



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012157896/15, 27.12.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.12.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.12.2012

(45) Опубликовано: 20.04.2014 Бюл. № 11

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: ПЕТУШОК Н.Э. Глутатионовая система при воздействии фенола, формальдегида и гамма-излучения. Возможности коррекции витаминами А, Е и пантенолом // Автореферат диссертации, 2000. RU 2419795 C1, 27.05.2011. RU 2106636 C1, 10.03.1998. Гаврилова А.Д., Хмара Н.Р. Определение активности глутатионпероксидазы эритроцитов при насыщающих концентрациях (см. прод.)

Адрес для переписки:

614045, г.Пермь, ул. Орджоникидзе, 82, ФБУН "ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения", директору Н.В. Зайцевой

(72) Автор(ы):

ЗАЙЦЕВА Нина Владимировна (RU),
ЗЕМЛЯНОВА Марина Александровна (RU),
КОЛЬДИБЕКОВА Юлия Вячеславовна (RU),
ЗВЕЗДИН Василий Николаевич (RU),
МИХАЙЛОВА Дарья Леонидовна (RU),
АКАФЬЕВА Татьяна Игоревна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки "Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения" (ФГБУН "ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения") (RU)

(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ НЕГАТИВНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ФОРМАЛЬДЕГИДА, ПОСТУПАЮЩЕГО С АТМОСФЕРНЫМ ВОЗДУХОМ, НА НАРУШЕНИЕ КОНЬЮГАЦИОННОЙ И ЭЛИМИНАЦИОННОЙ ФУНКЦИИ ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к способам лабораторной диагностики негативного воздействия формальдегида на нарушение конъюгационной и элиминационной функций глутатионовой системы у детей, проживающих на территории, характеризующейся повышенным содержанием данного соединения в атмосферном воздухе. Способ заключается в следующем: производят отбор пробы крови у детей, определяют в цельной крови содержание формальдегида, а также определяют в сыворотке крови активность следующих лабораторных показателей: глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы

и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Затем устанавливают корреляционную зависимость между содержанием формальдегида в крови и указанными лабораторными показателями. При одновременном установлении достоверных зависимостей: повышенное содержание формальдегида - пониженная активность глутатионпероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и повышенная активность глутатион-S-трансферазы - судят о негативном воздействии формальдегида на осуществление конъюгационной и элиминационной функций глутатионовой системы детского организма. Способ обеспечивает возможность на ранней

стадии прогнозировать нарушение глутатионовой системы. 1 табл., 1 пр.
конъюгационной и элиминационной функции

(56) (продолжение):

субстрата. Лаб. дело, - 1986. - N 12. - с. 721-724. Сравнительный анализ активности супероксиддисмутазы и каталазы эритроцитов и цельной крови у новорожденных детей при хронической гипоксии / Е.Е. Дубинина, Л.Ф. Ефимова, Л.Н. Софронова, А.Л. Геронимус // Лаб. дело. - 1988. - N 8. - С. 46-49

R U 2 5 1 3 5 0 8 C 1

R U 2 5 1 3 5 0 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2012157896/15, 27.12.2012

(24) Effective date for property rights:
27.12.2012

Priority:

(22) Date of filing: 27.12.2012

(45) Date of publication: 20.04.2014 Bull. № 11

Mail address:

614045, g.Perm', ul. Ordzhonikidze, 82, FBUN
"FNTs mediko-profilakticheskikh tekhnologij
upravlenija riskami zdorov'ju naselenija", direktoru
N.V. Zajtsevoj

(72) Inventor(s):

ZAJTseVA Nina Vladimirovna (RU),
ZEMLJaNOVA Marina Aleksandrovna (RU),
KOL'DIBEKOVA Julija Vjacheslavovna (RU),
ZVEZDIN Vasilij Nikolaevich (RU),
MIKHAJLOVA Dar'ja Leonidovna (RU),
AKAF'EVA Tat'jana Igorevna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe bjudzhetnoe uchrezhdenie nauki
"Federal'nyj nauchnyj tsentr mediko-
profilakticheskikh tekhnologij upravlenija
riskami zdorov'ju naselenija" (FGBUN "FNTs
mediko-profilakticheskikh tekhnologij
upravlenija riskami zdorov'ju naselenija") (RU)

