

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2546524

СПОСОБ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ МЕТАНОЛА НА ИММУННЫЙ СТАТУС РАБОТНИКОВ ХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

Патентообладатель(ли): *Федеральное бюджетное учреждение науки
"Федеральный научный центр медико-профилактических технологий
управления рисками здоровью населения" (ФБУН "ФНЦ медико-
профилактических технологий управления рискам здоровью населения") (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2014111644

Приоритет изобретения **26 марта 2014 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации **03 марта 2015 г.**

Срок действия патента истекает **26 марта 2034 г.**

*Врио руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Л.Л. Кирий



Автор(ы): *Долгих Олег Владимирович (RU), Зайцева Нина Владимировна (RU), Харахорина Регина Атласовна (RU), Лыхина Татьяна Станиславовна (RU), Кривцов Александр Владимирович (RU), Бубнова Ольга Алексеевна (RU), Вдовина Надежда Алексеевна (RU), Дианова Дина Гумяровна (RU), Ланин Дмитрий Владимирович (RU), Тараненко Людмила Андреевна (RU), Горшкова Ксения Геннадьевна (RU), Пирогова Елена Алексеевна (RU), Варанкина Александра Васильевна (RU)*



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21)(22) Заявка: 2014111644/15, 26.03.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.03.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.03.2014

(45) Опубликовано: 10.04.2015 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2180116 C1, 27.02.2002. RU 2092851 C1, 10.10.1997. ЗАБРОДСКИЙ П.Ф. Нарушения иммунного статуса при остром отравлении метанолом и их коррекция // Диссертация, Саратов 2012, [он-лайн], [найдено 22.12. 2014]. Найдено из Интернет:

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Долгих Олег Владимирович (RU),
Зайцева Нина Владимировна (RU),
Харахорина Регина Атласовна (RU),
Лыхина Татьяна Станиславовна (RU),
Кривцов Александр Владимирович (RU),
Бубнова Ольга Алексеевна (RU),
Вдовина Надежда Алексеевна (RU),
Дианова Дина Гумяровна (RU),
Ланин Дмитрий Владимирович (RU),
Тараненко Людмила Андреевна (RU),
Горшкова Ксения Геннадьевна (RU),
Пирогова Елена Алексеевна (RU),
Варанкина Александра Васильевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ МЕТАНОЛА НА ИММУННЫЙ СТАТУС РАБОТНИКОВ ХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

(57) Формула изобретения

Способ оценки влияния метанола на иммунный статус работников химического производства, включающий отбор пробы венозной крови у работников, установление в ней фактического содержания химического токсиканта, определение в пробе лабораторных иммунологических показателей и установление информационного индекса, по которому судят о нарушении иммунного статуса работника от воздействия химического токсиканта, отличающийся тем, что в качестве химического токсиканта принимают метанол, а в качестве лабораторных показателей используют количество внутриклеточных маркеров апоптоза: белка bax и белка bcl2, причем после установления в пробе крови фактического содержания метанола производят его сравнение с величиной фоновой концентрации путем определения коэффициента, равного их соотношению: C1/C2, где C1 - фактическое содержание метанола в крови; C2 - фоновая концентрация метанола, затем рассчитывают критериальный коэффициент, равный соотношению указанных bax/bcl2, далее рассчитывают информационный индекс клеточной гибели

по формуле: $\hat{E} = \frac{b_{ax}}{b_{cl2}} \times \frac{C1}{C2}$, и при значении указанного индекса клеточной гибели

более 6, при одновременном содержании метанола в крови выше его фоновой концентрации, оценивают состояние иммунного статуса работника химического производства от воздействия метанола как иммунодефицитное.

RU 2 5 4 6 5 2 4 C 1



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014111644/15, 26.03.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.03.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.03.2014

(45) Опубликовано: 10.04.2015 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2180116 C1, 27.02.2002. RU 2092851 C1, 10.10.1997. ЗАБРОДСКИЙ П.Ф. Нарушения иммунного статуса при остром отравлении метанолом и их коррекция // Диссертация, Саратов 2012, [он-лайн], [найдено 22.12. 2014]. Найдено из Интернет:

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Долгих Олег Владимирович (RU),
Зайцева Нина Владимировна (RU),
Харахорина Регина Атласовна (RU),
Лыхина Татьяна Станиславовна (RU),
Кривцов Александр Владимирович (RU),
Бубнова Ольга Алексеевна (RU),
Вдовина Надежда Алексеевна (RU),
Дианова Дина Гумяровна (RU),
Ланин Дмитрий Владимирович (RU),
Тараненко Людмила Андреевна (RU),
Горшкова Ксения Геннадьевна (RU),
Пирогова Елена Алексеевна (RU),
Варанкина Александра Васильевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ МЕТАНОЛА НА ИММУННЫЙ СТАТУС РАБОТНИКОВ ХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к определению воздействия метанола, поступающего из производственной среды, на иммунный статус работников, занятых в химическом производстве. Для этого производят отбор пробы венозной крови у работников, установление в ней фактического содержания метанола и лабораторных иммунологических показателей, внутриклеточных маркеров апоптоза: белка bax и белка bcl2. Причем после установления в пробе крови фактического содержания метанола производят его сравнение с величиной фоновой концентрации путем определения коэффициента, равного их соотношению: $C1/C2$, где $C1$ - фактическое содержание метанола в крови; $C2$ - фоновая концентрация метанола, затем рассчитывают

