها

پس از تزریق سوم به خرگوش‌ها، خون‌گیری انجام شد. در هر نوبت خون‌گیری، رقت‌های ۱/۵۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۲۰۰۰، ۱/٤۰۰۰ و ۱/۸۰۰۰ از سرم حیوان ایمن شده در مقابل سرم حیوان ایمن نشده، تعیین تیتر انجام شد.نمودارهای ۳-۱ تا ۳-۹ نتایج تعیین تیتر را نشان می دهند.

با توجه به نمودارها تیتر آنتی‌بادی در نقطه ی ۵۰٪ اتصال آنتی‌ژن به آنتی‌بادی تعیین شد. نتایج آن در جدول ۳-۲ و نمودار ۳-۱۰ نشان داده شده است.

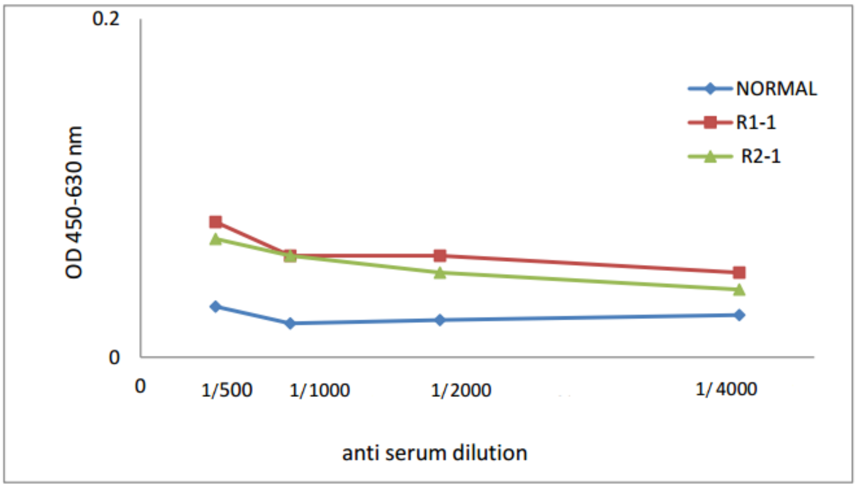
جدول ۳-۲. ۵۰٪ اتصال آنتی‌ژن به آنتی‌بادی

تیتر ۵۰٪ اتصال (R2)	تیتر ۵۰٪ اتصال(R1)	خون گیری	زمان (روز)
۰	۰	اول	۵۰
		–	۶۰
۰	۰	دوم	۶۵
		–	۷۵
۱/۲۰۰۰	۱/۲۰۰۰	سوم	۸۰
		–	۹۰
۱/۳۵۰۰	۱/۳۵۰۰	چهارم	۹۵
		–	۱۰۵
۱/۶۰۰۰	۱/۶۰۰۰	پنجم	۱۱۰
		–	۱۲۰
۱/۸۰۰۰	۱/۸۰۰۰	ششم	۱۲۵
		–	۱۳۵
۱/۸۰۰۰	۱/۸۰۰۰	هفتم	۱۴۰
		–	۱۵۰
۱/۸۰۰۰	۱/۸۰۰۰	هشتم	۱۵۵
		–	۱۶۰
۱/۸۰۰۰	۱/۸۰۰۰	نهم	۱۷۰

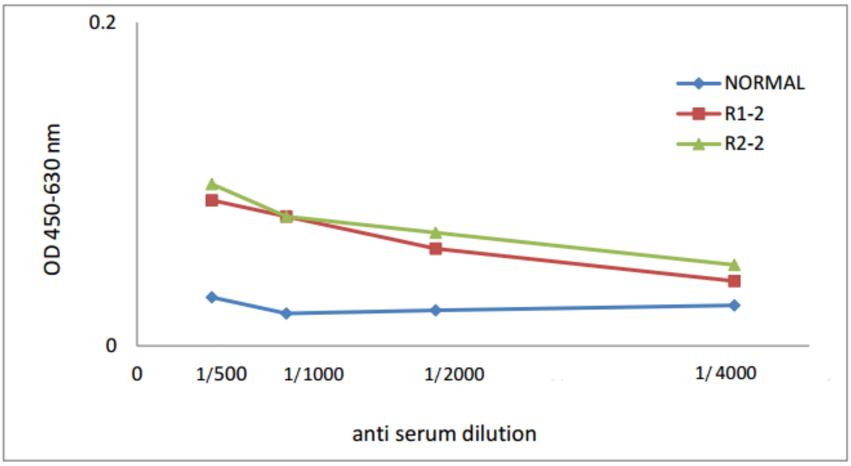
R1: خرگوش شماره ۱ و R2 : خرگوش شماره

جدول ۳-۱. زمان بندی تزریق و خون گیری

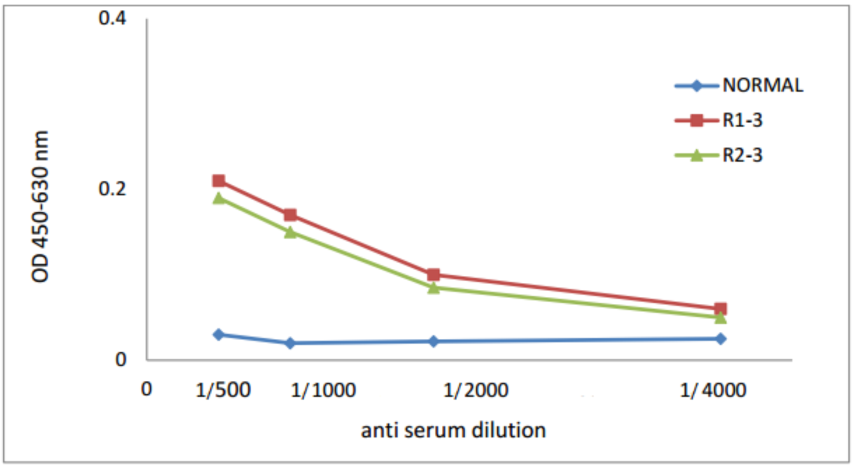
خون گیری	تزریق	زمان (روز)
–	اول	صفر
–	دوم	۳۰
–	سوم	۴۵
اول	–	۵۰
–	چهارم	۶۰
دوم	–	۶۵
–	پنجم	۷۵
سوم	–	۸۰
–	ششم	۹۰
چهارم	–	۹۵
–	هفتم	۱۰۵
پنجم	–	۱۱۰
–	هشتم	۱۲۰
ششم	–	۱۲۵
–	نهم	۱۳۵
هفتم	–	۱۴۰
–	دهم	۱۵۰
هشتم	–	۱۵۵
–	یازدهم	۱۶۰
نهم	–	۱۷۰



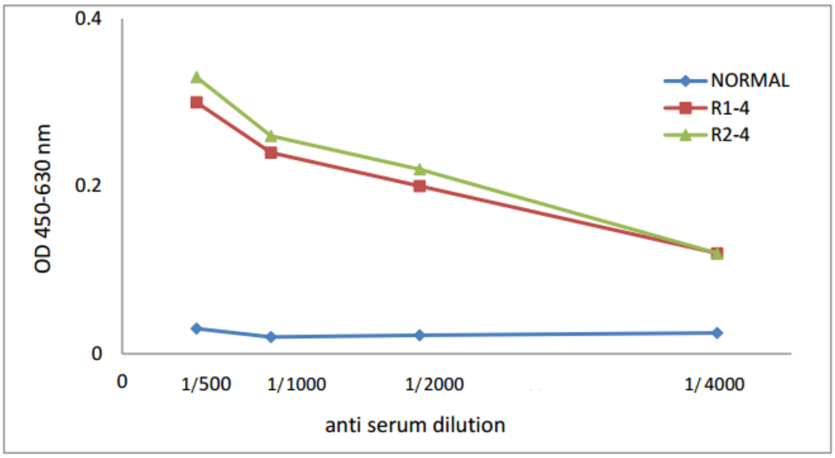
نمودار ۳-۱. تیتر آنتی‌بادی در خون‌گیری اول (روز ۵۰). R1: خرگوش شماره ۱ و R2 : خرگوش شماره ۲ .



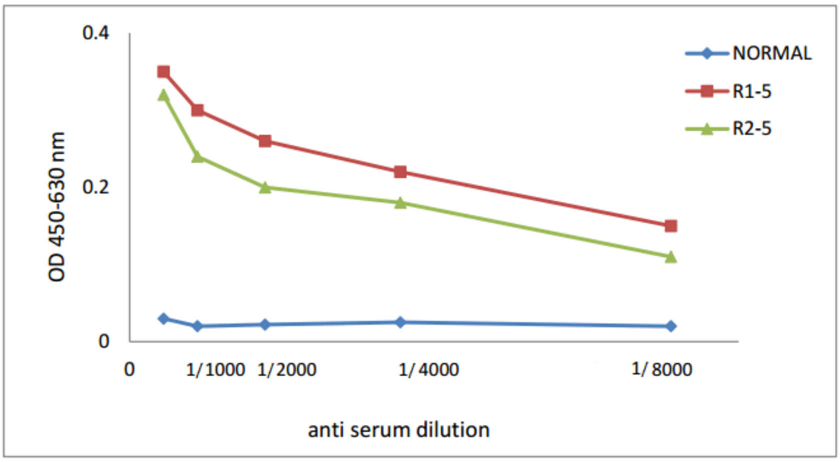
نمودار ۳-۲. تیتر آنتی‌بادی در خون‌گیری دوم (روز ۶۵). R1: خرگوش شماره ۱ و R2 : خرگوش شماره ۲.



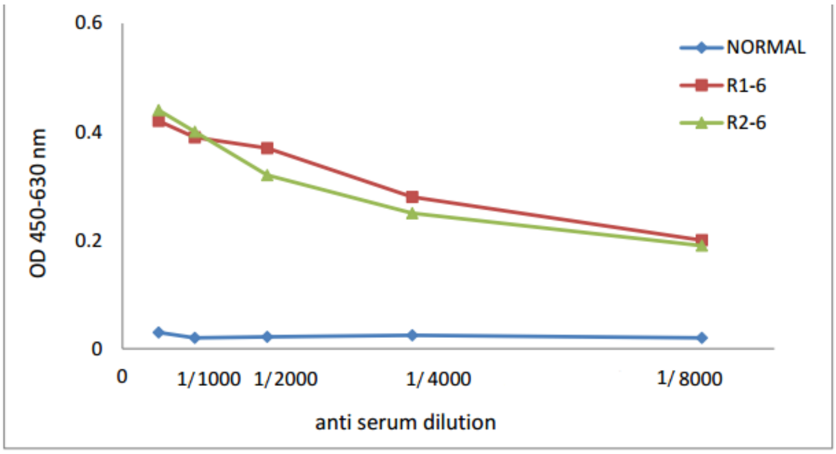
نمودار ۳-۳. تیتر آنتی‌بادی در خون‌گیری سوم (روز ۸۰). R1: خرگوش شماره ۱ و R2 : خرگوش شماره ۲ .



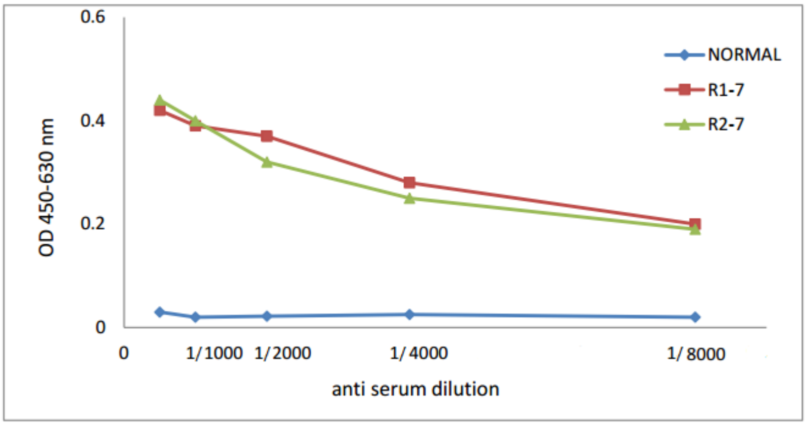
نمودار ۳-۴. تیتر آنتی‌بادی در خون‌گیری چهارم (روز ۹۵). R1: خرگوش شماره ۱ و R2 : خرگوش شماره ۲.