(54) **METHOD FOR ASSESSING NEGATIVE IMPACT OF ATMOSPHERIC FORMALDEHYDE ON CONJUGATION AND ELIMINATION DYSFUNCTION OF GLUTATHIONE SYSTEM IN CHILDREN**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to laboratory diagnostic techniques for a negative impact of formaldehyde on the conjugation and elimination dysfunction of the glutathione system in children living on the territory with the high content of this compound in the atmospheric air. The technique implies as follows: blood is sampled from the children to determine whole blood formaldehyde and to determine a serum activity of the following laboratory parameters: glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase and glucoso-6-phosphate dehydrogenase. The blood formaldehyde value and the

above laboratory values are correlated. If the following certain dependences are simultaneously provided: high formaldehyde - low glutathione peroxidase, glucoso-6-phosphate dehydrogenase activities and high glutathione-S-transferase activity, the negative impact of formaldehyde on the conjugation and elimination dysfunction of the glutathione system of a child's body.

EFFECT: enabled early prediction of the conjugation and elimination dysfunction of the glutathione system.

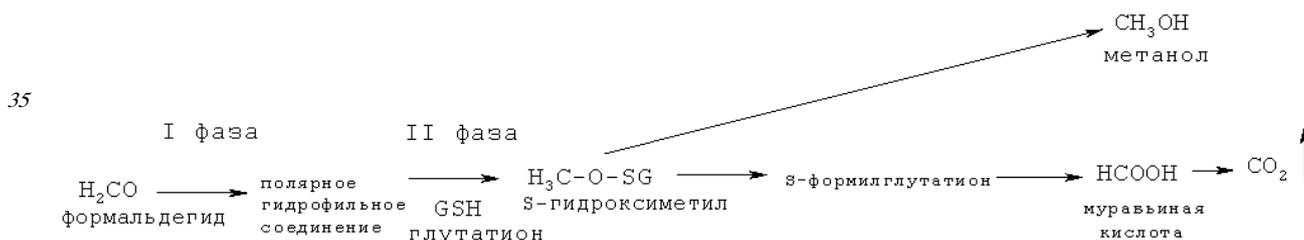
1 tbl, 1 ex

Изобретение относится к области медицины, в частности к способам лабораторной диагностики негативного воздействия формальдегида на нарушение конъюгационной и элиминационной функций глутатионовой системы у детей, проживающих на территории, характеризующейся повышенным содержанием данного соединения в атмосферном воздухе. Предлагаемый способ может быть использован для ранней диагностики нарушения конъюгационной и элиминационной функций глутатионовой системы у детей, ассоциированной с внешнесредовой экспозицией формальдегида, и для повышения эффективности комплекса профилактических мероприятий, направленных на восстановление функции глутатионовой системы, обеспечивающей конъюгацию, связывание и выведение конечных метаболитов из организма.

Формальдегид относится к наиболее распространенным химическим продуктам, поступающим в атмосферный воздух с выбросами предприятий химической, деревообрабатывающей, целлюлозно-бумажной промышленности, органического синтеза. По степени опасности воздействия на организм формальдегид относится к высоко опасным химическим веществам (2 класс опасности). При внешнесредовой экспозиции формальдегида возникают негативные эффекты:

- угнетение тканевого дыхания в результате нарушения окислительного фосфорилирования, следствием чего является торможение анаэробного гликолиза и развитие недостатка АТФ;
- подавление активности SH-энзимов;
- угнетение синтеза нуклеиновых кислот;
- нарушение обмена аскорбиновой кислоты;
- нарушение антигенной стимуляции иммунной системы.