критериальный коэффициент, равный соотношению указанных $bax/bcl2$, далее рассчитывают информационный индекс

клеточной гибели по формуле:
$$\hat{E} = \frac{bax}{bcl2} \times \frac{C1}{C2}$$

. При значении указанного индекса клеточной гибели более 6, при одновременном содержании метанола в крови выше его фоновой концентрации, оценивают состояние иммунного статуса работника химического производства от воздействия метанола как иммунодефицитное. Использование данного индекса клеточной гибели позволяет определить величину эффекта неблагоприятного воздействия метанола на апоптоз как на индивидуальном, так и на популяционном уровнях, а также позволяет на

ранних этапах процесса принимать решения о

иммунокоррекции. 2 табл., 2 пр.

RU 2 5 4 6 5 2 4 C 1

RU 2 5 4 6 5 2 4 C 1

Изобретение относится к биологическим исследованиям и медицине и предназначено для идентификации неблагоприятного воздействия метанола, поступающего из производственной среды, на иммунитет работников, занятых в химическом производстве, в частности, для установления степени вероятности возникновения изменений иммунного статуса.

В настоящее время большое внимание уделяется проблеме изучения влияния вредных химических факторов на формирование здоровья населения. Иммунная система является основной защитной системой организма, которая контролирует поддержание гомеостаза внутренней среды и обеспечивает нормальное функционирование организма в целом. Под термином «иммунный статус» понимается комплексный показатель состояния иммунной системы, это количественная и качественная характеристика состояния функциональной активности органов иммунной системы.

В связи с широчайшим использованием химических технологий в различных производственных циклах и сферах человеческой деятельности пристальное внимание ученых и медиков привлекает проблема выявления пороговых критериев, позволяющих на ранних этапах оценить, что воздействие вредного химического вещества превышает компенсаторные возможности организма и наносит вред здоровью человека. Актуальность исследования неблагоприятного воздействия метанола обусловлена его использованием в качестве растворителя, в парфюмерии, при синтезе формальдегида. Показано, что работники предприятий, использующих в технологическом цикле метанол, подвержены воздействию этого ксенобиотика, присутствующего в воздухе рабочей зоны, что подтверждается их обнаружением в биологических средах организма (кровь, моча). Помимо этого, метанол может являться одним из приоритетных загрязняющих веществ объектов окружающей среды, прежде всего водоемов, на территориях интенсивного промышленного освоения и выявляется в биологических средах проживающего в этих районах населения. Все это подтверждает необходимость тщательного исследования неблагоприятных последствий воздействия метанола на организм человека.

Известно, что метанол оказывает политропное действие на организм человека: поражает нервную и сосудистую систему, обладает выраженным раздражающим действием на слизистые оболочки, поражает кожу, вызывает расстройства зрения и обладает кумулятивным эффектом, а также вызывает глубокие нарушения клеточного и гуморального иммунитета. Особенно ярко выражены эти изменения у лиц, имеющих длительный и постоянный контакт с промышленными ксенобиотиками (у работников химических производств), что усугубляет их неблагоприятное воздействие. Иммунная система, являясь основной защитной системой организма, в первую очередь реагирует на воздействие ксенобиотических факторов, поэтому целесообразно оценивать степень воздействия химических токсикантов, в частности метанола, основываясь на изменениях со стороны иммунной системы.

Из уровня техники известны два вида диагностики иммунодефицитных состояний: - по отклонению ряда клинико-лабораторных показателей, характеризующих иммунную систему, от нормы (например, изобретения по Патентам РФ №№2058552, 2058553, 2179316);

- и по изменению параметров организма в зависимости от воздействия химических веществ (например, изобретения по Патентам РФ №№2111700, 2152618, 2494401).

Однако первый вид технических решений не позволяет достоверно и точно установить связь иммунного статуса населения с неблагоприятной экологической обстановкой среды проживания и негативными условиями производственной среды, т.к. этими

способами устанавливается лишь факт ухудшения иммунного состояния человека без установления причины этого ухудшения. Поэтому последующие лечебные мероприятия могут оказаться безрезультатными, если не установить причину заболевания.

5 Что же касается технических объектов второго вида, то они являются более перспективными и точными при установлении влияния вредных химических факторов среды обитания на иммунный статус человека. Но и они не лишены недостатков.

Например, известный способ гигиенической оценки влияния содержащихся в воздухе вредных веществ на организм человека, согласно которому производят клинко-инструментальное обследование населения посредством определения кратности
10 превышения среднерабочей величины максимальной нормируемой интенсивности легочной вентиляции над предельно-допустимой концентрацией в воздухе, по которой судят об ухудшении состояния здоровья человека под воздействием экологической обстановки (Патент РФ №2111700), позволяет установить ухудшение здоровья человека в целом лишь от экологически вредных веществ, находящихся в воздухе, и не применим
15 для определения состояния иммунного статуса населения в зависимости от химических токсикантов, попадающих в организм человека другими путями.

