Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

2.1.10. ГИГИЕНА. КОММУНАЛЬНАЯ ГИГИЕНА.
СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ В СВЯЗИ
С СОСТОЯНИЕМ ОКРУЖАЮЩЕЙ ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ И
УСЛОВИЯМИ ПРОЖИВАНИЯ НАСЕЛЕНИЯ

Применение показателей и критериев нарушения биотрансформации бензола в организме детей для задач гигиенических оценок, санитарно-эпидемиологических расследований и экспертиз

Методические рекомендации
МР 2.1.10.0077—13

Издание официальное

Москва • 2013

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

2.1.10. ГИГИЕНА. КОММУНАЛЬНАЯ ГИГИЕНА.
СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ В СВЯЗИ
С СОСТОЯНИЕМ ОКРУЖАЮЩЕЙ ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ И
УСЛОВИЯМИ ПРОЖИВАНИЯ НАСЕЛЕНИЯ

Применение показателей и критериев нарушения биотрансформации бензола в организме детей для задач гигиенических оценок, санитарно-эпидемиологических расследований и экспертиз

Методические рекомендации
МР 2.1.10.0077—13

ББК 51.21
П75

П75 **Применение** показателей и критериев нарушения биотрансформации бензола в организме детей для задач гигиенических оценок, санитарно-эпидемиологических расследований и экспертиз: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013.—20 с.

ISBN 978—5—7508—1211—0

1. Разработаны Федеральным бюджетным учреждением науки «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» (Н. В. Зайцева, М. А. Землянова, Ю. В. Кольдибекова, Т. С. Уланова, О. В. Долгих, Д. А. Кирьянов, В. М. Чигвинцев, В. Н. Звездин).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 20 августа 2013 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.21

Редактор Л. С. Кучурова
Технический редатор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 28.11.13

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25

Тираж 200 экз. Заказ 82

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 8(495)952-50-89

© Роспотребнадзор, 2013
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013

Содержание

1. Общие положения....4
2. Область применения....5
3. Основная часть....5
3.1. Термины и определения....5
3.2. Перечень сокращений....6
3.3. Введение....6
3.4. Специальная часть....9
Нормативные правовые и методические документы....10
Библиографические данные....11
Приложение 1. Требования, перечень средств измерений, вспомогательных устройств и реактивов, необходимых для количественного определения бензола и фенола в биосредах (кровь, моча) газохроматографическим методом....12
Приложение 2. Требования и перечень оборудования, необходимого для реализации исследования и оценки состояния цитохрома Р-450 и глутатионовой системы....14
Приложение 3. Требования и перечень используемых реактивов и тест-систем, необходимых для исследования и оценки состояния цитохрома Р-450 и глутатионовой системы....16
Приложение 4. Пример апробации методики исследования показателей нарушения биотрансформации бензола в организме детей, проживающих в условиях хронического внешнесредового воздействия бензола....17

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
20 августа 2013 г.
Дата введения: с момента утверждения

2.1.10. ГИГИЕНА. КОММУНАЛЬНАЯ ГИГИЕНА.
СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ В СВЯЗИ
С СОСТОЯНИЕМ ОКРУЖАЮЩЕЙ ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ И
УСЛОВИЯМИ ПРОЖИВАНИЯ НАСЕЛЕНИЯ

Применение показателей и критериев нарушения биотрансформации бензола в организме детей для задач гигиенических оценок, санитарно-эпидемиологических расследований и экспертиз

Методические рекомендации
МР 2.1.10.0077—13

1. Общие положения

1.1. Настоящие методические рекомендации разработаны для повышения эффективности гигиенических оценок, санитарно-эпидемиологических расследований и экспертиз по выявлению нарушений состояния здоровья в связи с воздействием химических факторов. В настоящих методических рекомендациях определены показатели и критерии нарушения биотрансформации бензола в организме детей при хроническом внешнесредовом аэротехногенном воздействии.