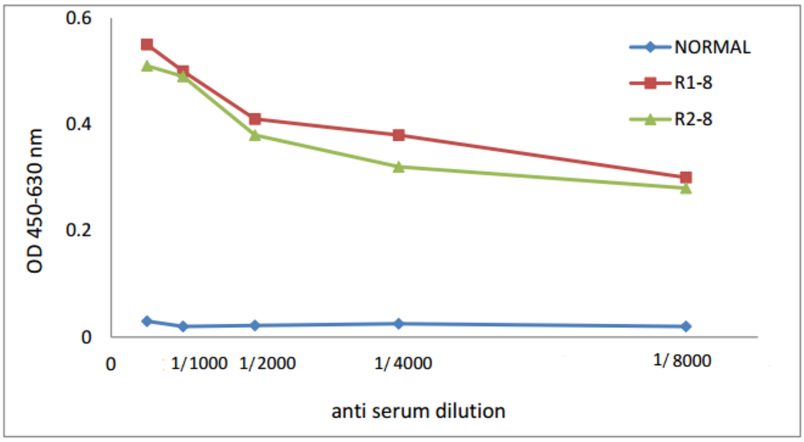
نمودار ۳-۵. تیتر آنتی‌بادی در خون‌گیری پنجم (روز ۱۱۰). R1: خرگوش شماره ۱ و R2 : خرگوش شماره ۲.



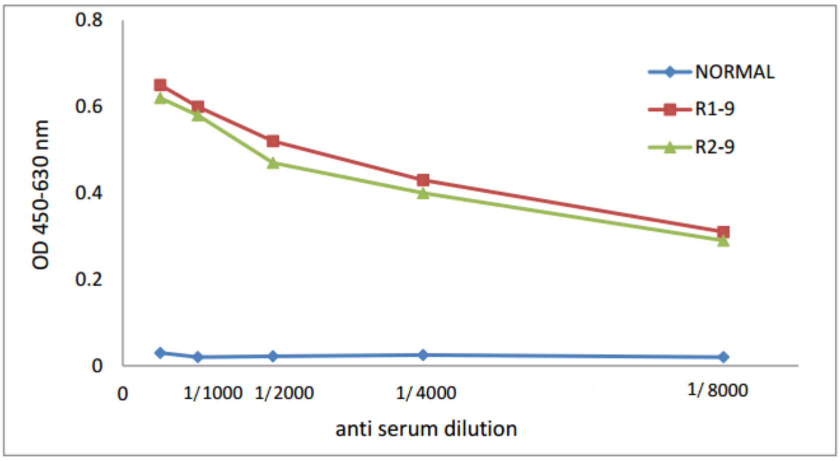
نمودار ۳-۶. تیتر آنتی‌بادی در خون‌گیری ششم(روز ۱۲۵). R1: خرگوش شماره ۱ و R2 : خرگوش شماره ۲.



نمودار ۳-۷. تیتر آنتی‌بادی در خون‌گیری هفتم (روز ۱۴۰). **R1**: خرگوش شماره ۱ و **R2** : خرگوش



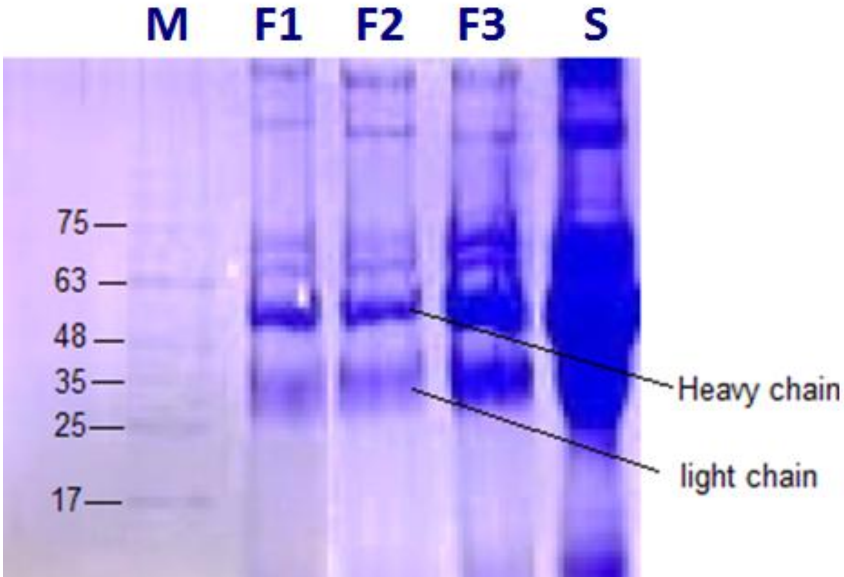
نمودار ۳-۸. تیتر آنتی‌بادی در خون‌گیری هشتم(روز ۱۵۵). **R1**: خرگوش شماره ۱ و **R2** : خرگوش شماره ۲.



نمودار ۳-۹. تیتر آنتی‌بادی در خون‌گیری نهم (روز ۱۷۰). **R1**: خرگوش شماره ۱ و **R2** : خرگوش شماره ۲.

۳-۳. تخلیص ایمونوگلوبولین‌های سرم به روش رسوب‌دهی پروتئین‌ها با استفاده از آمونیوم سولفات و کروماتوگرافی تعویض یونی:

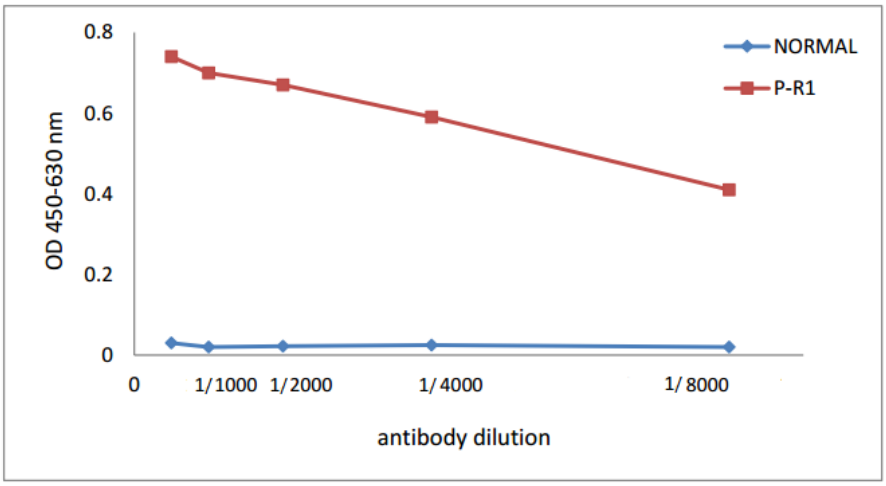
برای داشتن آنتی‌بادی پلی‌کلونال نسبتاً خالص پروتئین‌های سرم با استفاده از آمونیوم سولفات ۳۳٪ رسوب داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در مقابل بافر فسفات اسیدی pH ۶/۳ دیالیز انجام شد.محتویات کیسه‌ی دیالیز را خارج کرده و از ستون DEAE cellulose باردار شده به صورت Batch جهت کروماتوگرافی تعویض یونی استفاده شد. غلظت پروتئین‌های سرم با روش برادفورد قبل از تخلیص ۱۲میلی‌گرم در میلی‌لیتر ارزیابی شد. با توجه به اینکه ۱۵٪ از پروتئین‌های سرم را ایمونوگلوبولین‌ها تشکیل می‌دهند، پس از تخلیص در صورت ۱۰۰ ٪ بودن بازده باید ۱۶۸۰ میکروگرم ایمونوگلوبولین داشته باشیم. غلظت پروتئین تخلیص شده ۲۵۰۰ میلی‌گرم سنجیده شد.در تصویر زیر فرکشن‌های مختلف پس از تخلیص مشاهده می‌شود.



شکل۳-۹. تخلیص ایمونوگلوبولینهای سرم خرگوشی با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی. M. مارکر استاندارد پروتئینی بر حسب کیلو دالتون. F1.ایمونوگلوبولین تخلیص شده در اولین فرکشن F2.ایمونوگلوبولین تخلیص شده در دومین فرکشن F3 . ایمونوگلوبولین تخلیص شده در سومین فرکش S. سرم خرگوش ایمن شده قبل از تخلیص.

۳-۳-۱. تعیین تیتر آنتی‌بادی تخلیص شده

رقت‌های ۱/۵۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۲۰۰۰، ۱/۴۰۰۰ و ۱/۸۰۰۰ از آنتی‌بادی تخلیص شده (ایمونوگلوبولین تخلیص شده در اولین فرکشن) در مقابل سرم حیوان ایمن نشده، تعیین تیتر انجام شد.نمودار زیر بیانگر آن می‌باشد.



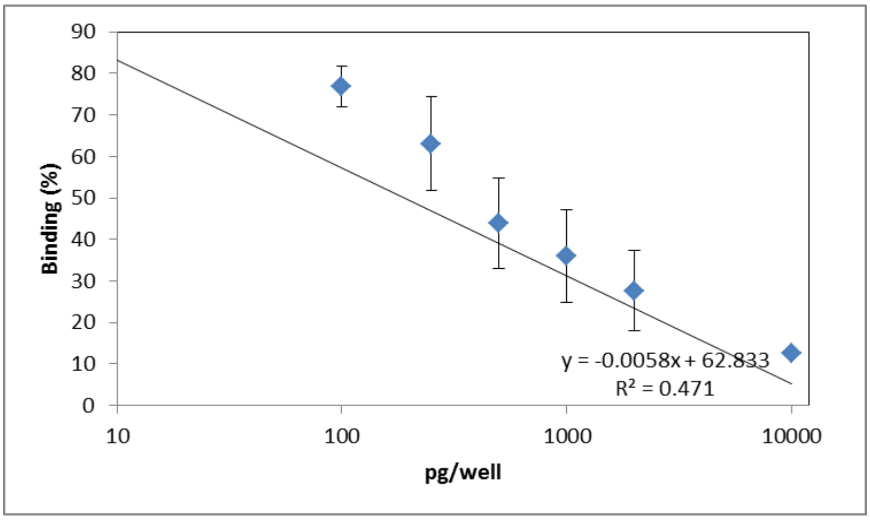
نمودار ۳-۱۰. تیتر آنتی‌بادی تخلیص شده (ایمونوگلوبولین تخلیص شده در اولین فرکشن).

۳-۵. الایزای متامفتامین در بزاق با استفاده از آنتی‌بادی تخلیص شده

۳-۵-۱. منحنی استاندارد متامفتامین در بزاق

برای رسم منحنی استاندارد متامفتامین در بزاق، از روش الایزا استفاده شد و در هر چاهک حاوی ۰/۱ میکروگرم آنتی‌ژن BSA-METH، ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی با غلظت ۱/۱۰۰۰ و ۵۰ میکرولیتر از بزاق حاوی متامفتامین با غلظت‌های صفر،۱۰۰pg،۲۵۰pg،۵۰۰pg، ۱ ng، ۲ ng، ۱۰ngدر ۵۰ میکرولیتر اضافه شد (به چاهک‌های حاوی BSA مقدار ۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی با غلظت ۱/۱۰۰۰ و ۵۰ میکرولیتر بزاق فاقد متامفتامین اضافه شد) .

سپس بعد از بدست آمدن جواب الایزا، برای رسم نمودار، در محور مختصاتی که محور Xها در آن غلظت‌های مختلف استاندارد با مقیاس لگاریتمی می‌باشد و عرض نقاط، از فرمول ($Y = \frac{B\times100}{B0}$ B= شدت جذب هر یک از غلظت‌های استاندارد B₀ = شدت جذب غلظت استاندارد صفر) بدست آمد، استفاده شد . سپس با داشتن X و Y منحنی مربوطه را رسم می‌کنیم (نمودار ۳-۱۱). (داده‌ها ی به کار رفته در نمودار ۶ بار تکرار می‌باشند.)



نمودار ۳-۱۱. منحنی استاندارد مت‌امفتامین در بزاق .

۳-۵-۲. محاسبه ضریب تغییرات درون و بین سنجشی[۱] برای الایزای مت-امفتامین در بزاق

۱- **ضریب تغیرات درون سنجشی :** برای محاسبه ضریب تغییرات درون سنجشی از دو کنترل با بالاترین جذب نوری و پایین‌ترین جذب نوری با سه بار تکرار به صورت دوتایی (Duplicate) استفاده شد. مطابق جدول ۳-۳، برای هر سه جذب نوری حاصل میانگین و انحراف معیار و ضریب تغییرات محاسبه شد. در نهایت از ضریب تغییرات کترل با بالاترین جذب نوری و پایین‌ترین جذب نوری میانگین گرفته شد. عدد حاصل برابر ضریب تغییرات درون سنجشی می‌باشد (CV % کمتر از ۱۵ قابل قبول می‌باشد) .