Еще одним известным способом является способ определения лимфотоксичности лекарственных препаратов в реакции спонтанного Е-розеткообразования, согласно которому после 90 минут инкубации лимфоцитарной взвеси с лекарственным препаратом
20 и 18 часовой инкубации с эритроцитами барана вычисляется индекс лимфотоксичности по отношению к контролю, и в случае его превышения 1,0 делается вывод о лимфотоксическом эффекте лекарственного препарата (Патент РФ №2152618).

Назначение указанного известного способа - определение необходимости и адекватности возможного использования лекарственных препаратов, т.е. химических веществ, на
25 организм человека, учитывая иммунный статус последнего. Однако этот известный способ не направлен на диагностику иммуотропного действия уже имеющегося в организме вещества. Отсутствует количественный критерий наличия данного вещества в организме. В указанном способе нет упоминания о том, какая и по какому принципу подобрана вносимая *in vitro* концентрация лекарственного вещества. Данный способ
30 не позволяет оценить влияние экологической ситуации на территории проживания пациента или производственной среды на иммунный статус. Способ по продолжительности слишком длителен, а оценочный индекс, с учетом стандартной погрешности метода до 25%, некорректно мал, что также снижает точность определения.

Из последних современных известных способов следует указать на способ
35 диагностики нарушения иммунного статуса у детей в условиях химической контаминации (Патент РФ №2494401), согласно которому производят отбор пробы крови у детей, проживающих в условиях химической контаминации. Затем выполняют клинко-лабораторные исследования крови на содержание вредных химических соединений. Далее у детей проводят ультразвуковое исследование (УЗИ) селезенки для оценки ее
40 экоструктуры с использованием датчика частотой не менее 10 МГц. При наличии в ультразвуковом срезе селезенки гипоехогенных однородных округлых включений размером 0,3-1,0 мм, расположенных на расстоянии 1,5-2 мм друг от друга, а также при одновременном превышении концентрации вредного химического соединения в крови по сравнению с его референтным значением диагностируют реактивные изменения
45 специфического иммунитета у детей. Изобретение обеспечивает создание информативного, безопасного и точного способа ультразвуковой диагностики при одновременной простоте и доступности для широкого практического применения. Однако указанный известный способ диагностики предназначен только для детей

промышленного региона и не применим для взрослых, т.к. не проходил испытания именно с этим контингентом. Кроме того, при профосмотрах работников химических производств не предусмотрено проведение УЗИ. Поэтому использование данного способа диагностики не дает возможность оценить влияние химических веществ, в частности метанола, на состояние иммунного статуса работников от воздействия метанола в условиях химического производства.

Наиболее близким к предлагаемому техническому решению является способ оценки влияния химических токсикантов на состояние иммунного статуса населения (Патент РФ №2180116). Согласно этому способу, устанавливают в пробе венозной крови содержание токсиканта, обусловленного экологической средой обитания населения, выделяют из пробы лимфоциты (моноклеонарные клетки) и добавляют к ним установленный токсикант в концентрации, соответствующей норме, полученную смесь инкубируют при температуре, соответствующей нормальной температуре организма человека, далее методом иммунологического анализа устанавливают в пробе количество лимфоцитов, содержащих дифференцировочные антигены, обусловленных воздействием токсиканта, и при снижении количества соответствующих кластеров лимфоцитов в пробе под воздействием токсиканта не менее чем в 1,5 раза по сравнению с контрольной пробой без введенного в нее дополнительно токсиканта, при одновременном обнаружении токсиканта в пробе крови в концентрации, превышающей норму, судят об ухудшении состояния иммунитета. Указанный известный способ повышает точность и достоверность установления оценки влияния химического токсиканта на состояние иммунного статуса населения.

Однако этот известный способ не обеспечивает идентификацию глубоких клеточных изменений, ассоциированных с их гибелью, что характерно для более высоких по уровню процессов химической контаминации, присущих для воздуха рабочей зоны, в отличие от удаленных от производства селитебных зон, превышающих адаптационные возможности организма. В результате снижается достоверность оценки иммунного статуса именно для работников химических производств.

Технический результат, достигаемый предлагаемым изобретением, заключается в повышении достоверности установления оценки влияния метанола на возникновение иммунодефицита организма работника химического производства за счет использования в качестве информативного критерия совокупности уровня контаминации метанолом как маркера его производственной экспозиции и соотношения белков, характеризующих иницируемый метанолом процесс клеточной гибели, как маркера эффекта иммунотоксического действия метанола.