1.2. Проведение исследований осуществляется по запросу органов и организаций Роспотребнадзора научно-исследовательскими организациями, а также иными научно-исследовательскими или лечебно-профилактическими учреждениями, привлекаемыми в соответствии с п. 6.4 постановления Правительства Российской Федерации от 30.06.2004 № 322 «Об утверждении Положения о Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека», аккредито-

ванными в установленном порядке для проведения работ по оценке риска для здоровья населения, исследований биологических объектов, материалов и сред, а также имеющих лицензию на осуществление медицинской деятельности.

1.3. Все исследования осуществляются в строгом соответствии с требованиями действующих нормативных правовых и методических документов.

1.4. Планирование и проведение исследований осуществляется с обязательным соблюдением принципов надлежащей лабораторной практики Principles of Good Laboratory Practice (ENV/MC/CHEM (98)17) в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ-Р 53434—09 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

1.5. В настоящих рекомендациях использованы результаты исследования и оценки нарушений биотрансформации бензола и его метаболита – фенола в организме детей, связанных с хроническим внешнесредовым аэротехногенным воздействием бензола и отсутствием аэрогенного поступления фенола, и сравнительно с результатами исследований у детей, проживающих в условиях отсутствия аэрогенного воздействия данных химических соединений.

2. Область применения

2.1. Методические рекомендации предназначены для органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека при проведении санитарно-гигиенических экспертиз, расследований, исследований в области гигиенической оценки по установлению причинно-следственных связей между факторами среды обитания и здоровьем населения субъектов Российской Федерации.

Рекомендации также могут быть использованы научно-исследовательскими, лечебно-профилактическими и другими организациями, занимающимися вопросами гигиенической оценки, предотвращения и снижения неблагоприятных последствий воздействия факторов среды обитания на здоровье человека.

3. Основная часть

3.1. Термины и определения

Биотрансформация – энзиматическое превращение жирорастворимых экзогенных или эндогенных соединений в полярные водорастворимые метаболиты, легко выводимые из организма.

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.

Глутатионовая система – многокомпонентная система, включающая в себя комплекс ферментов (глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), осуществляющих конъюгационно-элиминационную функцию соединений во II фазе биотрансформации веществ.

Глутатионпероксидаза – фермент, защищающий от окислительного повреждения восстановительный глутатион, участие которого необходимо в эндогенном связывании чужеродного вещества.

Глутатионредуктаза – фермент, катализирующий реакцию восстановления глутатиона из его окисленной формы.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа – фермент, обеспечивающий образование клеточного НАДФ-Н, необходимого для поддержания восстановленного глутатиона.

Глутатион-S-трансфераза – фермент, катализирующий присоединение глутатиона к эндогенному или чужеродному соединению.

3.2. Перечень сокращений

Гл-6-Ф – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

ГлSTр – глутатион-S-трансфераза

ГлПО – глутатионпероксидаза

ГлР – глутатионредуктаза

ИФА – иммуноферментный анализ

НАДФ-Н – никотинамиддинуклеотидфосфат восстановленный

Rfc_{chu} – референтная концентрация для хронического ингаляционного воздействия

3.3. Введение

На промышленно развитых территориях с размещением предприятий органического синтеза, химической, нефтеперерабатывающей, нефтехимической отраслей и развитой транспортной инфраструктурой к одним из приоритетных и распространенных загрязнителей атмосферного воздуха относится бензол, являющийся истинным ксенобиотиком и высоко опасным химическим веществом для здоровья человека [1].

При ингаляционном поступлении в организм большая часть бензола (до 84 %) подвергается биотрансформации, которая осуществляется в основном в печени [2]. В процессе биотрансформации происходит окисление бензола через промежуточный метаболит – фенол, с образованием конечного продукта – фенилсульфата [3, 4]. Схематическое изображение биотрансформации бензола представлено на рис. 1 [4].