جدول ۳-۳. محاسبه ضریب تغییرات درون سنجشی

Control	OD	Control	OD
High	1.1	Low	0.46
High	1.26	Low	0.57
High	1.28	Low	0.44
Inter assay CV			
Mean of Means	1.2133		0.49
STD of Means	0.0986		0.07
% CV of Means	8.1311		14.28571
Inter-assay CV (n=3)	11.2084		

[1] Inter- and Intra-Assay Coefficients of Variability (CV)

ضریب تغییرات درون سنجش ۱۱/۰۲ محاسبه شد و از انجا که کمتر از ۱۵ است قابل قبول می-باشد.

۲-ضریب تغییرات بین سنجشی: برای محاسبه ضریب تغییرات بین سنجشی از تمام تکرار های دوتایی که برای غلظت‌های استاندارد مت‌امفتامین در بزاق در دو روز متوالی بدست آمد، میانگین، انحراف مقیار و ضریب تغییرات محاسبه می‌شود. میانگین ضریب تغییرات‌های بدست آمده برابر با ضریب تغییرات بین سنجشی می‌باشد(CV % کمتر از ۱۰ قابل قبول می‌باشد).

Intra-assay CV (n=48) = average % CV = 8.10

ضریب تغییرات بین سنجش ۸/۱۰ محاسبه شد و از انجا که کمتر از ۱۰ است قابل قبول می-باشد.

۳-۵. نتایج مربوط به طراحی نوار سنجش سریع

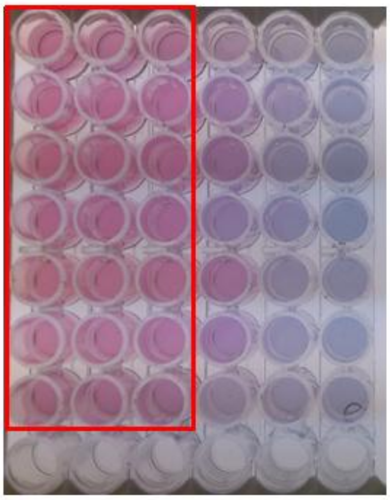
۳-۵-۱. آماده‌سازی نانوذرات طلا

برای آماده‌سازی نانوذرات طلا محلول یک میلی مولار $HAuCl_4$ آماده شد. این محلول رنگ زرد است. سپس محلول سیترات سدیم افزوده شد. بعد از افزودن این محلول و جوشاندن به مدت ۵ دقیقه رنگ محلول به قرمز تیره در آمد. تغییر رنگ به قرمز تیره نشان دهنده تشکیل نانوذرات طلا می‌باشد (شکل۳-۱۰).

شکل ۳-۱۰. تشکیل نانوذرات طلا با محلول سیترات سدیم

۳-۵-۲. تعیین pH و غلظت مناسب برای مزدوج ساختن آنتی‌بادی با نانوذرات طلا

برای اتصال آنتی‌ژن با نانوذرات طلاء، ابتدا در یک پلیت ۹۶خانه الایزا، شیب pH و شیب غلظت آنتی بادی ایجاد شد. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول طلای تهیه شده افزوده شد. این محلول ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از NaCl ۱ مولار افزوده شد. چاهک‌هایی که به رنگ قرمز باقی مانده بود چاهک‌هایی بودند که در آن‌ها نانوذرات طلا با آنتی‌بادی‌ها به خوبی کونژوگه شده بودند (شکل۳-۱۱).



شکل ۳-۱۱: بهینه‌سازی اتصال نانوذرات طلا به آنتی‌بادی.

۳-۵-۳. تهیه نوارهای سنجش سریع

۳-۵-۳-۱. طراحی نوار ادراری با استفاده از آنتی ژن تولیدی و آنتی بادی تجاری نشان دار با نانوذرات طلا

در این مرحله با استفاده از کاغذ نیتروسلولز کت شده با ایمنوژن سنتز شده و آنتی بادی تجاری نشان دار شده با طلا، نوار تست تهیه شد. سپس روی نوارها ۲۰ میکرولیتر از ادرار حاوی غلظت های مختلف متامفتامین ریخته شد. همان طور که در شکل ۳-۱۲ دیده می شود نقطه cut off

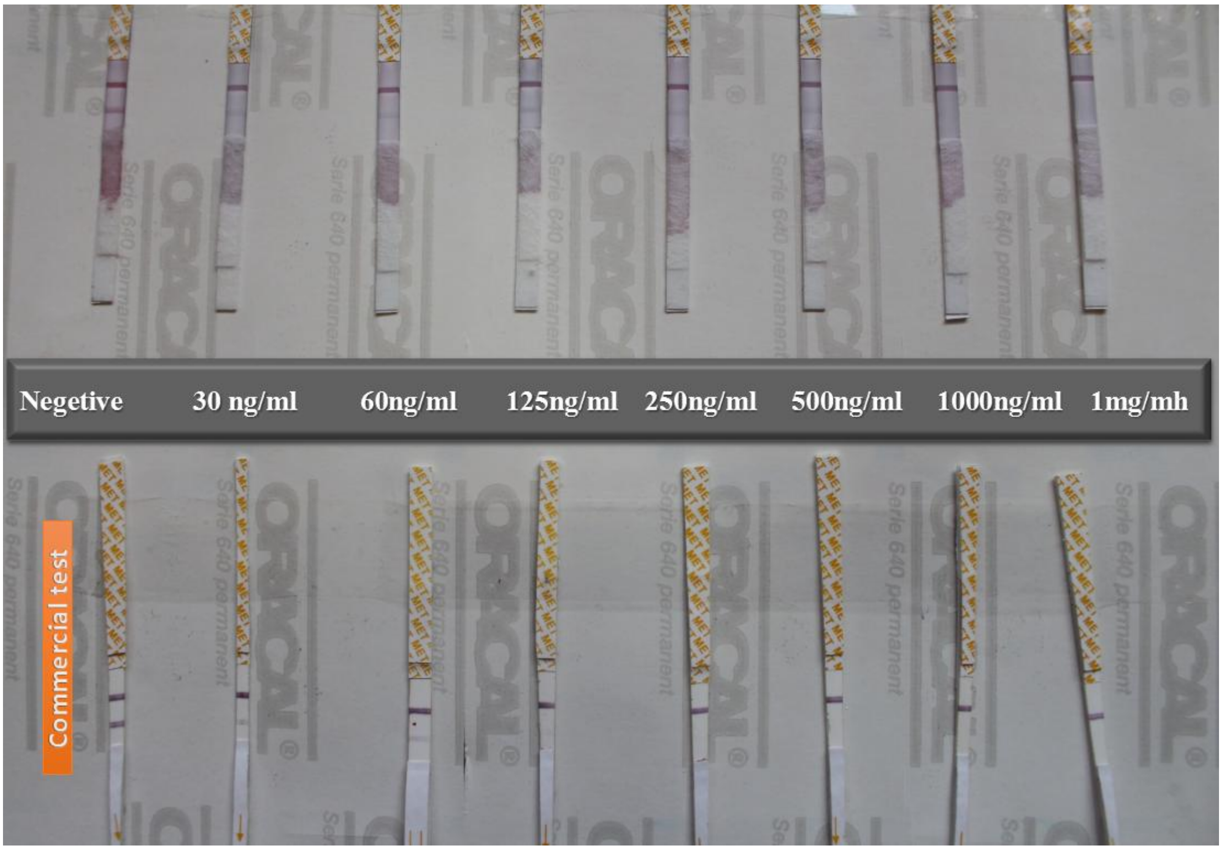
معادل ۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید که cut off مناسبی برای سنجش ادراری مت‌انفتامین محسوب می شود.

شکل ۳-۱۲. نوار ادراری با استفاده از ایمنوژن سنتز شده و آنتی بادی تجاری نشان دار با طلا.

۳-۵-۳-۲. طراحی نوار ادراری با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال تولیدی نشان‌دار شده با طلا، برای تشخیص مت‌امفتامین در ادرار و مقایسه آن با تست تجاری مشابه

در این مرحله نوار سنجش توسط آنتی بادی پلی کلونال تخلیص شده از سرم خرگوش و نشان دار شده با نانوذرات طلا تهیه شد . سپس نمونه ادرار با غلظت های مختلف مت‌امفتامین تهیه شد و به مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت رو نوار تهیه شده و نوار تجاری ریخته شد. نتایج آن در شکل ۳-۱۳ نشان داده شده است.

سپس با رقیق ساختن آنتی‌بادی تصل به نانوذرات طلا و طراحی مجدد نوارهای سنجش نقطه cut off معادل ۵۰۰ نانوگرم در میلی لیتر تعیین گردید که همان طور که گفته شد، cut off مناسبی برای تست ادراری مت‌انفتامین محسوب می شود(شکل ۳-۱۴).



شکل ۳-۱۳. نوار ادراری آنتی بادی پلی‌کلونال تولیدی نشان‌دار شده با طلا، برای تشخیص مــت‌امفتــامین در ادرار و مقایسه آن با سنجش تجاری مشابه.

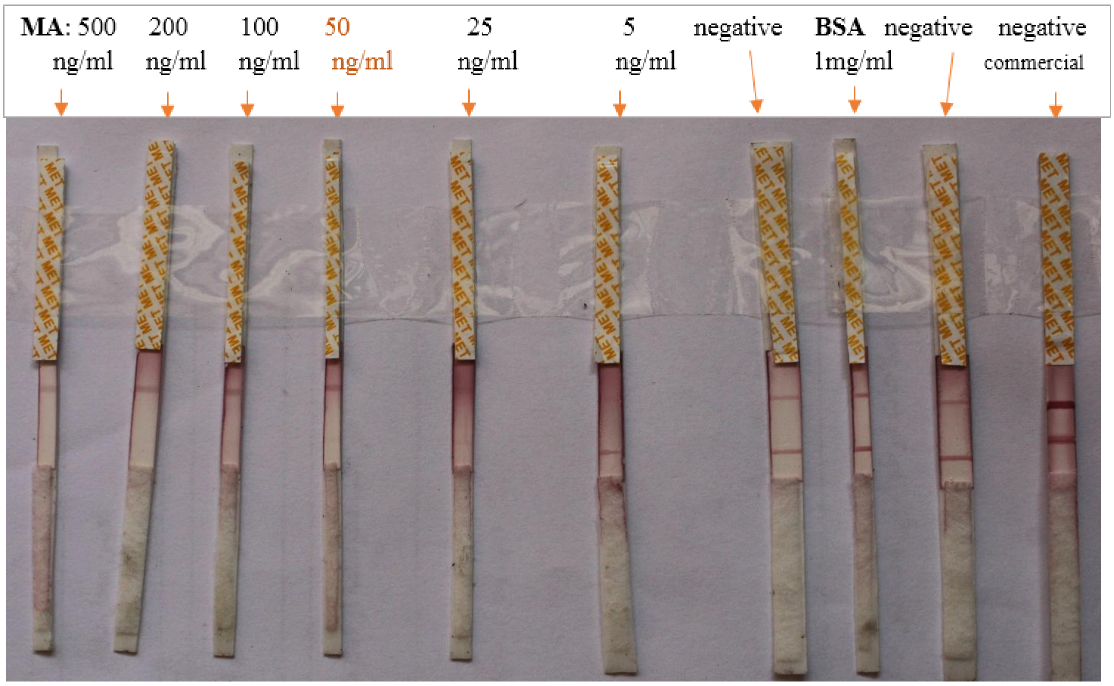
شکل ۳-۱۴. نوار ادراری تهیه شده با آنتی بادی پلی کلونال تولیدی نشان دار

شده با طلا با رقت ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۸

۳-۵-۳-۳. طراحی نوار بزاقی با استفاده از آنتی ژن سنتز شده و آنتی بادی پلی کلونال تولیدی نشان دار شده با طلا، برای تشخیص متامفتامین در نمونه بزاق و مقایسه آن با تست تجاری مشابه

در این مرحله نوار تست با استفاده از کاغذ نیتروسلولز کت شده با آنتی ژن سنتز شده و آنتی بادی پلی کلونال تخلیص شده از سرم خرگوش و نشان دار شده با نانوذرات طلا تهیه شد. سپس نمونه بزاق با غلظت های مختلف متامفتامین (۵۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۵ و صفر نانو گرم بر میلی لیتر) و همچنین نمونه بزاق حاوی محلول BSA (۱ mg/ml) تهیه شد و به مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت رو نوار تهیه شده و نوار تجاری ریخته شد(شکل ۳-۱۵).