Основным путем поступления формальдегида в организм является ингаляционный. Формальдегид через легкие поступает в кровоток и распределяется по организму, преимущественно, аккумулируясь в костном мозге. До 40% формальдегида выделяется из организма с выдыхаемым воздухом, почками, но большая его часть подвергается биотрансформации, которая осуществляется, в основном, в печени. В процессе биотрансформации происходит окисление формальдегида через промежуточные продукты S-гидроксиметил и S-формилглутатион, с образованием конечных метаболитов - метанола и муравьиной кислоты. Схематическое изображение биотрансформации формальдегида представлено ниже.



40

Всю последовательность реакции биотрансформации формальдегида можно разделить на две основные фазы:

- первая фаза биотрансформации - химическая модификация формальдегида, связанная с приданием токсическому соединению гидрофильных свойств, которые облегчают его экскрецию из организма. К ферментам первой фазы биотрансформации относят цитохромы P-450, флавинодержущие монооксигеназы, эстеразы и др., которые участвуют в реакциях окисления и восстановления молекул;
- вторая фаза биотрансформации - ковалентная конъюгация, ведущая к образованию транспортных форм токсичных соединений и способствующая их выведению из организма. К ферментам второй фазы биотрансформации относят

глутатионпероксидазу, защищающую от окислительного повреждения восстановленный глутатион, необходимый в эндогенном связывании промежуточного метаболита; глутатион-S-трансферазу, катализирующую присоединение глутатиона к эндогенно образованному промежуточному метаболиту; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, обеспечивающую поддержание уровня восстановленного глутатиона.

Ферменты глутатионовой системы являются одними из основных составляющих, обеспечивающих связывание и выведение промежуточных и конечных метаболитов при биотрансформации формальдегида.

Конъюгация - реакция синтеза чужеродного вещества с эндогенными молекулами или их группировками (аминокислоты, глюкуроновая или серная кислоты и др.), в результате чего образуются конъюгаты - более полярные, гидрофильные соединения, легко выводимые из организма.

Элиминация - удаление чужеродного вещества из организма, состоящее из двух процессов: нейтрализации путем биотрансформации и собственно экскреции.

Качественные или количественные изменения конъюгационной и элиминационной функций глутатионовой системы неизменно ведут к нарушению процесса метаболизма и, как следствие, к накоплению формальдегида в организме.

В связи с этим, исследование и оценка конъюгационной и элиминационной функции глутатионовой системы являются актуальными для расширения доказательной базы причинно-следственных связей в системе «среда - здоровье населения», ранней диагностики и профилактики нарушения процессов метаболизма у детей, как наиболее восприимчивой субпопуляции к хроническому внешнесредовому воздействию химических факторов вследствие онтогенетического несовершенства организма в данный возрастной период.

Известно исследование состояния глутатионовой системы при воздействии фенола, формальдегида и гамма-излучения (диссертация «Глутатионовая система при воздействии фенола, формальдегида и гамма-излучения. Возможности коррекции витаминами А, Е и пантенолом», автор Петушок Н.Э., специальность ВАК 03.00.04 - Биохимия, <http://www.referun.com/n/glutationovaya-sistema-pri-vozdeystvii-fenola-formaldegida-i-gamma-izlucheniya-vozmozhnosti-korreksii-vitaminami-a-e-i-p>). Данная диссертация касается изучения функции глутатионовой системы при воздействии фенола и формальдегида у крыс.

Однако в указанном источнике информации не затрагиваются моменты изучения конъюгационной и элиминационной функций глутатионовой системы, нарушение которой может привести к токсическому действию формальдегида на детский организм, на развитие метаболических изменений, а также не обеспечивает установление причинно-следственных связей нарушения функций глутатионовой системы при воздействии формальдегида, поступающего с атмосферным воздухом.

Технический результат, достигаемый предлагаемым изобретением, заключается в обеспечении возможности на ранней стадии, еще до проявления клинических признаков, прогнозировать нарушение конъюгационной и элиминационной функции глутатионовой системы, обеспечивающей связывание и выведение конечных метаболитов при биотрансформации формальдегида, поступившего в детский организм с атмосферным воздухом.