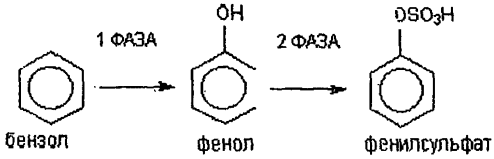


Рис. 1. Биотрансформация бензола

Биотрансформацию бензола и его метаболита фенола в организме осуществляет система цитохромов Р-450 и глутатионовая система [5]. В первой фазе биотрансформации система цитохромов Р-450 обеспечивает переход бензола в полярное и гидрофильное относительно исходного соединение – фенол, что обусловливает возможность его быстрой экскреции из организма. Во вторую фазу биотрансформации глутатионовая система обеспечивает конъюгацию фенола с эндогенным глутатионом, в результате чего образуется конечный метаболит – фенилсульфат, который в дальнейшем легко подвергается элиминации из организма. При этом фенол, по сравнению с фенилсульфатом, представляет большую опасность для здоровья человека [6].

Хроническое внешнесредовое аэротехногенное воздействие бензола может обусловливать наличие бензола и увеличение концентрации его метаболита – фенола в биосредах (кровь, моча) в результате нарушения процесса биотрансформации. Это может являться следствием дисфункции систем, обеспечивающих процесс биотрансформации бензола. Наличие бензола и повышенное содержание фенола в биосредах может обусловить развитие заболеваний крови и кроветворных органов, центральной нервной, иммунной, сердечно-сосудистой систем, печени, почек [3].

Выявление и оценка нарушений биотрансформации бензола в организме при хроническом ингаляционном поступлении в организм включает поэтапное выполнение следующих процедур:

1) *исследование и оценку содержания бензола и фенола в крови и моче.* Количественное определение бензола в крови и моче осуществляется газохроматографическим методом в соответствии с методическими рекомендациями, действующими в Российской Федерации (МУК 4.1.764—99

и 4.1.765—99). Определение массовой концентрации фенола в крови и моче осуществляется газохроматографическим методом в соответствии с методическими рекомендациями, действующими в Российской Федерации (МУК 4.1.2107—06 и 4.1.2108—06);

2) *исследование и оценку состояния функций систем, обеспечивающих первую и вторую фазы биотрансформации бензола, по комплексу показателей*:

а) *состояние системы цитохрома Р-450 (гена CYP1A1), участвующего в первой фазе биотрансформации.*

Методика основана на принципе полимеразной цепной реакции, в основе которой лежит амплификация и детекция продуктов этой реакции в режиме реального времени с помощью флюоресцентных меток, которыми предварительно помечают используемые для реакции амплификации праймеры в соответствии с инструкцией к тест-системе;

б) *активность ферментов глутатионовой системы, участвующей во второй фазе биотрансформации:*

– активность глутатионпероксидазы – фермента, защищающего от окислительного повреждения восстановленный глутатион, необходимый в эндогенном связывании фенола. Активность глутатионпероксидазы в сыворотке крови определяется фотометрическим методом, основанным на принципе «сэндвич» иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией к тест-системе ИФА;

– активность глутатионредуктазы – фермента, катализирующего реакцию восстановления глутатиона из его окисленной формы. Активность глутатионредуктазы определяется кинетическим методом по принципу каталитического восстановления глутатиона в присутствии восстановленного НАДФ-Н по степени уменьшения абсорбции этого процесса в соответствии с инструкцией к тест-системе биохимического анализа;

– активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – фермента, обеспечивающего образование клеточного НАДФ-Н, необходимого для поддержания восстановленного глутатиона для эндогенного связывания фенола. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы определяется кинетическим методом по степени увеличения абсорбции в результате превращения $НАДФ^+$ в соответствии с инструкцией к тест-системе биохимического анализа;

– активность глутатион-S-трансферазы – фермента, катализирующего присоединение глутатиона к эндогенно образованному фенолу. Активность глутатион-S-трансферазы в сыворотке крови определяется фотометрическим методом, основанным на принципе твердофазного

иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией к тест-системе ИФА.

Требования и перечень необходимого оборудования, расходных материалов, реактивов и тест-систем для выполнения исследований представлены в прилож. 2, 3.

3.4. Специальная часть

3.4.1. Нарушение биотрансформации бензола возникает:

- при наличии патологического аллеля цитохрома Р-450, что свидетельствует о наследственной предрасположенности к нарушению процесса биотрансформации;
- при дисфункции ферментов глутатионовой системы, обеспечивающих связывание и выведение бензола и его метаболита – фенола из организма, обусловленной ингаляционным поступлением бензола в концентрациях, превышающих референтные уровни хронического ингаляционного воздействия (Rfc_{chr}) (Р 2.1.10.1920—04).