نقطه cut off سنجش معادل ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر تعیین شد که cut off مناسبی برای سنجش‌های بزاقی متامفتامین محسوب می‌شود.



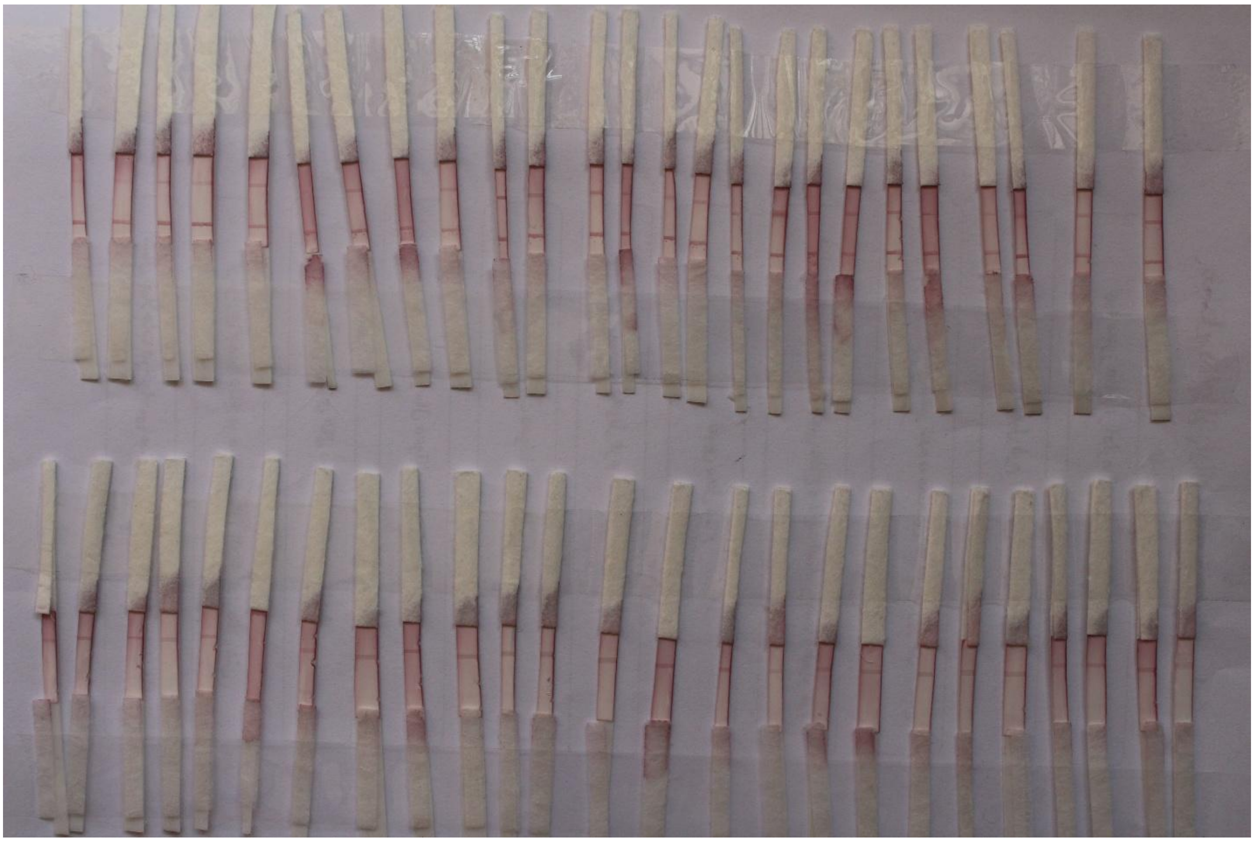
شکل۳-۱۵. طراحی نوار بزاقی با استفاده از آنتی ژن سنتز شده و آنتی بادی پلی کلونال تولیدی نشان دار شده با طلا، برای تشخیص متامفتامین در نمونه بزاق و مقایسه آن با تست تجاری مشابه.

۳-۵-۳-۴. تعیین اختصاصیت و حساسیت

برای تعیین اختصاصیت و حساسیت تست طراحی شده، ۲۵ نمونه بزاق منفی (فاقد مت‌امفتامین) و ۲۵ نمونه مثبت (که میزان ۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر مت‌امفتامین در آن حل شد) استفاده گردید. نتایج حاصل در جدول ۳-۳ و شکل ۳-۱۶ نشان داده شده است.

جدول ۳-۳. نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های بزاقی فاقد و حاوی مت‌امفتامین با سنجش سریع طراحی شده

نمونه	تعداد	جواب سنجش سریع طراحی شده	
بزاق	۵۰	منفی	مثبت
فاقد مت‌امفتامین	۲۵	۲۵	۲
حاوی مت‌امفتامین	۲۵	۳	۲۳



شکل ۳-۱۶. نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های بزاقی فاقد و حاوی مت‌امفتامین با نوارهای سنجش طراحی شده

$$\text{sensitivity} = \frac{\text{number of true positives}}{\text{number of true positives} + \text{number of false negatives}}$$

$$\text{specificity} = \frac{\text{number of true negatives}}{\text{number of true negatives} + \text{number of false positives}}$$

$$\text{accuracy} = \frac{\text{number of true positives} + \text{number of true negatives}}{\text{number of true positives} + \text{false positives} + \text{false negatives} + \text{true negatives}}$$

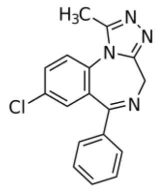
$$\text{حساسیت} = \frac{23}{23+2} = 0.92$$

$$\text{اختصاصیت} = \frac{25}{25+0} = 1$$

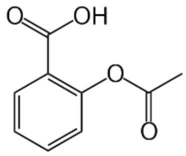
$$\text{صحت} = \frac{25+23}{23+25+2+0} = 0.96$$

۳-۵-۳-۵. بررسی واکنش متقاطع آنتی‌بادی

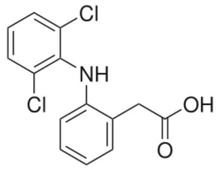
در این مرحله واکنش آنتی‌بادی با مولکول‌های دارویی نشان داده شده در شکل ۳-۱۷ و برخی استرویدها نظیر کورتیزول، تستسترون و پروژسترون، با استفاده از نوارهای سنجش سریع بررسی شد. نتایج این آزمایش در شکل ۳-۱۸، شکل ۳-۱۹ و جدول۳-۴ آورده شده است.