Указанный технический результат достигается предлагаемым способом оценки негативного воздействия формальдегида, поступающего с атмосферным воздухом, на нарушение конъюгационной и элиминационной функции глутатионовой системы у детей, характеризующимся тем, что производят отбор пробы крови, определяют в

цельной крови содержание формальдегида, поступающего с атмосферным воздухом, а также определяют в сыворотке крови активность следующих лабораторных показателей: глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, далее устанавливают корреляционную зависимость между содержанием формальдегида и указанными лабораторными показателями, и при одновременном установлении достоверных зависимостей: повышенное содержание формальдегида - пониженная активность глутатионпероксидазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и повышенная активность глутатион-S-трансферазы, судят о негативном воздействии формальдегида на осуществление конъюгационной и элиминационной функции глутатионовой системы детского организма.

Технический результат, достигаемый заявляемым техническим решением, обеспечивается за счет следующего.

Благодаря тому что при реализации предлагаемого способа используются лабораторные показатели конъюгационной и элиминационной функций процессов, повышается информативность способа и его достоверность.

Основным ферментом глутатионовой системы, отвечающим за конъюгацию и элиминацию конечных метаболитов, является глутатион-S-трансфераза. Данный фермент способствует присоединению к субстрату молекулы глутатиона для перевода промежуточных метаболитов в транспортные формы, легко выводимые из организма.

Глутатионпероксидаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа - ферменты глутатионовой системы, необходимые для нормального функционирования глутатиона.

Таким образом, ферменты глутатионовой системы значительно ускоряют процесс конъюгирования метаболита токсиканта и последующую его элиминацию из организма.

Благодаря тому, что в предлагаемом способе в качестве лабораторных характеристик используют показатели, отражающие работу глутатионовой системы с использованием корреляционного анализа, обеспечивается информационная связь активности ферментов с содержанием формальдегида в крови, что делает способ более информативным и достоверным.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет на ранней стадии, еще до проявления клинических признаков, прогнозировать нарушение конъюгационной и элиминационной функций глутатионовой системы с последующим изменением процессов метаболизма у детей.

Все это позволит повысить эффективность профилактических мероприятий по предупреждению и устранению негативного хронического аэротехногенного воздействия формальдегида, обуславливающего нарушение конъюгационной и элиминационной функции глутатионовой системы у детей.

Предлагаемый способ осуществляют следующим образом, реализуя его на конкретном примере:

- выбирают экологически неблагополучную модельную территорию (п.Гамово, п.Кондратово Пермского района), характеризующуюся повышенным содержанием формальдегида в атмосферном воздухе;

- отбирают случайным образом группу детей (группа наблюдения), проживающих на этой территории. Было отобрано 87 детей в возрасте 3-6 лет из дошкольных организованных коллективов, проживающих на исследуемой территории. В обследовании принимали участие дети, прошедшие утренний фильтр, следовательно, без клинических проявлений заболеваний;

- для проведения сравнительного анализа обследована группа детей в количестве 72 человек аналогичного возраста, проживающих в условиях отсутствия экспозиции

формальдегида (группа сравнения);

- у детей из указанных групп проводят отбор венозной цельной крови в две пробирки. Одну пробирку используют для определения содержания формальдегида в цельной крови. Вторую пробирку - для получения сыворотки крови;

5 - в цельной крови определяют содержание формальдегида, например, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии согласно Методическим указаниям МУК 4.1.2111-06 «Измерение массовой концентрации формальдегида, ацетальдегида, пропионового альдегида, масляного альдегида и ацетона в пробах крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии» (утв. руководителем Федеральной
10 службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г.Онищенко от 9 августа 2006 г.);

- в сыворотке крови традиционными методами определяют лабораторные показатели: активность глутатион-S-трансферазы, глутатионпероксидазы, глюкозо-6-
15 фосфатдегидрогеназы;

- затем проводят анализ причинно-следственных связей между воздействием формальдегида и ответной реакцией организма, характеризующей нарушение конъюгационной и элиминационной функции глутатионовой системы, с использованием модели логистической регрессии, согласно которой рассчитывают вероятность
20 негативного изменения маркера ответа организма (вышеуказанные лабораторные показатели) при воздействии на организм маркера экспозиции (формальдегида, поступающего с атмосферным воздухом). Проверка статистических гипотез относительно полученных корреляционных зависимостей проводится с использованием критерия Стьюдента. Различия считают статистически значимыми при вероятности
25 $p < 0,05$.