3.4.2. Показателями нарушения биотрансформации бензола в организме является наличие бензола и повышенных концентраций фенола (как метаболита бензола) в крови и моче.

3.4.3. Гигиеническими критериями для проведения химико-аналитического исследования биосред у детей на содержание бензола и фенола являются:

- наличие бензола в атмосферном воздухе селитебной застройки выше предельно допустимой концентрации (более 1 $ПДК_{сс}$ – 0,1 мг/м^3) и референтной концентрации при ингаляционном поступлении (более 1 Rfc_{chr} – 0,03 мг/м^3);
- отсутствие фенола в атмосферном воздухе селитебной зоны для исключения его экзогенного поступления в организм.

3.4.4. Критериями нарушения биотрансформации бензола являются следующие показатели:

- идентификация бензола в крови и моче выше предела обнаружения (0,0035 мг/дм^3);
- наличие фенола в крови и моче выше фоновых уровней (в крови – (0,010 ± 0,005) мг/дм^3, моче – (0,278 ± 0,021) мг/дм^3) в 1,2 раза;
- распространенность минорного аллеля по гену цитохрома Р-450 *CYP1A1* выше 10 %;
- повышение активности глутатионпероксидазы в сыворотке крови в 1,2—1,4 раза относительно контроля и границы чувствительности метода (> 54,7 нг/см^3);

• повышение активности глутатионредуктазы в сыворотке крови в 1,6—1,8 раза относительно контроля и границы чувствительности метода (> 80 Е/дм^3);

• повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в сыворотке крови в 1,2—1,3 раза относительно контроля и границы чувствительности метода (> 4,1 Е/дм^3);

• понижение активности глутатион-S-трансферазы в сыворотке крови в 2,5—2,6 раза относительно контроля и границы чувствительности метода (< 110 нг/см^3).

3.4.5. При наличии нарушения связывания и выведения бензола и фенола из организма необходимо контролировать развитие нарушений у детей со стороны:

• крови и кроветворных органов (нарушение процессов костно-мозгового кроветворения – анемия неуточненная – D64.9, апластическая анемия, вызванная внешними агентами – D61.2);

• центральной нервной системы и сердечно-сосудистой системы (функциональные расстройства нервной системы – астеноневротический синдром – R45.0, астеновегетативные нарушения и другие расстройства вегетативной нервной системы – G90.8);

• иммунной системы (супрессия процессов иммунной защиты и неспецифической резистентности – вторичное иммунодефицитное состояние – D83.9).

Реализация предложенной методики исследования представлена в прилож. 4.

Нормативные правовые и методические документы

• Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

• Постановление Правительства Российской Федерации от 30.06.2004 № 322 (с изменениями) «Об утверждении Положения о Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека».

• Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 19.07.2007 № 224 «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок».

• ГОСТ 8.207—76 «Государственная система обеспечения единства измерений. Прямые измерения с многократными наблюдениями. Методы обработки результатов наблюдений. Основные положения».

• МУК 4.1.765—99 «Газохроматографический метод количественного определения ароматических (бензол, толуол, этилбензол, о-, м-, п-ксилол) углеводородов в биосредах (кровь)».

• МУК 4.1.764—99 «Газохроматографический метод количественного определения предельных (гексан, гептан) и ароматических (бензол, толуол, этилбензол, о-, м-, п-ксилол) углеводородов в биосредах (моча)».

• МУК 4.1.2108—06 «Определение массовой концентрации фенола в биосредах (кровь) газохроматографическим методом».

• МУК 4.1.2107—06 «Определение массовой концентрации фенола в биосредах (моча) газохроматографическим методом».

• Р 2.1.10.1920—04 «Руководство по оценке риска здоровью населения при воздействии химических веществ».