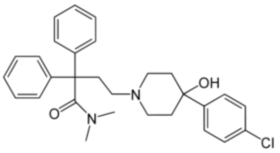
Alparazolam



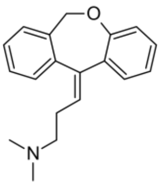
Aspirin



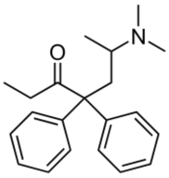
Diclofenac



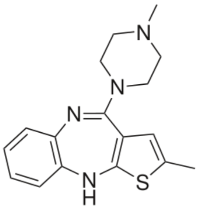
Loperamide



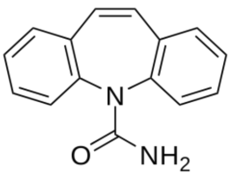
Doxepin



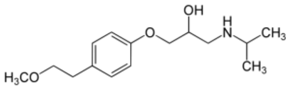
Methadone



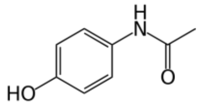
olanzapine



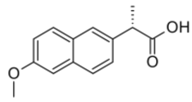
Carbamazepine



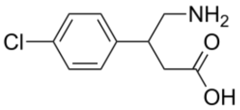
Metoprolol



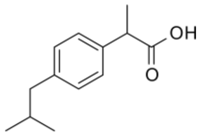
Actaminophen



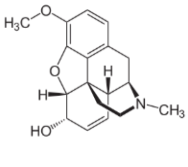
Naproxen



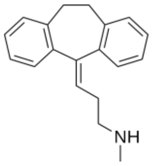
Baclofen



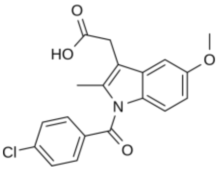
Ibuprofen



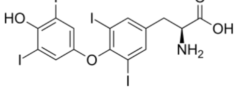
Codein



Nortriptyline

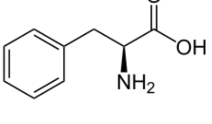


Indomethacin

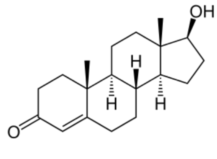


Levotyroxine

Amantidine

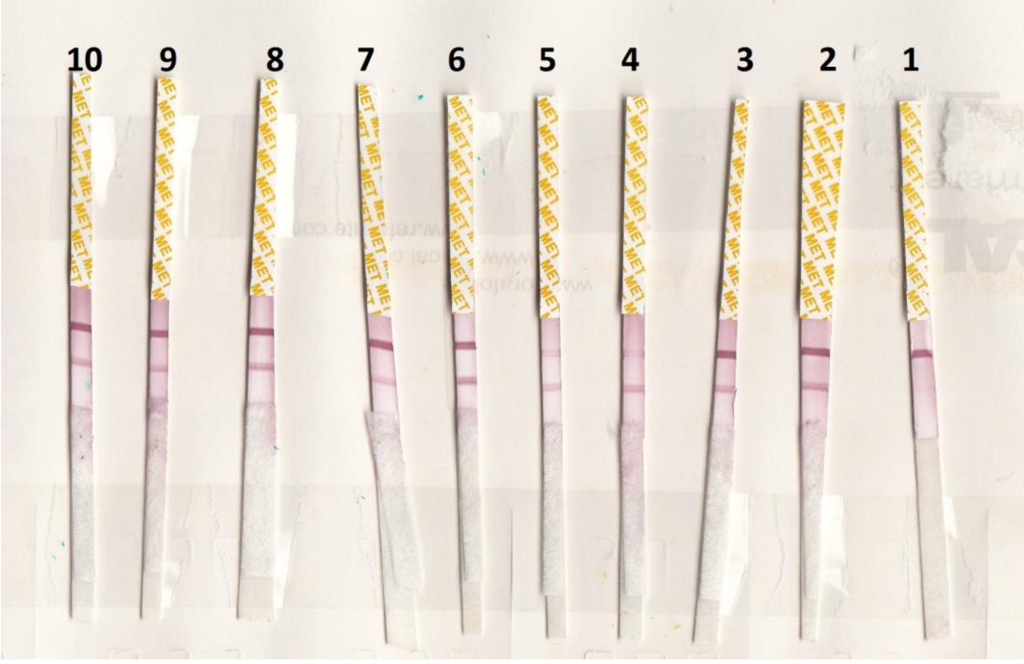


L-phenylalanine

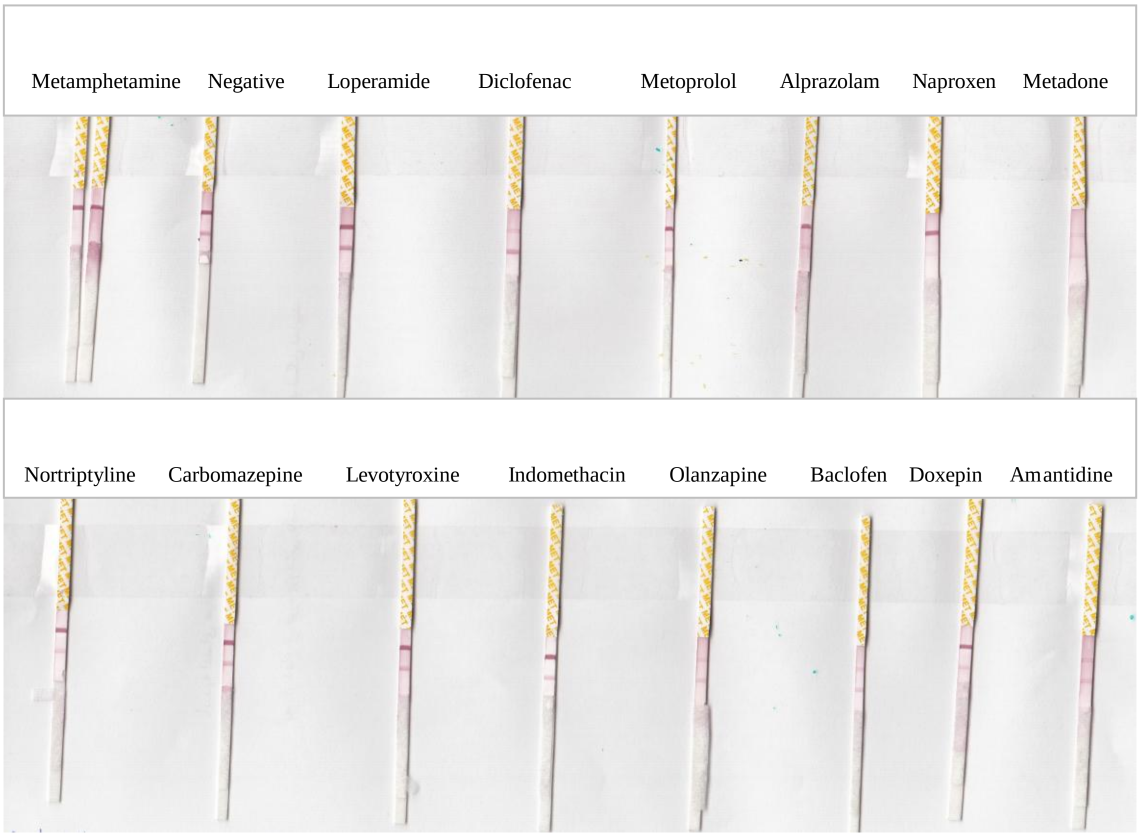


Testosterone

شکل ۳-۱۷. ساختار مولکول‌هایی که واکنش متقاطع آنها با آنتی‌بادی تولیدی بررسی شد



شکل ۳-۱۸. بررسی واکنش متقاطع برخی داروها با آنتی بادی تولیدی. ۱-مت‌امفتامین ۲-منفی ۳-ایبوپروفن ۴-استامینوفن ۵- آسپرین ۶-کدئین ۷-L-فنیل‌آلانین ۸-تستسترون ۹-کورتیزول ۱۰-پروژسترون



شکل ۳-۱۹. بررسی واکنش متقاطع آنتی‌بادی تولیدی با برخی از داروها

جدول ۳-۴. بررسی واکنش متقاطع آنتی‌بادی تولیدی با برخی از داروها

واکنش متقاطع	غلظت mg/ml	مولکول
ندارد	0.1	**Testostrone**
ندارد	0.1	**Cortisol**
ندارد	0.1	**L-phenylalanine**
ندارد	0.1	**Progesterone**
ندارد	15	**Ibuprofen**
ندارد	15	**Codein**
ندارد	15	**Actaminophen**
ندارد	15	**Aspirin**
ندارد	1	**Alparazolam**
ندارد	1	**Loperaminde**
ندارد	1	**Diclofenac**
ندارد	1	**Metadone**
ندارد	1	**Metoprolol**
ندارد	1	**Naproxen**
ندارد	1	**Nortriptyline**
ندارد	1	**Carbamazepine**
ندارد	0.1	**Levotyroxine**
ندارد	1	**Indomethacin**
ندارد	1	**Baclofen**
ندارد	1	**Doxepin**
ندارد	1	**Amantidine**
ندارد	1	**Olanzapine**

فصل چهارم

بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها

۴-۱. بحث

امفتامین‌ها گروهی از مولکول‌ها شامل امفتامین، مت‌امفتامین، MDMA و... (شکل ۱-۱) می-باشند که سوء مصرف آنها در دهه‌های اخیر در سراسر جهان افزایش یافته است. در میان اعضاء این گروه بیشترین سوء مصرف، به خصوص در کشور ما، مربوط به مت‌امفتامین می‌باشد و این امر به دلیل قیمت کم(که با سهولت ساخت صنعتی آن مرتبط است) و اثر تحریکی شدید آن می‌باشد [۶۵, ۶۶].

مت‌امفتامین مانند سایر امفتامین‌ها از مشتقات فنیل‌اتیل‌آمین‌ها است و یک محرک مهم برای سیستم عصبی مرکزی (CNS) می‌باشد. مت‌امفتامین مانند سایر محرک‌های سیستم عصبی مرکزی، دارای توان بالقوه بالا برای ایجاد وابستگی روحی و جسمی(اعتیاد) می‌باشد [۶۷].

تهدید امنیت اجتماعی، کاهش بازدهی در محیط‌های کاری، کاهش رفاه و سلامت عمومی که در پی مصرف مواد مخدری نظیر مت‌امفتامین حاصل می‌شود، دولت‌ها را مجبور به مقابله با سوء مصرف این قبیل مواد مخدر می‌سازد. برای این منظور شناسایی افراد سوء مصرف کننده مواد مخدر بسیار حائز اهمیت است. بنابراین امروزه دولت‌ها برای کاهش رشد روز افزون سوء مصرف مواد مخدر نیازمند روش‌های سریع و دقیق برای شناسایی سوء مصرف کنندگان مواد مخدر از قبیل مت‌امفتامین می-باشند. برای دستیابی به یک روش سریع و دقیق، بررسی نمونه های مورد سنجش و روش‌های سنجشی موجود یک امر ضروری محسوب می‌شود [۶۸].

۴-۱-۱. نمونه های زیستی در سنجش‌های مربوط به سوء مصرف مواد مخدر

امروزه اغلب سنجش‌های مربوط به سوء مصرف مواد مخدر بر مبنای استفاده از نمونه ادرار و خون می‌باشد. یکی از مهمترین دلایلی که نمونه ادرار و خون برای این قبیل سنجش‌ها مورد اقبال عموم واقع شده‌اند، غلظت بالای دارو[1] و متابولیت‌های آن در نمونه‌های مذکور می‌باشد. اما در سال-های اخیر با ظهور روش‌های سنجش با حساسیت بالا، نمونه‌هایی از قبیل مو، عرق و بزاق نیز برای سنجش‌های مربوط به سوء مصرف مواد مخدر مورد توجه واقع شدند. به کارگیری هر کدام از نمونه‌ها مورد استفاده برای سنجش‌های مربوط به سوء مصرف مواد مخدر دارای مزایا و معایبی می‌باشند که در جدول ۴-۱ گردآوری شده است[۶۹] .

[1] Drug

جدول ۴-۱. مزایا و معایب هر کدام از نمونه‌های مورد استفاده در سنجش‌های مربوط به سوء مصرف مواد مخدر .

نمونه	مزایا	معایب
خون Blood	قابلیت شناسایی افراد تحت تاثیر مواد (تازه مصرف کرده) امکان‌پذیر نبودن تقلب در آن	نمونه‌گیری تهاجمی نیازمند سنجش‌های آزمایشگاهی (سنجش درمکان آن در دسترس نیست)
ادرار Urine	به خوبی در مورد نمونه ادرار مطالعه شده است،در نتیجه روش‌های سنجش آن استاندارد شده می‌باشد. هزینه‌های سنجش آن کمتر است در دسترس بودن سنجش‌های در-مکان برای نمونه ادرار	دارای پنجره شناسایی کوتاه امکان‌پذیر بودن تقلب در آن
مو Hair	دارای پنجره شناسایی طولانی (از هفته‌ها تا ماه‌ها) نمونه‌گیری غیر تهاجمی امکان‌پذیر نبودن تقلب در آن پایداری نمونه برای سال‌ها قابلیت نمونه‌گیری از اجساد	نیازمند سنجش‌های آزمایشگاهی (سنجش درمکان آن در دسترس نیست) روش‌های سنجشی گران قیمت
عرق Sweat	دارای پنجره شناسایی طولانی (۱۴-۳ روز) نمونه‌گیری غیر تهاجمی	نیازمند سنجش‌های آزمایشگاهی (سنجش درمکان آن در دسترس نیست) روش‌های سنجشی گران قیمت احتمال وجود آلودگی[۱]
بزاق Saliva	قابلیت شناسایی افراد تحت تاثیر مواد (تازه مصرف کرده) امکان‌پذیر نبودن تقلب در آن نمونه‌گیری غیر تهاجمی در دسترس بودن سنجش‌های در-مکان	دارای پنجره شناسایی کوتاه یک‌دست نبودن روش‌های نمونه-گیری احتمال وجود آلودگی

[1] contamination

نمونه ادرار: استفاده از نمونه ادرار برای سنجش‌های مربوط به سوء مصرف مواد مخدر دارای مزایای بسیار و همچنین معایبی نیز می‌باشد که در جدول ۴-۱ آورده شده است.

یکی از مهمترین مشکلات استفاده از نمونه ادرار متناسب نبودن غلظت دارو در ادرار و پلاسما می‌باشد. به دلیل این امر به طورمعمول زمان افزایش غلظت دارو در ادرار با زمان اثر دارو هماهنگ نیست و در نتیجه با استفاده از این نمونه نمی‌توان افراد تحت تاثیر مواد(تازه مصرف کرده) را شناسایی کرد. بنابراین در سنجش‌هایی از قبیل سنجش‌های جاده ایی که هدف بررسی رفتار پرخطر و شناسایی افراد تحت تاثیر مواد محرکی نظیر مت‌امفتامین می‌باشد، استفاده از نمونه ی ادرار توصیه نمی‌شود[۷۰].

Cut off مت‌امفتامین در نمونه‌ی ادرار ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ادرار گزارش شده است[۷۱]. در تحقیق حاضر نیز سنجش ایمنوکروماتوگرافی با Cut off ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای تشخیص مت‌امفتامین در نمونه ادرار طراحی شد. سنجش طراحی شده قابل مقایسه با سنجش تجاری مشابه (سنجش ایمنوکروماتوگرافی تشخیص مت‌امفتامین در ادرار) است.

نمونه مو: استفاده از نمونه مو برای سنجش‌های مربوط به سوء مصرف مواد مخدر روشی تقریبا جدید محسوب می‌شود. به دلیل غلظت کم دارو و متابولیت‌های آن در مو، برای استفاده از مو به عنوان نمونه ی مورد سنجش برای شناسایی مواد مخدر، به روش‌های سنجشی حساس نیاز است. در مو غلظت خود دارو از متابولیت‌های آن بیشنر است. اولین آزمایشات بر روی خوکچه هندی[1] نشان داد که امفتامین‌ها را می‌توان در مو شناسایی کرد [۷۲]. نمونه مو می‌تواند یک نمونه حساس و ابزار برای ارزیابی طولانی مدت مصرف امفتامین‌ها باشد[۷۳].

[1] Guinea pig

به دلیل در دسترس نبودن سنجش‌های درمکان برای نمونه مو و همچنین متناسب نبودن غلظت دارو در مو و خون، این نمونه نیز مانند نمونه ی ادرار برای سنجش‌های از قبیل سنجش‌های جاده ایی مناسب نمی‌باشد.

Cut off متامفتامین در نمونه‌ی مو ۵۰۰ پیکوگرم در میلی‌گرم مو گزارش شده است[۷۴].

نمونه عرق: در سال‌های اخیر با به وجود آمدن ابزار مناسب برای نمونه‌گیری از عرق و همچنین در دسترس بودن روش‌های سنجشی حساس، استفاده از نمونه عرق برای سنجش‌های مربوط به سوء مصرف مواد مخدر مورد توجه قرار گرفته است. به طور معمول برای نمونه‌گیری از عرق یک پد جاذب[1] قابل نسب بر روی پوست بدن فرد استفاده می‌شود. این پد برای یک بازه زمانی (۷-۱۴ روز) روی پوست فرد قرار می‌گیرد. در این روش آب و دیگر مواد فرار تبخیر می‌شوند ولی مولکول‌های دارو در پد باقی می‌مانند. در انتهای بازه زمانی مشخص شده، پد برای سنجش به آزمایشگاه‌های مخصوص فرستاده می‌شود. انتشار غیر فعال مکانیسم اصلی انتقال دارو به عرق می‌باشد.