Химико-аналитическое исследование крови у детей группы наблюдения показало, что средняя концентрация формальдегида составила $0,0102 \pm 0,001$ мг/дм³, что в 2 раза превысило аналогичный показатель у детей в группе сравнения ($p = 0,000$). При этом в
30 группе наблюдения установлено до 50% случаев с повышенным содержанием формальдегида в крови.

Изучение и оценка состояния функций глутатионовой системы у детей, проживающих в условиях экспозиции формальдегида, показали разнонаправленный характер изменения активности ферментов. Так, у детей группы наблюдения установлено снижение
35 активности глутатионпероксидазы ($25,9 \pm 1,88$ нг/см³) в сыворотке крови в 1,2-2 раза относительно физиологической нормы и группы сравнения соответственно ($p = 0,003 - 0,049$). Несмотря на то, что среднее значение активности глюкозо-6-
фосфатдегидрогеназы ($3,01 \pm 0,19$ Е/дм³) установлено в пределах физиологической нормы, при этом зафиксировано достоверное снижение в 1,4 раза значение данного
40 показателя относительно активности фермента в группе сравнения ($p = 0,032$). Частота регистрации проб с отклонением активности ферментов глутатионпероксидазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, обеспечивающих защиту эндогенной молекулы восстановленного глутатиона от окислительного повреждения, от физиологической нормы у детей в группе наблюдения составила соответственно 68% и 10% случаев, что
45 практически в 10 раз превысило результаты исследований данных показателей у детей группы сравнения.

Несмотря на то, что среднее значение активности глутатион-S-трансферазы ($206,2 \pm 16,92$ нг/см³) в сыворотке крови детей группы наблюдения установлено в пределах

физиологической нормы, при этом зарегистрировано достоверное повышение аналогичного показателя в 1,4 раза относительно активности данного фермента у детей вне экспозиции формальдегида. У детей в группе наблюдения зарегистрировано до 15% случаев превышения активности фермента глутатион-S-трансферазы, катализирующей присоединение глутатиона к эндогенно образованным метаболитам, при отсутствии таковых в группе сравнения.

Таким образом, результаты выполненных исследований позволили установить снижение активности ферментов, обеспечивающих поддержание восстановленного глутатиона и повышение активности фермента, необходимого для связывания образующихся метаболитов.

У детей группы наблюдения установлена достоверная зависимость вероятности изменения активности ферментов глутатионовой системы при повышенном содержании формальдегида в крови. Данные приведены в таблице.

Таблица Результаты математического моделирования причинно-следственных связей «формальдегид в крови - показатель глутатионовой системы» для детей группы наблюдения				
Вещество в крови	Показатель глутатионовой системы	Коэффициент детерминации (R^2)	Критерий Фишера (F)	Достоверность различий (p)
Формальдегид	Снижение активности глутатионпероксидазы	0,21	6,13	0,007
	Снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	0,25	12,39	0,014
	Повышение активности глутатион-S-трансферазы	0,16	10,87	0,032

Данные, приведенные в таблице 1, показывают, что установлена обратная зависимость снижения активности глутатионпероксидазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при повышенном содержании в крови формальдегида ($R^2=0,21-0,25$; $6,13 \leq F \leq 12,39$; $p=0,007-0,014$). Полученные результаты свидетельствуют, что при избыточном содержании формальдегида в организме возможно окислительное повреждение глутатиона, необходимого при эндогенном связывании и выведении конечных метаболитов. При этом установлена прямая причинно-следственная связь вероятности увеличения активности глутатион-S-трансферазы с повышенным содержанием в крови формальдегида (долевой вклад химического фактора составил 16%; $p=0,032$). Подобные связи у детей, проживающих в условиях отсутствия внешнесредового аэрогенного поступления формальдегида, не выявлены.