Библиографические данные

1. Кольдибекова Ю. В. Оценка конъюгационно-элиминационной функции глутатионовой системы у детей при хроническом экзогенном поступлении бензола //Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения: Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. В 2 т. /Под общ. ред. акад. РАМН Г. Г. Онищенко, акад. РАМН Н. В. Зайцевой. Пермь: Книжный формат, 2012. Т.1. С. 301—304.

2. Вредные вещества в промышленности: Справочник в 3 томах. Том I. Органические вещества /Под ред. Н. В. Лазарева, Э. Н. Левиной. Л.: Химия, 1976. 592 с.

3. Токсикологическая химия. Аналитическая токсикология: Учебник /Под ред. Р. У. Хабриева, Н. И. Калетиной. М.: ГОЭТАР–Медиа, 2010. 752 с.

4. Онищенко Г. Г. Гигиеническая индикация последствий для здоровья при внешнесредовой экспозиции химических факторов /Г. Г. Онищенко, Н. В. Зайцева, М. А. Землянова; под ред. Г. Г. Онищенко. Пермь: Книжный формат, 2011. С. 126—130.

5. Землянова М. А., Кольдибекова Ю. В. Современные подходы к оценке нарушений метаболизма ксенобиотиков при поступлении в организм из внешней среды //Экология человека. 2012. № 8. С. 8—14.

6. Зайцева Н. В. Гигиеническая диагностика нарушений метаболизма ароматических углеводородов для эпидемиологических исследований влияния внешнесредовых факторов /Н. В. Зайцева, М. А. Землянова, В. Н. Звездин, Е. Р. Комлева, Д. А. Кирьянов, Т. С. Уланова, В. М. Чигвинцев. М.: ВНТИЦ, № гос. рег. 02201150764.

Приложение 1
(справочное)

Перечень средств измерений, вспомогательных устройств и реактивов, необходимых для количественного определения бензола и фенола в биосредах (кровь, моча) газохроматографическим методом

При выполнении исследований применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы. Допускается применение других типов средств измерений, вспомогательного оборудования и химреактивов с аналогичными метрологическими характеристиками.

1. Перечень средств измерений

Хроматограф газовый с пламенно-ионизационным детектором	
Весы лабораторные аналитические	ГОСТ 24104-80Е
Секундомер	

2. Вспомогательные устройства

Хроматографическая колонка стальная длиной 3 м и внутренним диаметром 3 мм	
Бидистиллятор	ГОСТ 15150—69
Редуктор кислородный	ТУ 26-05-235—70
Микрошприцы	ТУ 5Е2.833.106
Шприцы медицинские стеклянные вместимостью 5 см	ТУ 64-1-378—83
Колбы мерные вместимостью 1 000 см	ГОСТ 1770—74Е
Пипетки вместимостью 1, 5, 10 см	ГОСТ 20292—74
Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см	ГОСТ 1770-74Е

3. Вспомогательные материалы и реактивы

Гелий в баллоне	ТУ 51-940—80
Водород технический	ГОСТ 3022—80
Воздух в баллоне	ГОСТ 11882—73
Apiezon L на хроматоне N-супер фракции 0,16—0,20 мм – неподвижная фаза для заполнения хроматографической колонки	
Бензол, хч	ТУ 6-09-787—76

Толуол, хч	ТУ 6-09-787—76
Фенол, хч	ТУ 6-09-787—76
Этилбензол, хч	ТУ 6-09-787—76
П-, м-ксилол, хч	ТУ 6-09-915—76
О-ксилол	ГСО 2913—84
Щавелевая кислота, ч	ГОСТ 22180—76
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72

Приложение 2
(справочное)

Требования и перечень оборудования, необходимого для реализации исследования и оценки состояния цитохрома Р-450 и глутатионовой системы

1. Оборудование должно иметь государственный сертификат соответствия техническому регламенту, свидетельство о прохождении метрологического контроля аккредитованными для этого организациями в установленном порядке и в установленные сроки.

2. Для каждого прибора, используемого в исследованиях, в журнале фиксируются следующие сведения: наименование прибора, наименование производителя, страна-изготовитель, модель прибора, серийный (заводской) номер, дата приобретения и постановки на учет в лаборатории, дата запуска в эксплуатацию, инвентарный номер, дата и номер свидетельства метрологического контроля на момент исследования, место расположения прибора.