Поставленный технический результат достигается предлагаемым способом оценки влияния метанола на иммунный статус работников химического производства, включающим отбор пробы венозной крови у работников, установление в ней фактического содержания химического токсиканта, определение в пробе лабораторных иммунологических показателей и установление информационного индекса, по которому судят о нарушении иммунного статуса работника от воздействия химического токсиканта, при этом новым является то, что в качестве химического токсиканта принимают метанол, а в качестве лабораторных показателей используют количество внутриклеточных маркеров апоптоза: белка bax и белка bcl2, причем после установления в пробе крови фактического содержания метанола производят его сравнение с величиной фоновой концентрации путем определения коэффициента, равного их соотношению: $C1/C2$, где $C1$ - фактическое содержание метанола в крови; $C2$ - фоновая концентрация метанола, затем рассчитывают критериальный коэффициент, равный соотношению

указанных $bax/bcl2$, далее рассчитывают информационный индекс клеточной гибели по формуле: $\hat{E} = \frac{bax}{bcl2} \times \frac{C1}{C2}$, и при значении указанного индекса клеточной гибели

более 6, при одновременном содержании метанола в крови выше его фоновой концентрации, оценивают состояние иммунного статуса работника химического производства от воздействия метанола как иммунодефицитное.

Указанный технический результат обеспечивается за счет следующего.

Благодаря использованию в качестве исследуемого материала пробы венозной крови, а также стандартных методик изучения иммунологических параметров обеспечивается простота, надежность и доступность исследований, а также получение результатов нужной информативности.

Техногенное химическое воздействие оказывает негативное влияние на регуляторные системы и адаптационные возможности организма, что в свою очередь ведет к снижению резистентности иммунитета, сопротивляемости организма к инфекционным заболеваниям и повышению чувствительности к неинфекционной патологии. Механизмы реализации этих состояний часто ассоциированы с нарушениями запрограммированной гибели клеток (апоптоза), при которых наблюдается либо активация апоптоза, либо его торможение. Повышенная активация апоптоза является звеном нейродегенеративных и миелодиспластических заболеваний, а также ишемических повреждений разных органов. Ингибирование клеточной гибели определяет опухолевые поражения различной природы, аутоиммунные и вирусные заболевания.

При изучении влияния экзогенных химических факторов на возникновение дисбаланса иммунной системы, что часто выражается в нарушении регуляции апоптоза, особую значимость представляет оценка минорных белковых фракций и фенотипов клеточного иммунитета. Использование медико-химического и специфического иммунологического тестирования позволило подтвердить наличие особенностей апоптоза при воздействии техногенных химических факторов на организм человека. При этом для идентификации показателей внутриклеточных маркеров регуляции апоптоза рекомендуется использовать метод проточной цитометрии сочетанных (комбинированных) фенотипов в суспензии клеток из периферической крови взрослого населения, работающего в условиях экспозиции метанолом.

В качестве критерия оценки нарушения внутриклеточной регуляции клеточной гибели в условиях техногенной контаминации рекомендуется использовать соотношение внутриклеточных маркеров апоптоза $bax/bcl2$. Так, белок $bcl2$ является ведущим внутриклеточным супрессором апоптоза, служит фактором выживания клетки, защищая ее от запрограммированной гибели, в то время как белок bax оказывает обратный эффект и ускоряет запрограммированную гибель клеток. При этом предполагается, что соотношение белков $bcl2$ и bax может быть главной детерминантой клеточной способности к апоптозу. Таким образом, при прочих равных условиях преобладание bax будет способствовать гибели клетки (при наличии соответствующего сигнала), а при преобладании $bcl2$ клетка с большей вероятностью будет защищена от апоптоза.

Кроме того, предлагается использовать в предлагаемом способе в качестве информационного критерия и коэффициент, равный отношению фактического содержания метанола в крови к фоновой концентрации метанола. Это обусловлено тем, что предполагаемая иммунотоксичность метанола будет тем выше, чем выше концентрация метанола в крови, а уровень иммунотропности должен коррелировать с величиной вводимого коэффициента. Предложенный диагностический индекс клеточной гибели

$$\hat{E} = \frac{bax}{bcl2} \times \frac{C1}{C2},$$

где

C1 - фактическое содержание метанола в крови;

C2 - фоновая концентрация метанола;

bax/bcl2 - критериальный коэффициент,

учитывает и величину воздействия в виде уровня контаминации метанолом, и величину ответа в виде уровня апоптоза иммунных фенотипов, и позволяет точно ориентировать на характер нарушений, в зависимости от конкретики и сочетания нарушений содержания минорных белков апоптоза, характеризующих вектор и степень клеточной гибели. Это и обеспечивает достаточно высокую степень достоверности предлагаемого способа.

Использование в качестве Индекса только соотношения bax/bcl2 (без соотношения фактической и фоновой концентраций метанола C1/C2) не обеспечит достоверности способа, поскольку не учитывает характер и величину контаминации конкретным иммуносупрессором, в качестве которого выступает метанол. Иммуотропным эффектом обладают разнообразные факторы среды обитания, поэтому диагностика должна учитывать конкретику системы «воздействие-эффект». В примерах, обосновывающих заявляемый способ, представленный контингент различался только по одному критерию - уровню контаминации метанолом. Так, например, использование в качестве Индекса только соотношения bax/bcl2 у пациента 40 лет позволяет констатировать уровень относительного благополучия, однако этот уровень индекса возрастает почти в 1,5 раза и значительно переходит за пределы предлагаемого диагностического индекса 6,0, если вводится дополнительный коэффициент C1/C2, что позволяет идентифицировать наличие опасности для здоровья работающего на химическом производстве.