После обследования детей группы наблюдения предлагаемым способом было установлено, что у 37 из 87 детей имеется риск развития экологически обусловленных заболеваний, ассоциированных с токсическим действием формальдегида на организм, т.к. у этих 37 детей установлена достоверная зависимость: превышение в крови концентрации формальдегида при одновременном снижении в крови по сравнению с нормой активности глутатионпероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и повышение активности глутатион-S-трансферазы.

Для доказательства такого вывода, из указанных 37 детей (у которых выявлены одновременно достоверные зависимости: повышенное содержание формальдегида в крови - пониженная активность глутатионпероксидазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы; повышенная активность глутатион-S-трансферазы) через 6 месяцев был проведен анализ заболеваемости. Выполненные исследования показали, что из этих детей у 9 установлен аллергический ринит, у 7 - бронхиальная астма, у остальных - заболевания иммунной системы в виде персистирующего транзиторного иммунодефицита. Согласно токсикологическим свойствам формальдегида, все указанные

болезни обусловлены воздействием его повышенного содержания в крови.

Такому же анализу подверглась заболеваемость 19 детей из этой же группы, у которых в крови было установлено повышенное содержание формальдегида, но без установления (т.е. без подтверждения) корреляционной зависимости между уровнем данного соединения в крови и лабораторными показателями конъюгационной и элиминационной функции глутатионовой системы. Установлено, что у 5 детей установлен аллергический ринит, у 2 детей - бронхиальная астма, у 3 детей - заболевания иммунной системы в виде персистирующего транзиторного иммунодефицита, у 9 детей заболеваний, сопряженных с токсическим действием формальдегида, не установлено.

Анализ заболеваемости 11 детей с уровнем формальдегида в крови ниже предела обнаружения показал, что у 3 детей зарегистрирован аллергический ринит, по 1 случаю бронхиальной астмы, у 1 - персистирующий транзиторный иммунодефицит, у 6 детей заболеваний, сопряженных с токсическим действием формальдегида, не установлено.

Вышеуказанные данные являются доказательством того, что только при наличии предложенной взаимосвязи содержания формальдегида в крови и уровня заявленных лабораторных показателей обеспечивается точность, достоверность и информативность предлагаемого способа, посредством которого можно определить процесс конъюгирования токсиканта и последующую его элиминацию из организма.

Таким образом, использование предлагаемого способа при обследовании детей, проживающих в условиях внешнесредовой экспозиции формальдегида, позволяет:

- обеспечить возможность выявления с высокой точностью на ранней стадии нарушения конъюгационной и элиминационной функции глутатионовой системы при действии формальдегида;

- обеспечить прогноз возникновения и характера течения заболеваний различных нозологий, сопряженных с нарушением конъюгационной и элиминационной функции глутатионовой системы;

- обосновать необходимость углубленного клинического обследования ребенка именно в отношении заболеваний, характерных для повышенного содержания формальдегида в крови.

Формула изобретения

Способ оценки негативного воздействия формальдегида, поступающего с атмосферным воздухом, на нарушение конъюгационной и элиминационной функции глутатионовой системы у детей, характеризующийся тем, что производят отбор пробы крови, определяют в цельной крови содержание формальдегида, поступающего с атмосферным воздухом, а также определяют в сыворотке крови активность следующих лабораторных показателей: глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, далее устанавливают корреляционную зависимость между содержанием формальдегида и указанными лабораторными показателями, и при одновременном установлении достоверных зависимостей: повышенное содержание формальдегида - пониженная активность глутатионпероксидазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и повышенная активность глутатион-S-трансферазы, судят о негативном воздействии формальдегида на осуществление конъюгационной и элиминационной функции глутатионовой системы детского организма.