3. Эксплуатация оборудования проводится в соответствии с техническим паспортом и руководством пользователя. Выполнение исследований проводят при нормальных климатических условиях в соответствии с ГОСТ 15150: температура воздуха (20 ±1) °С; атмосферное давление 630—800 мм рт. ст.; влажность воздуха не более 80 % при температуре 25 °С. Результаты проведения калибровки, поверки и текущего ремонта оборудования фиксируются в специальном журнале, датируются и заверяются подписью сотрудника, эксплуатирующего оборудование. Журнал должен быть доступен для сотрудников, обеспечивающих его обслуживание.

4. Средства измерения

Весы лабораторные 2-го класса точности (максимальная нагрузка до 200 г, основная погрешность при измерении не более 0,2 мг) для взвешивания сухих ингредиентов при подготовке рабочих растворов

Ионометр (pH-метр) для определения pH буферных растворов

5. Оборудование

Хроматографическая колонка стальная длиной 3 м и внутренним диаметром 3 мм

Анализатор иммуноферментный микропланшетный автоматический	
Амплификатор	
Центрифуга лабораторная со скоростью вращения ротора до 3 000 об./мин для пробирок вместимостью 15 $см^3$	
Центрифуга	
Термостат твердотельный	
Шейкер планшетный термостатируемый	
Прибор для промывки планшет	
Холодильник лабораторный с морозильной камерой 2—14 / –20—30 °С	ГОСТ 26678—85
или аналогичный	
Облучатель-рециркулятор медицинский бактерицидный	
Дистиллятор	

6. Вспомогательные материалы и лабораторная посуда

Бидистиллятор	ГОСТ 15150—69
Редуктор кислородный	ТУ 26-05-235—70
Регулируемые автоматические дозаторы 1-канальные (10—100, 100—1 000, 500—5 000 мкл), погрешность ± 1 мкл	
Регулируемые автоматические дозаторы 8-канальные (5—50, 50—300 мкл) погрешность ± 1 мкл	
Стаканы стеклянные химические объемом 50, 500 $см^3$	ГОСТ 10394—72
Лабораторные штативы	ТУ 64-1-2669—73
Наконечники пластиковые для автоматических дозаторов объемом 10—300 мкл, 200—1 000 мкл, 1 000—5 000 мкл	
Перчатки резиновые	ГОСТ 3—88
Пробирки вакуумные пластиковые Improve без коагулянта объемом 9 $см^3$	
Зонд урогенитальный, одноразовый, стерильный	
Транспортная среда для хранения и транспортирования респираторных мазков	
Пробирки	ГОСТ 10-515—75

Приложение 3
(справочное)

Требования и перечень используемых реактивов и тест-систем, необходимых для исследования и оценки состояния цитохрома Р-450 и глутатионовой системы

1. Реактивы и тест-системы, используемые в исследованиях, должны иметь государственный сертификат соответствия. Характеристики реактивов и тест-систем должны быть паспортизированы и иметь документированный сертификат гарантированного срока использования. Условия проведения исследований на тест-системах должны выполняться строго по инструкции производителя или специально разработанным стандартным операционным процедурам и исключать воздействие внешних факторов, способных повлиять на качество выполнения исследований.

2. Реактивы и тест системы

Вода бидистиллированная	
Магния хлорид, хч	ГОСТ 4165—78
Натрия хлорид, хч	ГОСТ 4233—77
Натрия додецилсульфат	
Спирт этиловый (ректификат)	ГОСТ 18300—87
Спирт изоамиловый	ГОСТ 5830—79
Натрия гидроокись	ГОСТ 4328—77
Двуокись кремния с размером частиц 0,5—10,0 микрон	
Фенол	
Хлороформ	ГОСТ 1248—72
тРНК	
Трис-(оксиметил)-аминометан	ТУ 6-09-4292—76
Тест-система для проведния полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени или аналогичная	
Тест-система ИФА для определения активности глутатион-S-трансферазы	
Тест-система ИФА для определения активности глутатионпероксидазы	
Тест-система биохимического анализа для определения активности глутатионредуктазы	
Тест-система биохимического анализа для определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	