Таким образом, предлагаемый способ позволит охарактеризовать иммуотропный эффект поступления метанола в организм из воздуха рабочей зоны на уровне всего организма в целом и принимать решения о коррекционных и профилактических мероприятиях по снижению производственной контаминации метанолом как на индивидуальном уровне, так и на уровне производственных коллективов.

Исходя из вышеизложенного можно сделать вывод, что поставленный технический результат обеспечивается за счет совокупности операций предлагаемого способа, их последовательности и режимов его реализации.

Предлагаемый способ реализуется следующим образом.

Для определения диагностической значимости предлагаемого индекса клеточной гибели проанализировано содержание внутриклеточных маркеров апоптоза bax и bcl2 у работников химического производства, непосредственно контактировавших с метанолом. Критерием включения в обследуемую группу был возраст от 37 до 58 лет. У работников также было проанализировано содержание метанола в крови. Все данные подвергнуты статистической обработке с помощью программы «Statistika-6.0» и «StatPlus 2009 Professional 5.8.4». Данные представлены в виде средней статистической величины и стандартной ошибки ($M \pm m$). Достоверность определялась непараметрическими методами, при сравнении двух независимых выборок использовался критерий Манна-Уитни. При сравнении двух групп нулевая гипотеза отклонялась при значении альфа-ошибки менее 0,05.

Установлено, что у тех работников, у которых содержание метанола в крови

соответствовало региональной фоновой концентрации ($0,667 \pm 0,117$ мг/дм³), значение индекса клеточной гибели не превышало 6. Тогда как у тех работников химического производства, у которых содержание метанола в крови было выше региональной фоновой концентрации (более $0,667 \pm 0,117$ мг/дм³), значение индекса клеточной гибели было выше 6, что свидетельствует о нарушениях запрограммированной гибели клеток.

Таким образом, установлено значение индекса клеточной гибели, что позволяет количественно оценивать степень негативного воздействия метанола на запрограммированную клеточную гибель.

Предложенный индекс клеточной гибели позволяет определить величину эффекта неблагоприятного воздействия метанола на апоптоз как на индивидуальном, так и на популяционном уровнях, а также позволяет на ранних этапах процесса принимать решения о коррекционных и профилактических мероприятиях по снижению экзогенной контаминации метанолом.

Предлагаемый способ реализуется следующим образом.

1. Производят забор периферической венозной крови утром, натощак, в пробирку, содержащую этилендиаминтетраацетат (ЭДТА).

2. Для исследования кровь с ЭДТА разводят раствором хлорида натрия (9 г/л, pH=7,2) в два раза, наслаивают на 3 мл градиента плотности фиколла-урографина (концентрация фиколла составляла 9%, плотность градиента - 1,077 г/мл) и центрифугируют 30 мин при 1500 об/мин.

3. Образовавшееся в интерфазе «кольцо» моноклеарных клеток отбирают пипеткой, полученную клеточную взвесь дважды отмывают раствором хлорида натрия (9 г/л, pH 7,2).

4. Полученную взвесь моноклеаров ресуспендируют в рабочем растворе фосфатно-солевого буфера (PBS) до концентрации 1×10^6 клеток/мл. В состав фосфатно-солевого буфера PBS входит смесь солей: хлорида натрия, гидроортофосфата натрия, дигидроортофосфата натрия и азиды натрия, с pH=7,2.

5. Фенотипирование лимфоцитов проводится методом проточной цитометрии на цитометре FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson» («BD», USA) с использованием программы CellQuest-Pro («BD», USA). Внутриклеточный антиапоптотический маркер bcl2 (Oncoprotein bcl-2) определяют с помощью меченых моноклональных антител (МКАТ), конъюгированных с FITC («eBioscience», США). Внутриклеточный проапоптотический фактор bax определяют методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием соответствующих МКАТ (Purified anti-Bax, PE Goat anti-mouse IgG, «BioLegend», USA).

6. Содержание метанола в крови определяли по Методике «Газохроматографическое определение концентраций метилового, этилового, изопропилового, пропилового, изобутилового и бутилового спиртов в крови». Методические указания. МУК 4.1.772-99 (утв. главным государственным санитарным врачом РФ 06.07.1999) с использованием газового хроматографа «Кристалл 5000.2».

7. Индекс клеточной гибели рассчитывают как произведение критериального коэффициента bax/bcl2 и коэффициента отношения фактического уровня метанола в крови к его фоновому уровню C1/C2.

8. У тех обследуемых работников, у кого значение индекса клеточной гибели было превышало 6, прогнозируют нарушение клеточной гибели за счет повышенной активности воздействия метанола, и оценивают состояние работника как иммунодефицитное. Используя эту информацию, в дальнейшем осуществляют в

отношении этих работников элиминационные и корректирующие иммунитет программы.

Для доказательства адекватности выбранного значения индекса клеточной гибели и характеристики степени влияния метанола на апоптоз, а значит на нарушение иммунного статуса, было обследовано 22 работника химического производства. Из 5 указанных работников 8 человек не имеют в пробах крови превышения фонового уровня метанола, а 14 человек - имеют превышение фонового уровня. У всех обследуемых была взята венозная кровь, исследование которой проводилось по вышеуказанной схеме. Данные, полученные в результате исследований, приведены в таблицах 1 и 2.