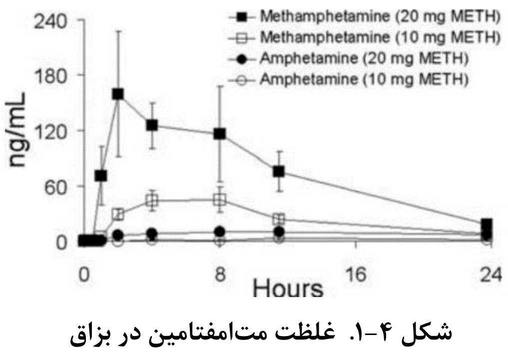
برخلاف دیگر نمونه‌های مورد استفاده برای سنجش‌های مربوط به سوء مصرف مواد مخدر که برای بررسی مصرف مواد رویکردی به زمان گذشته (retrospective) دارند، نمونه عرق به دلیل طولانی بودن دوره نمونه‌گیری رویکردی به آینده (prospective) دارد. بنابراین نمونه‌گیری از عرق و سنجش دارو در آن برای بررسی[2] مصرف مواد در افراد تحت درمان و در حال ترک اعتیاد مناسب می‌باشد .

Cut off متامفتامین در نمونه‌ی عرق ۲۵ نانوگرم در هر پد (ng/patch) گزارش شده است[۷۴, ۷۵].

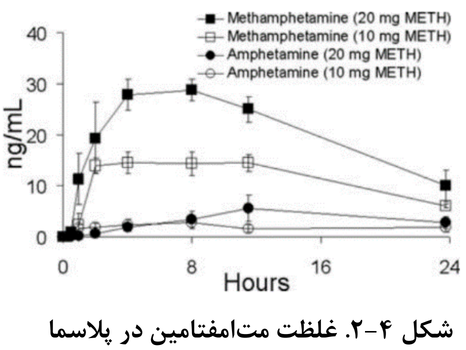
[1] Sweat patch
[2] monitoring

نمونه بزاق: امروزه بزاق به نمونه پرطرفداری برای سنجش‌های مربوط به سوء مصرف مواد مخدر تبدیل شده است. قابلیت شناسایی افراد تحت تاثیر مواد (تازه مصرف کرده)، امکان‌پذیر نبودن تقلب در آن، نمونه‌گیری غیر تهاجمی و آسان ، در دسترس بودن سنجش‌های درمکان برای نمونه بزاق دلایلی است که بزاق را به یک نمونه بسیار مناسب برای سنجش‌های از قبیل سنجش‌های جاده ایی تبدیل کرده است [۷۶].

امفتامین و متامفتامین با Cut off برابر ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، در بزاق قابل شناسایی می‌باشند. غلظت مت‌امفتامین در بزاق متناسب با غلظت آن در پلاسما است. در یک مطالعه که در سال ۲۰۰۷ توسط ماریلین[۱] و همکاران این امر به خوبی نشان داده شده است. در این مطالعه چند گروه داوطلب طی ۱۲ هفته، روزانه دوزهای مختلفی(۱۰ میلی‌گرم و ۲۰ میلی‌گرم) از مت‌امفتامین را به صورت خوراکی دریافت کردند و وجود مت‌امفتامین در بزاق، پلاسما و ادرار آنها بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که ماکزیمم غلظت مت‌امفتامین در بزاق زمانی که فرد دوز ۱۰ میلی‌گرم را دریافت کرده ۴-۸ ساعت بعد از دریافت دارو و در پلاسما ۲-۸ ساعت بعد از دریافت دارو و زمانی که دوز ۲۰ میلی‌گرم را دریافت کرده ماکزیمم غلظت در بزاق ۲-۱۲ ساعت پس از دریافت دارو و در پلاسما نیز همین زمان می‌باشد (شکل ۴-۱ و ۴-۲).



شکل ۴-۱. غلظت مت‌امفتامین در بزاق



شکل ۴-۲. غلظت مت‌امفتامین در پلاسما

[1] Marilyn A.

این هماهنگی غلظت در بزاق و پلاسما به دلیل سرعت بالای انتشار متامفتامین از خون به بزاق می‌باشد. ترشح متامفتامین به بزاق توسط خاصیت چربی‌دوستی متامفتامین و اتصال کم آن به پروتئین‌های پلاسما، تسهیل می‌شود [۷۰].

از آنجا که زمان اثر متامفتامین در از ۶ تا ۱۲ ساعت گزارش شده است، بنابراین با استفاده از نمونه بزاق به درستی می‌توان افراد تحت تاثیر مصرف متامفتامین را شناسایی کرد.

Cutoff مواد مخدر مختلف در بزاق در جدول ۴-۲ نشان داده شده است [۷۴].

جدول ۴-۲. Cutoff مواد مخدر مختلف در بزاق

Analyte	*Concentration (ng/mL)*
THC parent drug	2
Cocaine[a]	8
Opiates	
Morphine	40
Codeine	40
6-Acetylmorphine	4
Phencyclidine	10
Amphetamines:	
Amphetamine	50
Methamphetamine	50
MDMA	50
MDA	50
MDEA	50

MDA, methylenedioxyamphetamine; MDEA, 3,4-methylene-dioxyethylamphetamine; MDMA, methylenedioxymethamphetamine; SHMHSA, Substance Abuse Mental and Health Services Administration; THC, Δ^9-tetratydeocannabiol.

[a] Cocaine or benzoylecgonine.

همان طور که ذکر شد در تحقیق حاضر نیز از نمونه بزاق استفاده شد. با استفاده آنتی‌ژن مت-امفتامین سنتز شده و آنتی‌بادی تولیدی بر علیه آن، سنجش الایزا برای تشخیص متامفتامین در بزاق طراحی شد. ضریب تغییرات درون سنجشی برای سنجش الایزای طراحی شده ۱۱/۰۲ محاسبه شد و از انجا که کمتر از ۱۵ است قابل قبول می‌باشد. ضریب تغییرات بین سنجشی نیز برای سنجش

الایزای طراحی شده ۸/۱ محاسبه شد و از انجا که کمتر از ۱۰ است قابل قبول می‌باشد. سپس با استفاده از استفاده آنتی‌ژن مت‌امفتامین سنتز شده و آنتی‌بادی تولیدی بر علیه آن، سنجش ایمنوکروماتوگرافی برای تشخیص مت‌امفتامین در نمونه بزاق با cut off برابر ۵۰ نانوگرم در میلی-لیتر بزاق طراحی شد.

۴-۱-۲. روش‌های سنجش مت‌امفتامین در نمونه‌های زیستی

به طور کلی سنجش‌های مربوط به سوء مصرف مواد مخدر به دو دسته تقسیم می‌شوند : ۱- سنجش اولیه با استفاده از سنجش‌های ایمنی[1] ۲- سنجش‌های تاییدی[2]

در آزمایشگاه‌های تشخیصی، برای بررسی مواد مخدر در نمونه‌های بیولوژیک ابتدا از روش‌های سنجش ایمنی استفاده می‌شود. به دلیل اختصاصیت کم روش‌های سنجش ایمنی در مطالعات قضایی[3] نمونه‌های مثبت شناسایی شده توسط روش‌های سنجش ایمنی باید به وسیله روش‌هایی بر مبنای اسپکترومتری جرمی[4](روش GC-MS، روش Gold standard برای تایید نمونه‌های حاوی مواد مخدر می‌باشد) تایید شوند [۶].

۴-۱-۲-۱. سنجش‌های ایمنی برای امفتامین‌ها

روش‌های سنجش ایمنی که بر مبنای واکنش آنتی‌ژن وآنتی‌بادی می‌باشند، به دلیل سرعت، حساسیت برای سنجش‌های مربوط به سوءمصرف مواد مخدر مورد استفاده قرار می‌گیرند. این سنجش‌ها هم به صورت آزمایشگاهی و هم به صورت سنجش‌های درمکان[5] برای شناسایی مواد مخدر در انواع مختلف نمونه‌های زیستی استفاده می‌شوند.

---

[1] Initial test immunoassay
[2] confirmation tests
[3] Forensic study
[4] Mass spectrometry
[5] point-of-care or POC

سنجش‌های ایمنی برای امفتامین‌ها را می‌توان به دو گروه اصلی تقسیم کرد : ۱-سنجش‌های که با هدف شناسایی امفتامین و مت‌امفتامین به تنهایی، طراحی می‌شوند ۲- سنجش‌های ایمنی که دارای cross-reaction بالایی با دیگر اعضای خانواده امفتامین‌ها (مانند MDA,MDMA,MDEA و....) دارند. در غربالگری برای سوء مصرف مواد مخدر به طور معمول از سنجش‌های دسته اول استفاده می-شود زیرا در صورت استفاده از سنجش‌های دسته دوم حجم نمونه‌هایی که برای روش‌های تاییدی فرستاده می‌شود بسیار زیاد و هزینه بر خواهد بود[۶].

۴-۱-۲-۱-۱. سنجش‌های سریع

امروزه علاقه بسیار زیادی برای استفاده از سنجش‌های سریع (یا سنجش‌های درمکان) برای سنجش‌های مربوط به سوء مصرف مواد مخدر وجود دارد. سنجش‌های در مکان اغلب بر مبنای ایمنوکروماتوگرافی (Lateral flow immunoassay) می‌باشند.

سنجش‌های درمکان مربوط به سوء مصرف مواد مخدر در اورژانس بیمارستان، مراکز ترک اعتیاد، غربالگری در محیط‌های کار، مراکز قضایی و راهنمایی و رانندگی قابل استفاده می‌باشند. صرفه جویی در زمان از مهمترین مزایای سنجش‌های درمکان می‌باشد زیرا حمل و نقل نمونه به مراکز - آزمایشگاهی زمان‌بر و پر هزینه است[۶۸].

از بین روش های سنجش ایمنی، روش‌های ایمنوکروماتوگرافی نسبت به روش های دیگر از چند جهت ارجح است:

۱.این روش به ابزار پیشرفته نیاز ندارد و به راحتی در هر مکانی قابل انجام است.

۲.به مراحل پیچیده برای آماده کردن نمونه نیاز ندارد.

۳.به سرعت جواب را نشان می‌دهد و جواب آن با چشم غیرمسلح قابل رویت است

۴. نتایج این سنجش‌ها نیاز به تفسیر آزمایشگاهی ندارند و برای عموم قابل استفاده می‌باشد

۵. حساسیت و اختصاصیت مناسبی دارد

۶. قیمت آن ارزان است و بازار مصرف مناسبی دارد[۷۶]

همان طور که ذکر شد، سنجش‌های در مکان اغلب بر مبنای ایمنوکروماتوگرافی می‌باشند. برای سنجش‌های مربوط به سوء مصرف مواد مخدر از روش رقابتی این گونه سنجش‌ها استفاده می‌شود. در روش رقابتی، هنگامیکه غلظت داروی موجود در نمونه بیشتر از cut off آن در نمونه باشد، برای اتصال به آنتی‌بادی نشان‌دار، با آنتی‌ژن ثابت شده روی غشا موجود در سنجش رقابت می‌کند. در این شرایط در محل خط تست رنگی مشاهده نشده و بنابراین عدم تشکیل خط نشانه مثبت بودن تست می‌باشد.

استفاده از این گونه سنجش‌ها برای شناسایی مورفین و مت‌امفتامین بسیار مناسب بوده ولی برای تشخیص مصرف حشیش کارایی ضعیفی دارند [۷۷]. از این رو در تحقیق حاضر سنجش ایمنوکروماتوگرافی برای شناسایی مت‌امفتامین در نمونه بزاق انسان طراحی شد.