Приложение 4
(справочное)

Пример апробации методики исследования показателей нарушения биотрансформации бензола в организме детей, проживающих в условиях хронического внешнесредового воздействия бензола

Результаты апробации предложенной методики показали: содержание бензола в атмосферном воздухе селитебной зоны по данным мониторинговых и натурных наблюдений в 2009—2010 гг. зафиксировано на уровне до 1,2 $ПДК_{сс}$ или 4 $RfC_{chr.}$; отсутствие фенола в атмосферном воздухе, что исключает его экзогенное ингаляционное поступление в организм.

В результате химико-аналитического обследования детей, проживающих в условиях хронического внешнесредового воздействия бензола и отсутствия аэрогенного поступления фенола (группа наблюдения, $n = 188$), установлено, что у детей группы наблюдения, по сравнению с детьми, проживающими вне зоны аэрогенного воздействия исследуемых химических веществ (контрольная группа, $n = 93$), в крови регистрируется бензол в 55 % случаев от числа обследованных детей, в моче – в 64 % случаев (табл. 1).

Таблица 1

Содержание бензола и фенола в биосредах детей, мг/дм^3

Вещество	Биосреда	Группа наблюдения	Контрольная группа	Достоверность различий ($p \le 0,05$)
Бензол	кровь	0,0182 ± 0,0025	нпо*	0,000
Фенол		0,118 ± 0,031	0,011± 0,008	0,004
Бензол	моча	0.0105 ± 0,0046	нпо*	0,000
Фенол		0.291 ± 0.097	0,208 ± 0,069	0,000
нпо* – ниже предела обнаружения: нпо бензола – 0,0035 мг/дм^3. При идентификации вещества в крови детей группы наблюдения ниже предела обнаружения в расчете средней концентрации использована ½ предела обнаружения				

Кроме этого, у 70 % детей группы наблюдения в крови установлена повышенная концентрация фенола, превышающая данный показатель у детей в группе сравнения в 10 раз. У 26 % детей группы наблюдения установлено повышенное содержание фенола в моче. При этом средняя концентрация данного соединения достоверно превысила в 1,4 раза аналогичный показатель у детей в группе сравнения.

При выполнении исследования состояния гена цитохрома Р-450, обеспечивающего первую фазу биотрансформации бензола, подсчиты-

вали процент гомозигот и гетерозигот. Анализ полученных данных выявил наличие патологической гомозиготы у 4 % детей исследуемой группы при отсутствии таковой в контроле. При этом распространенность минорного аллеля у детей группы наблюдения превышала его частоту в контроле (10 и 6 % соответственно). Распределение частот генов цитохрома Р-450 *CYP1A1* у детей представлены в табл. 2.

Таблица 2

Распределение частот генов цитохрома Р-450 *CYP1A1* у детей

Показатель	Генотип	Группа наблюдения, %	Контрольная группа, %
Ген цитохорма Р-450 *CYP1A1*	A/A*	4 (3)	0 (0)
	A/G**	17 (32)	23 (21)
	G/G***	81 (153)	77 (72)
	G****	90	89
	A*****	10	6

* Патологическая гомозигота.
** Гетерозигота.
*** Нормальная гомозигота.
**** Нормальный аллель.
***** Патологический аллель (минорный, мутантный)

При исследовании и оценке показателей глутатионовой системы, обеспечивающих вторую фазу биотрансформации бензола, анализировали средние значения активности ферментов и частоты регистрации выявленных отклонений показателей в группе наблюдения и контрольной группе. Результаты исследований представлены в табл. 3.