10 В таблице 1 приведены основные параметры клеточной гибели работников химического производства, уровень контаминации крови метанолом у которых не превышал фоновую концентрацию.

В таблице 2 приведены основные параметры клеточной гибели у работников химического производства, уровень контаминации крови метанолом у которых 15 превышал фоновое значение. У работников рассчитаны: коэффициенты по отношению фактического уровня метанола в крови к его референтному уровню C1/C2, критериальные коэффициенты $ba\chi/bcl2$ и значения индексов клеточной гибели.

Данные исследований показали, что во второй группе работников (таблица 2), с превышением уровня контаминации метанолом, значения индексов клеточной гибели 20 достоверно отличались ($p < 0,05$) от аналогичных показателей в группе работников первой группы (таблица 1), имеющих уровень метанола в крови, не превышающий фоновый, что свидетельствует о нарушениях запрограммированной клеточной гибели под влиянием высоких концентраций метанола.

Для обоснования минимального порогового значения индекса клеточной гибели 25 (более 6), которое бы характеризовало нарушения клеточного иммунитета, исходили из следующего принципа:

Для обоснования минимального значения этого индекса использовали среднее число по показателям индексов двух работников из таблицы 1 (пациенты №5 и 8), в крови 30 которых было установлено максимальное количество метанола (т.е. вредного действующего фактора) по сравнению с другими работниками из группы с содержанием метанола в крови на уровне региональных фоновых значений. Такой подход обусловлен тем, что при этом выбирается для этой группы работников максимально недействующая концентрация метанола, которая может характеризовать границу влияния этого химического фактора на возможный переход от здорового состояния к нарушению 35 клеточного иммунитета.

Исходя из приведенных данных было установлено следующее: минимальный индекс клеточной гибели составляет величину 6 (данные таблицы 1 показывают, что у пациентов №5 и №8 коэффициент C1/C2, равный соотношению фактической концентрации метанола в крови C1 к фоновой концентрации C2, равен 1,15 и 1,08 соответственно, является 40 наиболее высоким по сравнению с другими пациентами. Индексы клеточной гибели для указанных пациентов составляют величину 5,78 и 5,86 соответственно. Среднее значение индекса клеточной гибели у этих пациентов равно 5,82. Но принимая во внимание математическую погрешность, минимальное значение индекса клеточной гибели выбирается равным 6. То есть при значении индекса клеточной гибели более 6 45 можно говорить о наличии иммунодефицита на ранней стадии.

Такой подход позволяет характеризовать границу влияния (пороговое значение) химического фактора - метанола, когда действие этого метанола переходит границу компенсаторных возможностей организма, что приводит к нарушениям

запрограммированной клеточной гибели у работников химического производства.

Таким образом, рекомендуемый к определению индекс клеточной гибели (более 6) позволяет диагностировать наличие нарушений здоровья при экспозиции метанолом по изменению самой чувствительной из систем - иммунной.

5 Установленные значения индекса клеточной гибели позволяют не только определить степень выраженности интоксикации и нарушений клеточной гибели, но и вовремя провести лечебные и профилактические мероприятия как на индивидуальном уровне (программа по детоксикации и иммуномодуляции), так и в целом на предприятии (мероприятия на источниках и реабилитационные мероприятия).

10 Для иллюстрации реализации предлагаемого способа приведены два примера по конкретным пациентам примерно одного возраста из группы работников с повышенным содержанием метанола в крови и работников с содержанием метанола в пределах фоновой концентрации.

Пример 1

15 Пациент, 49 лет. Определяется уровень метанола в крови выше фоновых уровней - $1,091 \text{ мг/дм}^3$ (фоновый $0,667 \pm 0,117 \text{ мг/дм}^3$). Значения внутриклеточных маркеров апоптоза: $\text{bax}=5,62$; $\text{bcl2}=0,34$. Отношение уровня метанола в крови (C1) к его фоновому уровню (C2) $\text{C1/C2}=1,64$. Критериальный коэффициент bax/bcl2 равен 16,53. Значение индекса клеточной гибели равно: $\text{bax/bcl2} \times \text{C1/C2} = 16,53 \times 1,64 = 27,11$ (т.е. выше 6). Это

20 говорит о том, что, согласно предлагаемому способу, у данного работника состояние иммунного статуса от воздействия метанола оценивается как иммунодефицитное. Для доказательства данного вывода были установлены следующие иммунологические показатели у данного работника, которые имели следующие значения: CD4^+ -лимфоциты

25 - 28% (норма 31-60%); CD3^+ -лимфоциты - 53% (норма 55-84%); $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ -лимфоциты - 11% (норма 13-41%); CD19^+ -лимфоциты - 6% (норма 6-25%); $\text{CD16}^+\text{CD56}^+$ -лимфоциты - 5% (норма 5-27%); $\text{CD3}^+\text{CD95}^+$ -лимфоциты - 25%; $\text{CD3}^+\text{CD25}^+$ -лимфоциты - 6%; IgG - $8,75 \text{ г/дм}^3$ (норма 12,0-16,0 г/дм^3); IgA - $1,68 \text{ г/дм}^3$ (норма 2,0-2,8 г/дм^3); IgM - $1,02 \text{ г/дм}^3$

30 (норма 1,32-1,8 г/дм^3). Анализируя представленные данные, можно сделать вывод, что у пациента имеются изменения в иммунной системе, в частности иммунодефицитное состояние. Такой вывод подкрепляется тем, что наблюдается дефицит иммунцитов с фенотипом хелперов (CD4^+ -лимфоциты), функцией которых является продукция

35 цитокинов, то есть участие в иммунной регуляции.