مهمترین مرحله در طراحی سنجش‌های سریع برای بررسی سوء مصرف مواد مخدر تهیه آنتی‌ژن و آنتی‌بادی دارو می‌باشد. از آنجا که مت‌امفتامین جرم مولکولی کمی دارد و به عنوان هاپتن محسوب می‌شود، بنابراین اولین قدم در طراحی سنجش‌های ایمنی برای مت‌امفتامین متصل ساختن آن به یک پروتئین بزرگ (مانند BSA) است. برای این منظور ابتدا لازم است یک گروه فعال مانند گروه کربوکسیل یا آمید به آن متصل گردد. در اکثر مطالعات با استفاده از روش چنگ[1] و همکاران، مت-امفتامین را توسط N-(بروموبوتیل)فتالیمید به مشتق N-(۴-امینوبوتیل)مت‌امفتامین تبدیل می‌کنند [۳۴]. در تحقیق حاضر نیز این مشتق سنتز شد اما به دلیل متصل نشدن این مشتق به BSA با کارایی بالا، در مرحله بعد از روش بایرنس و همکاران برای تولید مشتق کربوکسیله مت‌امفتامین استفاده شد [۶۴]، با این تفاوت که در مرحله احیا گروه سوکسینیل اضافه شده به مت‌امفتامین، به جای استفاده از گاز هیدروژن، که بسیار خطرناک بوده و امکانات استفاده از آن در دسترس نبود، از عامل احیا کننده سدیم بروهیدرات استفاده شد. برای اتصال مشتق کربوکسیله مت‌امفتامین به BSA از روش کربودی‌ایمید استفاده شد [۴۴]. واکنش ایمنوژن سنتز شده با آنتی‌بادی تجاری نشان‌دار با نانوذرات طلا بررسی شد و به تایید رسید.

---

[1] Cheng

پس از تهیه آنتی‌ژن، برای طراحی سنجش سریع به آنتی‌بادی نیاز است. در سنجش‌های سریع مواد مخدر، برای کاهش جواب‌های مثبت کاذب، به طور معمول از آنتی‌بادی منوکلونال بر علیه دارو استفاده می‌شود [۷۸, ۷۹]. اما در تحقیق حاضر آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر علیه مت‌امفتامین تولید شد. برای تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال، آنتی‌ژن سنتز شده به دو خرگوش در فواصل زمانی مشخص شده در جدول ۳-۱ تزریق شد. پس از سومین تزریق برای بررسی وضعیت تولید آنتی‌بادی در حیوان‌ها، از هر دو خرگوش ۵ روز بعد هر تزریق، خون‌گیری صورت گرفت و سنجش الایزا با رقت‌های ۱/۵۰۰ تا ۱/۸۰۰۰ سرم انجام شد. نتایج نشان داد که بعد از تزریق پنجم، تیتر آنتی‌بادی سرم در مقایسه با سرم حیوان قبل از تزریق مقدار قابل توجهی بالا رفت. میزان آنتی‌بادی بعد از تزریق دهم در بهترین وضعیت قرار گرفت بنابراین سرم حاصل از این خون‌گیری برای تخلیص آنتی‌بادی استفاده شد. تخلیص آنتی‌بادی با روش رسوب‌دهی پروتئین‌های سرم با استفاده از آمونیوم سولفات، سپس دیالیز و در نهایت با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی صورت گرفت و کیفیت آنتی‌بادیپلی‌کلونال تخلیص شده با آنالیز روی ژل SDS-PAGE و به دنبال آن الایزای غیرمستقیم با آنتی‌ژن تأیید شد.

استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال در سنجش‌های سریع برای مت‌امفتامین با وجود اختصاصیت کمتر، دارای مزایایی نیز می‌باشد. یکی از مزیت‌های استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال در سنجش‌های سریع برای مت‌امفتامین این است که به دلیل اختصاصیت کمتر با مت‌امفتامین دارای واکنش متقاطع با دیگر اعضای خانواده مت‌امفتامین‌ها بوده، و با استفاده از آن می‌توان سوء مصرف دیگر اعضای این خانواده مانند امفتامین را نیز بررسی کرد. البته اختصاصیت کم آنتی‌بادی پلی‌کلونال به مت‌امفتامین ممکن است منجر به جواب مثبت کاذب شود. داروهای حاوی افدرین و سودوافدرین، بیشتر داروهای ضد احتقان مانند فنیل افرین [۸۰]، داروهای محرکی که برای بیماران مبتلا به کم توجهی-بیش‌فعالی[1] و نارکولپسی(خواب بارگی) تجویز می‌شوند، داروهای سرکوبگر اشتها، بسیاری از داروهای روان درمانگر مانند: Bupropion [۸۱]، Phenothiazines [۸۲]، Trazodone [۸۳] ، Doxepin

[1] attention deficit and hyperactivity disorder

[۸۴] و Desipramine [۸۵] به عنوان اخلال‌گر در سنجش‌های ایمنی امفتامین‌ها گزارش شده اند و می‌توانند منجر به جواب مثبت کاذب در این سنجش‌ها شوند.

از این رو واکنش متقاطع آنتی‌بادی تولیدی با برخی از داروها (شکل ۳-۱۷) که دارای شباهت ساختاری با مت‌امفتامین بوده و FDA آنها را به عنوان اخلال‌گر در سنجش‌های ایمنی امفتامین‌ها معرفی کرد است، بررسی شد و واکنش متقاطع آنتی‌بادی تولیدی با هیچ کدام از داروهای لیست شده در جدول ۳-۴ دیده نشد.

پس از تهیه آنتی‌ژن و آنتی‌بادی مناسب، مرحله بعد طراحی نوار سنجش سریع با cut off مناسب می‌باشد. در این مرحله ابتدا باید آنتی‌بادی نشان‌دار گردد. همان طور که در فصل اول ذکر شد، نانوذرات طلا معمول‌ترین نشان در این گونه سنجش‌ها محسوب می‌شوند. نانوذرات طلا به کار رفته در این سنجش‌ها دارای رنگ قرمز تیره بوده و با اتصال به آنتی‌بادی سبب می‌شوند که جواب سنجش با چشم غیر مسلح قابل بررسی باشد. همان طور که ذکر شد در تحقیق حاضر نیز از نانوذرات طلا به عنوان نشان استفاده شد. آنتی‌بادی نشاندار در ناحیه پد کنژوگه (متصل به پد نمونه) قرار گرفت و آنتی‌ژن تهیه شده در ناحیه خط تست روی غشاء نیتروسلولز قرار داده شد و از پروتئین A به عنوان خط کنترل استفاده شد. در نهایت سنجش ایمنوکروماتوگرافی با cut off برابر ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر برای شناسایی مت‌امفتامین در بزاق طراحی شد. برای تعیین اختصاصیت و حساسیت سنجش طراحی شده، ۲۵ نمونه بزاق منفی (فاقد مت‌امفتامین) و ۲۵ نمونه مثبت (که میزان ۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر مت‌امفتامین در آن حل شد) استفاده گردید. با استفاده از نتایج حاصل از این آزمایش حساسیت سنجش طراحی شده برابر ۹۲٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ با صحت ۹۶٪ محاسبه شد که مقایسه با سنجش‌های مشابه مقدار قابل قبولی می‌باشد [۷۶].

۴-۲. نتیجه‌گیری

از آنجا که مصرف مت‌امفتامین منجر به رفتار پرخطری در فرد مصرف کننده می‌شود، به شدت امنیت و سلامت اجتماعی را به مخاطره می‌اندازد. از این رو طراحی سنجشی که قادر باشد در هر مکانی (مانند جاده‌ها) مت‌امفتامین در زمانیکه فرد تحت تاثیر مصرف آن می‌باشد، در یک نمونه سهل الوصول زیستی(مانند بزاق) شناسایی کند، موجب کاهش عواقب فاجعه بار مصرف مت‌امفتامین می-گردد.

از این رو در تحقیق حاضر اقدام به طراحی سنجش درمکان (ایمنوکروماتوگرافی) برای شناسایی مت‌امفتامین در نمونه بزاق انسانی شد و با سنتز ایمنوژن مت‌امفتامین (مت‌امفتامین متصل به آلبومین سرم گاوی) و تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر علیه آن، سنجش ایمنوکروماتوگرافی به روش رقابتی را با cut off برابر ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر بزاق که cut off مناسب برای سنجش مت‌امفتامین در بزاق می‌باشد، طراحی شد.

۴-۵. پیشنهادها

برای افزایش اختصاصیت سنجش از آنتی‌بادی منوکلونال بر علیه مت‌امفتامین استفاده شود.

فهرست منابع

فهرست منابع

1. Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. Nature reviews neuroscience. 2001;2(2):119-28.

2.احمدعلی ن. اعتیاد از دیدگاه روانپزشکی جامعه نگر. روانپزشکی و روانشناسی بالینی ایران ۱۳۸۹.

3. Zarghami M. Methamphetamine has changed the profile of patients utilizing psychiatric emergency services in Iran. Iranian Journal of Psychiatry and Behavioral Sciences. 2011;5(1):1-5.

4. کرمی م, اعتمادیفرد س. ساخت اجتماعی اعتیاد در ایران. فصلنامه بررسی مسائل اجتماعی ایران. ۱;۲۰۱۱.

5. Stoehr JD. The neurobiology of addiction: Infobase Publishing; 2005.

6. Broussard L. Interpretation of amphetamines screening and confirmation testing. Handbook of Drug Monitoring Methods: Springer; 2008. p. 379-93.

7. Cruickshank CC, Dyer KR. A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. Addiction. 2009;104(7):1085-99.

8. Rothman RB, Baumann MH, Dersch CM, Romero DV, Rice KC, Carroll FI, et al. Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. Synapse. 2001;39(1):32-41.

9. Anglin MD, Burke C, Perrochet B, Stamper E, Dawud-Noursi S. History of the methamphetamine problem. Journal of psychoactive drugs. 2000;32(2):137-41.

10. Seymour RB, Chambers T. History of the Methamphetamine Problem. Journal of Psychoactive Drugs. 2000;32(2):137-41.

11. Vearrier D, Greenberg MI, Miller SN, Okaneku JT, Haggerty DA. Methamphetamine: history, pathophysiology, adverse health effects, current trends, and hazards associated with the clandestine manufacture of methamphetamine. Disease-a-Month. 2012;58(2):38-89.

12. Drugs UNOO. World drug report 2010: United Nations Publications; 2010.

13. Krasnova IN, Cadet JL. Methamphetamine toxicity and messengers of death. Brain Research Reviews. 2009;60(2):379-407.

14. Kaye S, McKetin R, Duflou J, Darke S. Methamphetamine and cardiovascular pathology: a review of the evidence. Addiction. 2007;102(8):1204-11.

15. Little BB, Snell LM, Gilstrap III LC. Methamphetamine abuse during pregnancy: outcome and fetal effects. Obstetrics & Gynecology. 1988;72(4):541-4.

16. Meng Y, Dukat M, Troy Bridgen D, Martin BR, Lichtman AH. Pharmacological effects of methamphetamine and other stimulants via inhalation exposure. Drug and Alcohol Dependence. 1999;53(2):111-20.

17. Caldwell J, Dring L, Williams R. Metabolism of [< sup> 14</sup> C] methamphetamine in man, the guinea pig and the rat. Biochem J. 1972;129:11-22.

18. Volkow ND, Fowler JS, Wang G-J, Shumay E, Telang F, Thanos PK, et al. Distribution and pharmacokinetics of methamphetamine in the human body: clinical implications. PLoS One. 2010;5(12):e15269.

19. Schepers RJ, Oyler JM, Joseph RE, Cone EJ, Moolchan ET, Huestis MA. Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers. Clinical chemistry. 2003;49(1):121-32.

20. Gamaleya NB. Antibodies to drugs as indicators of chronic drug use. An alternative to toxicological hair analysis. Forensic science international. 1993;63(1):285-93.

21. Javois LC. Immunocytochemical: Methods and Protocols: Springer; 1999.

22. Ojanperä I, Ojansivu R-L, Nokua J, Vuori E. Comprehensive TLC drug screening in forensic toxicology: comparison of findings in urine and liver. JPC Journal of planar chromatography, modern TLC. 1999;12(1):38-41.

23. Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S, Krogh M, Grefslie Ugland H, Grønhaug T. Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 2000;873(1):3-11.

24. Lee M-R, Song Y-S, Hwang B-H, Chou C-C. Determination of amphetamine and methamphetamine in serum via headspace derivatization solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 2000;896(1):265-73.

25. Gan BK, Baugh D, Liu R, Walia A. Simultaneous analysis of amphetamine, methamphetamine, and 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in urine samples by solid-phase extraction, derivatization, and gas chromatography/mass spectrometry. Journal of forensic sciences. 1991;36(5):1331-41.

26. Foster BS, Gilbert DD, Hutchaleelaha A, Mayersohn M. Enantiomeric determination of amphetamine and methamphetamine in urine by precolumn derivatization with Marfey's reagent and HPLC. Journal of analytical toxicology. 1998;22(4):265-9.

27. Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. Obesity research. 1996;4(6):583-600.