Таблица 3

Сравнительный анализ показателей функций глутатионовой системы у детей

Показатель	Группа наблюдения			Контрольная группа			Достоверность различий по средним значениям показателей ($P \le 0,05$)
	среднее значение в группе ($M \pm m$)	частота регистрации проб с отклонением от физиологической нормы, %		среднее значение в группе ($M \pm m$)	частота регистрации проб с отклонением от физиологической нормы, %		
		ниже	выше		ниже	выше	
ГлПО, нг/см^3	40,84 ± 4,15	21,7	17,4	30,64 ± 1,21	18,9	4,9	0,000
ГлР, Е/дм^3	80,55 ± 3,09	1,61	35,48	47,58 ± 3,42	0,0	48,28	0,000
Гл-6-Ф, Е/дм^3	3,18 ± 0,37	1,43	60,0	2,89 ± 0,43	18,2	9,1	0,308
ГлSTр, нг/см^3	79,04 ± 15,86	23,1	19,2	200,11 ± 35,8	25,4	5,08	0,000

При выполнении исследования анализируются средние значения активности ферментов и частота регистрации выявленных отклонений показателей в группе наблюдения и контрольной группе.

У детей группы наблюдения среднее значение активности глутатионпероксидазы (40,84 ± 4,15) нг/см^3 в сыворотке крови достоверно превысило в 1,3 раза значение данного показателя у детей в контроле. При этом частота регистрации проб с повышенной активностью глутатионпероксидазы (17 % случаев от общего количества обследованных детей) в 4 раза превысила показатель в контрольной группе, что свидетельствует о реализации функции глутатионпероксидазы – защита глутатиона от окислительного повреждения бензолом.

Средняя активность глутатионредуктазы в сыворотке крови детей группы наблюдения составила (80,55 ± 3,09) Е/дм^3, что в 1,7 раза выше данного показателя у детей контрольной группы. Доля проб с повышенной активностью глутатионредуктазы у детей группы наблюдения составила 35 % от общего количества обследованных, что достоверно в 1,4 раза ниже частоты регистрации повышенной активности данного фермента у детей контрольной группы (p = 0,000). Зарегистрирована повышенная активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в сыворотке крови детей группы наблюдения в 60 % случаев, что в 7 раз выше данного показателя в контрольной группе.

Отмечается дисфункция глутатион-S-трансферазы в виде снижения ее активности у детей группы наблюдения (79,04 ± 15,86) нг/см^3 в 2,5 раза относительно аналогичного показателя у детей контрольной группы, что свидетельствует о низкой конъюгации глутатиона с промежуточным метаболитом бензола – фенолом.

Полученные результаты свидетельствуют о сохранении функции ферментов глутатионовой системы, обеспечивающих восстановление глутатиона для дальнейшего связывания его с фенолом, и нарушении процесса конъюгации и выведения фенола из организма, что может привести к его накоплению в биосредах.

Учитывая выявленную дисфункцию глутатион-S-трансферазы для подтверждения нарушения процесса биотрансформации бензола, необходимо в дальнейшем оценивать состояние гена данного фермента – GSTP1 (A313G, C341G), ответственного за вторую фазу детоксикации бензола. То есть, для определения степени распространенности наследственно-обусловленных генетических изменений у лиц, подвергающихся хроническому внешнесредовому аэротехногенному воздействию бензола (для последующего исключения их из исследований), необходимо оценивать состояние гена цитохрома Р-450 *CYP1A1* (T6235C-9893A/G),

ответственного за первую фазу детоксикации, и гена *GSTP1* (A313G, C341G), ответственного за вторую фазу детоксикации.

Накопление бензола и фенола в крови и моче может привести к развитию неинфекционных соматических заболеваний критических органов и систем. Выполненная оценка заболеваемости обследованных детей группы наблюдения показала, что частота регистрации анемии (23 % случаев от общего числа обследованных) и астеноневротического синдрома (19 %) превышает в 1,3 и 1,7 раза соответственно встречаемость аналогичных заболеваний у детей контрольной группы (16 и 10 % соответственно). Достоверно установлена причинно-следственная связь между содержанием бензола в атмосферном воздухе и уровнем заболеваемости детей анемией (OR = 1,3; DI = 1,11—3,38), астеноневротическим синдромом (OR = 2,40; DI = 1,80—4,23).

Полученные результаты свидетельствуют о нарушении процесса биотрансформации бензола в организме детей, проживающих в условиях внешнесредового аэрогенного воздействия.

gost.e-ecolog.ru