Таким образом, при анализе внутриклеточных маркеров апоптоза выявлены нарушения запрограммированной клеточной гибели, обусловленные действием метанола.

Пример 2

40 Пациент, 51 год. Определяется уровень метанола в крови в пределах фонового уровня - $0,520 \text{ мг/дм}^3$ (фоновый $0,667 \pm 0,117 \text{ мг/дм}^3$). Значения внутриклеточных маркеров апоптоза: $\text{bax}=4,19$; $\text{bcl2}=1,12$. Отношение уровня метанола в крови (C1) к его фоновому уровню (C2) $\text{C1/C2}=0,78$. Критериальный коэффициент $\text{bax/bcl2}=3,74$. Значение индекса клеточной гибели = 2,92 (т.е. ниже 6). Это говорит о том, что, согласно предлагаемому

45 способу, у данного работника состояние иммунного статуса от воздействия метанола не оценивается как иммунодефицитное.

Для доказательства данного вывода - отсутствие иммунодефицита, были установлены следующие иммунологические показатели у данного работника, которые имели

следующие значения: CD4⁺-лимфоциты - 41% (норма 31-60%); CD3⁺-лимфоциты - 68% (норма 55-84%); CD3⁺CD8⁺-лимфоциты - 25% (норма 13-41%); CD19⁺-лимфоциты - 14% (норма 6-25%); CD16⁺56⁺-лимфоциты - 25% (норма 5-27%); CD3⁺CD95⁺-лимфоциты - 53%; CD3⁺CD25⁺-лимфоциты - 3%; IgG - 15,61 г/дм³ (норма 12,0-16,0 г/дм³); IgA - 2,78 г/дм³ (норма 2,0-2,8 г/дм³). IgM - 1,36 г/дм³ (норма 1,32-1,56 г/дм³). Анализируя представленные данные, можно сделать вывод, что у пациента отсутствуют изменения в иммунной системе. Такой вывод подкрепляется тем, что отсутствует дефицит

иммуноцитов с фенотипом хелперов (CD4⁺-лимфоциты), функцией которых является продукция цитокинов, то есть участие в иммунной регуляции.

Таким образом, при анализе внутриклеточных маркеров апоптоза нарушений запрограммированной клеточной гибели, обусловленных действием метанола, выявлено не было.

Приведенные данные показывают, что при реализации предлагаемого способа обеспечивается его назначение и обеспечивается достоверность диагностики.

Также в процессе исследований было доказано, что только использование

предлагаемого индекса клеточной гибели, определяемого по формуле $\hat{E} = \frac{bax}{bcl2} \times \frac{C1}{C2}$

в виде произведения двух коэффициентов, является главным критерием достоверного установления иммунодефицита у работников химического производства от воздействия метанола. А использование, например, только одного критериального коэффициента $bax/bcl2$ не обеспечит достоверность оценки. Так, например, если рассмотреть данные из таблицы 1 по этому коэффициенту, то можно установить, что он находится в диапазоне от 4,98 до 6,06 и его средняя величина составляет $5,434 \pm 0,116$ (т.е. с учетом математической погрешности минимальным пороговым значением этого критериального коэффициента также может быть принято число, близкое к 6). И если бы его выбирать в качестве главного критерия (без учета фактической концентрации метанола в крови), то, например, у пациентов №1 из таблицы 1 и №6 из таблицы 2, у которых этот критериальный коэффициент практически совпадает $bax/bcl2=6,06$ и 6,07 соответственно, должны быть бы и совпадающие иммунологические данные крови, а значит - и совпадать оценка иммунного статуса. Однако результаты исследований показали, что:

у пациента №1 из таблицы 1 иммунологические показатели имеют следующие значения: CD4⁺-лимфоциты - 35% (норма 31-60%); CD3⁺-лимфоциты - 63% (норма 55-84%); CD3⁺CD8⁺-лимфоциты - 21% (норма 13-41%); CD19⁺-лимфоциты - 22% (норма 6-25%); CD16⁺56⁺-лимфоциты - 12% (норма 5-27%); CD3⁺CD95⁺-лимфоциты - 30%, CD3⁺CD25⁺-лимфоциты - 7%; IgG - 12,75 г/дм³ (норма 12,0-16,0 г/дм³); IgA - 2,68 г/дм³ (норма 2,0-2,8 г/дм³); IgM - 1,42 г/дм³ (норма 1,32-1,8 г/дм³);