28. Van Weemen B, Schuurs A. Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. FEBS letters. 1971;15(3):232-6.

29. Voller A, Bidwell D, Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: Theory and practice*. Bulletin of the World Health Organization. 1976;53(1):55.

30. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. The Journal of Immunology. 1972;109(1):129-35.

31. Erlanger BF. Principles and methods for the preparation of drug protein conjugates for immunological studies. Pharmacological Reviews. 1973;25(2):271-80.

32. Goodman JW. Immunogenicity and antigenic specificity. Basic Human Immunology(DP Stites and AI Terr, eds) pp. 1991:101-8.

33. Dib S, Freire M, Miranda W, Russo E. Detection of insulin antibodies by radioassay and ELISA: interrelation and correlation with metabolic control in type I diabetes. Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica[et al]. 1994;27(5):1167-80.

34. Cheng L, Kim S, Chung A, Castro A. Amphetamines: new radioimmunoassay. FEBS letters. 1973;36(3):339-42.

35. Borque L, Rus A, Maside C, Del Cura J. Automated latex nephelometric immunoassay of theophylline in human serum. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1992;30(5):307-9.

36. Porstmann T, Kiessig S. Enzyme immunoassay techniques an overview. Journal of immunological methods. 1992;150(1):5-21.

37. Black DL, Goldberger B, Caplan Y. Enzyme immunoassay method for comprehensive drug screening in micro-samples of urine. Clinical chemistry. 1987;33(3):367-71.

38. Butler J, Feldbush T, McGivern P, Stewart N. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): A measure of antibody concentration or affinity? Immunochemistry. 1978;15(2):131-6.

39. Takayama N, Iio R, Tanaka S, Chinaka S, Hayakawa K. Analysis of methamphetamine and its metabolites in hair. Biomedical Chromatography. 2003;17(2-3):74-82.

40. Aoki K, Kuroiwa Y. A screening method for urinary methamphetamine-latex agglutination inhibition reaction test. Forensic science international. 1985;27(1):49-56.

41. Niwaguchi T, Inoue T, Kishi T, Kanda Y, Niwase T, Nakadate T, et al. Hemagglutination-inhibition test for methamphetamine excreted in human urine. Journal of forensic sciences. 1979;24(2):319-22.

42. Dasgupta A, Saldana S, Kinnaman G, Smith M, Johansen K. Analytical performance evaluation of EMIT II monoclonal amphetamine/methamphetamine assay: more specificity than EMIT dau monoclonal amphetamine/methamphetamine assay. Clinical Chemistry. 1993;39(1):104-8.

43. Kupiec T, DeCicco L, Spiehler V, Sneed G, Kemp P. Choice of an ELISA assay for screening postmortem blood for amphetamine and/or methamphetamine. Journal of analytical toxicology. 2002;26(7):513-8.

44. Choi J, Choi MJ, Kim C, Cho YS, Chin J, Jo Y-A. The optimization of ELISA for methamphetamine determination: the effect of immunogen, tracer and antibody purification method on the sensitivity. Archives of pharmacal research. 1997;20(1):46-52.

45. Laloup M, Tilman G, Maes V, Boeck GD, Wallemacq P, Ramaekers J, et al. Validation of an ELISA-based screening assay for the detection of amphetamine, MDMA and MDA in blood and oral fluid. Forensic science international. 2005;153(1):29-37.

46. Weller MG. Immunochromatographic techniques–a critical review. Fresenius' journal of analytical chemistry. 2000;366(6-7):635-45.

47. Conroy PJ, Hearty S, Leonard P, O'Kennedy RJ, editors. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. Seminars in cell & developmental biology; 2009: Elsevier.

48. Kusnezow W, Hoheisel JD. Solid supports for microarray immunoassays. Journal of Molecular Recognition. 2003;16(4):165-76.

49. Tonkinson JL, Stillman BA. Nitrocellulose: a tried and true polymer finds utility as a post-genomic substrate. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library. 2002;7:c1-12.

50. Joos TO, Schrenk M, Höpfl P, Kröger K, Chowdhury U, Stoll D, et al. A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. Electrophoresis. 2000;21(13):2641-50.

51. Strips RLFT. Considerations for Product Development. Bedford, MA: Millipore Corporation. 2001.

52. Sharma V, Park K, Srinivasarao M. Colloidal dispersion of gold nanorods: Historical background, optical properties, seed-mediated synthesis, shape separation and self-assembly. Materials Science and Engineering: R: Reports. 2009;65(1):1-38.

53. Burda C, Chen X, Narayanan R, El-Sayed MA. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. Chemical reviews. 2005;105(4):1025-102.

54. Daniel M-C, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. Chemical reviews. 2004;104(1):293-346.

55. Shevchenko EV, Talapin DV, Schnablegger H, Kornowski A, Festin Ö, Svedlindh P, et al. Study of nucleation and growth in the organometallic synthesis of magnetic alloy nanocrystals: the role of nucleation rate in size control of CoPt3 nanocrystals. Journal of the American Chemical Society. 2003;125(30):9090-101.

56. Kunkely H, Vogler A. Dismutation of catalyzed by colloidal gold. Inorganica chimica acta. 2005;358(2):429-30.

57. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. Analytical and bioanalytical chemistry. 2009;393(2):569-82.

58. Barrett C, Good C, Moore C. Comparison of point-of-collection screening of drugs of abuse in oral fluid with a laboratory-based urine screen. Forensic science international. 2001;122(2):163-6.

59. Ivanovic J. Oral Fluid Testing for Driving Under the Influence of Drugs. 2012.

60. Aps JK, Martens LC. Review: the physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. Forensic Science International. 2005;150(2):119-31.

61. Engblom C, Gunnar T, Rantanen A, Lillsunde P. Driving under the influence of drugs-amphetamine concentrations in oral fluid and whole blood samples. Journal of analytical toxicology. 2007;31(5):276-80.

62. Cone EJ. Oral fluid testing: new technology enables drug testing without embarrassment. CDA J. 2006;34(4):311-5.

63. Samyn N, Van Haeren C. On-site testing of saliva and sweat with Drugwipe and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users. International journal of legal medicine. 2000;113(3):150-4.

64. Duryee MJ, Bevins RA, Reichel CM, Murray JE, Dong Y, Thiele GM, et al. Immune responses to methamphetamine by active immunization with peptide-based, molecular adjuvant-containing vaccines. Vaccine. 2009;27(22):2981-8.

65. Petrie MS, Lynch KL, Wu AH, Steinhardt AA, Horowitz GL. Prescription compliance or illicit designer drug abuse? Clinical chemistry. 2012;58(12):1631-4.

66. Mehrjerdi ZA. Crystal in Iran: methamphetamine or heroin kerack. Daru. 2013;15:21-2.

67. Homer BD, Solomon TM, Moeller RW, Mascia A, DeRaleau L, Halkitis PN. Methamphetamine abuse and impairment of social functioning: a review of the underlying neurophysiological causes and behavioral implications. Psychological bulletin. 2008;134(2):301.

68. Kwong TC. Introduction to drugs of abuse testing. Handbook of Drug Monitoring Methods: Springer; 2008. p. 297-315.

69. Caplan YH, Goldberger BA. Alternative specimens for workplace drug testing. Journal of analytical toxicology. 2001;25(5):396-9.

70. Huestis MA, Cone EJ. Methamphetamine disposition in oral fluid, plasma, and urine. Annals of the New York Academy of Sciences. 2007;1098(1):104-21.

71. Hsu J, Liu C, Hsu C, Tsay W-I, Li J-H, Lin D-L, et al. Performance characteristics of selected immunoassays for preliminary test of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine, and related drugs in urine specimens. Journal of analytical toxicology. 2003;27(7):471-8.

72. Harrison W, Gray R, Solomon L. Incorporation of D-amphetamine into pigmented guinea-pig hair. British Journal of Dermatology. 1974;91(4):415-8.

73. Polettini A, Cone EJ, Gorelick DA, Huestis MA. Incorporation of methamphetamine and amphetamine in human hair following controlled oral methamphetamine administration. Analytica chimica acta. 2012;726:35-43.

74. Garg U. Hair, oral fluid, sweat, and meconium testing for drugs of abuse. Handbook of Drug Monitoring Methods: Springer; 2008. p. 337-64.

75. Barnes AJ, Smith ML, Kacinko SL, Schwilke EW, Cone EJ, Moolchan ET, et al. Excretion of methamphetamine and amphetamine in human sweat following controlled oral methamphetamine administration. Clinical chemistry. 2008;54(1):172-80.

76. Wilson L, Jehanli A, Hand C, Cooper G, Smith R. Evaluation of a rapid oral fluid point-of-care test for MDMA. Journal of analytical toxicology. 2007;31(2):98-104.

77. Walsh JM, Flegel R, Crouch DJ, Cangianelli L, Baudys J. An evaluation of rapid point-of-collection oral fluid drug-testing devices. Journal of analytical toxicology. 2003;27(7):429-39.

78. Usagawa T, Nishimura M, Uda T, Nakahara Y. Preparation of monoclonal antibodies against methamphetamine. Journal of immunological methods. 1989;119(1):111-5.

79. Chappey ON, Sandouk P, Scherrmann J-MG. Monoclonal antibodies in hapten immunoassays. Pharmaceutical research. 1992;9(11):1375-9.

80. Stout PR, Klette KL, Horn CK. Evaluation of ephedrine, pseudoephedrine and phenylpropanolamine concentrations in human urine samples and a comparison of the specificity of DRI amphetamines and Abuscreen online (KIMS) amphetamines screening immunoassays. Journal of forensic sciences. 2004;49(1):160-4.

81. Weintraub D, Linder MW. Amphetamine positive toxicology screen secondary to bupropion. Depression and anxiety. 2000;12(1):53-4.

82. Melanson SE, Lee-Lewandrowski E, Griggs DA, Long WH, Flood JG. Reduced interference by phenothiazines in amphetamine drug of abuse immunoassays. Archives of pathology & laboratory medicine. 2006;130(12):1834-8.

83. Roberge RJ, Luellen JR, Reed S. False-positive amphetamine screen following a trazodone overdose. Clinical Toxicology. 2001;39(2):181-2.

84. Merigian KS, Browning R, Kellerman A. Doxepin causing false-positive urine test for amphetamine. Annals of emergency medicine. 1993;22(8):1370.

85. Merigian KS, Browning RG. Desipramine and amantadine causing false-positive urine test for amphetamine. Annals of emergency medicine. 1993;22(12):1927-8.

ضمائم

ضمیمه الف

Abstract:

Background: Methamphetamine is a psycho-stimulant and one of the main drugs around the world. In recent decades, industrial production and abuse of methamphetamine has increased dramatically, and this has led to a threat in world health and welfare. In order to reduce the growing methamphetamine abuse and its devastating effects on the community, effective methods for detecting methamphetamine abusers are required. Due to the simplicity, sensitivity, and the availability of suitable locations where immune-assays can be done, they are used for screening of biological samples for drug abuse detection. In this study an Immunochromatographic assay was designed to detect methamphetamine in human saliva samples.

Material and Methods: In order to make the antigen which is used in the assay the carboxylate derivative of methamphetamine was synthesized and with carbodiimide-method, it has been conjugated with BSA. The synthesized antigen was injected to two rabbits in 11 innings to produce the polyclonal antibody. The produced antibody was investigated by ELISA method and after purification was conjugated with (attached to) gold nanoparticles. By the immobilization of produced antigen at the test line on the nitrocellulose membrane and placing the gold labeled antibody in the sample pad position, immunochromatographic assay for methamphetamine detection in the saliva was designed.

Discussion and conclusion: Data obtained from IR spectroscopy spectrums confirmed the synthesis of carboxylate derivative of methamphetamine. UV spectrophotometry spectrums in 278 nm showed the formation of BSA-METH conjugate. The ELISA data indicated the production of polyclonal antibodies against methamphetamine. Using antigen and produced antibody, the immunochromatographic assay for identification of methamphetamin in saliva sample with 50 ng/ml cut off, which is a suitable cut off for detecting methamphetamin in the saliva, was designed.

Keywords: Methamphetamine, Immune assays, Immunochromatographic assays

T.M.U.

Title

Development of immunochromatographic assay for detection of amphetamine in human saliva sample

A Thesis

Presented for the

Degree of Master of Sciences

In Cilinical Biochemistry

By: Nazanin Vaziritabar

Supervisor: Dr. Mohamad Javad Rasaee

Tarbiat Modares University
Faculty of Medical Sciences

2014