а у пациента №6 из таблицы 2 следующие: CD4⁺-лимфоциты - 29% (норма 31-60%); CD3⁺-лимфоциты - 51% (норма 55-84%); CD3⁺CD8⁺-лимфоциты - 13% (норма 13-41%); CD19⁺-лимфоциты - 9% (норма 6-25%); CD16⁺56⁺-лимфоциты - 8% (норма 5-27%); CD3⁺CD95⁺-лимфоциты - 43%; CD3⁺CD25⁺-лимфоциты - 3%; IgG - 10,61 г/дм³ (норма 12,0-16,0 г/дм³); IgA - 1,28 г/дм³ (норма 2,0-2,8 г/дм³); IgM - 1,15 г/дм³ (норма 1,32-1,8 г/дм³);

дм³). Сопоставление приведенных данных показывает, что пациент №6 из таблицы 2 страдает иммунодефицитом, т.к. наблюдается дефицит иммуноцитов с фенотипом хелперов (CD4⁺-лимфоциты), функцией которых является продукция цитокинов, то есть участие в иммунной регуляции, в то время как у пациента №1 из таблицы 1 дефицит CD4⁺-лимфоцитов отсутствует.

Приведенные данные еще раз доказывают, что рекомендуемый в предлагаемом способе для оценки иммунного статуса индекс клеточной гибели и его величина (более 6) позволяют достоверно диагностировать наличие нарушения здоровья при экспозиции метанола по изменению самой чувствительной из систем - иммунной.

Таблица 1

Значение индекса клеточной гибели у работников химпроизводства с уровнем содержания метанола в крови, не превышающим региональный фоновый

Пациент	Отношение уровня метанола в крови (C1) к его фоновому уровню (C2) (коэффициент C1/C2)	Критериальный коэффициент bax/bcl2	Индекс клеточной гибели $\hat{E} = \frac{bax}{bcl2} \times \frac{C1}{C2}$
1. Пациент, 42 года	0,7	6,06	4,24
2. Пациент, 37 лет	0,78	5,38	4,19
3. Пациент, 58 лет	1,08	5,17	5,48
4. Пациент, 48 лет	1,03	5,82	5,99
5. Пациент, 52 года	1,15	5,03	5,78
6. Пациент, 51 год	0,61	4,98	3,04
7. Пациент, 48 лет	0,78	5,74	4,47
8. Пациент, 49 лет	1,08	5,43	5,86
	0,925±0,064*	5,434±0,116*	5,013±0,334*

* - достоверное различие с показателями группы работников химического производства с уровнем содержания метанола в крови, превышающим региональный фоновый (0,667±0,117 мг/дм³) (p<0,05)

Таблица 2

Значение индекса клеточной гибели у работников химпроизводства с уровнем содержания метанола в крови, превышающим региональный фоновый

Пациент	Отношение уровня метанола в крови (C1) к его фоновому уровню (C2) (коэффициент C1/C2)	Критериальный коэффициент bax/bcl2	Индекс клеточной гибели $\hat{E} = \frac{bax}{bcl2} \times \frac{C1}{C2}$
1. Пациент, 51 год	1,31	11,68	15,30
2. Пациент, 53 года	1,31	20,86	27,33
3. Пациент, 50 лет	1,25	16,13	20,16
4. Пациент, 49 лет	2,43	14,32	34,80
5. Пациент, 38 лет	9,57	22,54	215,71
6. Пациент, 40 лет	1,42	6,07	8,62
7. Пациент, 37 лет	1,36	37,53	51,04
8. Пациент, 44 года	1,27	7,09	9,00
9. Пациент, 53 года	1,28	35	44,80
10. Пациент, 54 года	1,27	36,51	46,37
11. Пациент, 54 года	1,45	27,59	40,01
12. Пациент, 46 лет	17,50	21,09	369,078
13. Пациент, 49 лет	1,64	16,53	27,11
14. Пациент, 47 лет	1,40	25,46	35,64
	3,175±1,247*	21,329±3,285*	67,52±26,94*

* - достоверное различие с показателями группы работников химического производства с уровнем содержания метанола в крови, не превышающим региональный фоновый (0,667±0,117 мг/дм³) (p<0,05)

Формула изобретения

Способ оценки влияния метанола на иммунный статус работников химического производства, включающий отбор пробы венозной крови у работников, установление в ней фактического содержания химического токсиканта, определение в пробе

лабораторных иммунологических показателей и установление информационного индекса, по которому судят о нарушении иммунного статуса работника от воздействия химического токсиканта, отличающийся тем, что в качестве химического токсиканта принимают метанол, а в качестве лабораторных показателей используют количество
5 внутриклеточных маркеров апоптоза: белка bax и белка bcl2, причем после установления в пробе крови фактического содержания метанола производят его сравнение с величиной фоновой концентрации путем определения коэффициента, равного их соотношению: $C1/C2$, где $C1$ - фактическое содержание метанола в крови; $C2$ - фоновая концентрация метанола, затем рассчитывают критериальный коэффициент, равный соотношению
10 указанных bax/bcl2, далее рассчитывают информационный индекс клеточной гибели по формуле: $\hat{E} = \frac{bax}{bcl2} \times \frac{C1}{C2}$, и при значении указанного индекса клеточной гибели более 6, при одновременном содержании метанола в крови выше его фоновой
15 концентрации, оценивают состояние иммунного статуса работника химического производства от воздействия метанола как иммунодефицитное.