(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0078180
(43) 공개일자 2020년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61B 5/00 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61B 5/4884 (2013.01)
G01N 33/48 (2019.01)
(21) 출원번호 10-2018-0167831
(22) 출원일자 2018년12월21일
심사청구일자 2018년12월21일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김유진
서울특별시 강서구 양천로67길 77, 101동 508호(염창동, 우성1차아파트)
권오란
서울특별시 용산구 서빙고로 69(용산동5가, 파크타워아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

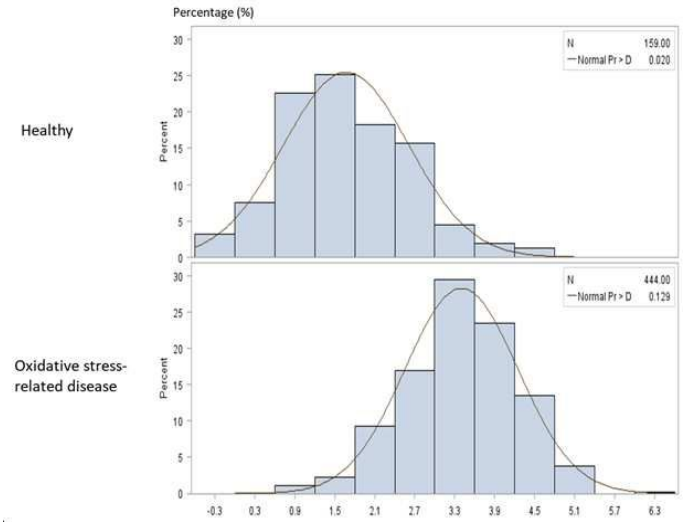
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **산화적 스트레스 수준을 측정하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 산화적 스트레스를 측정하는 방법에 관한 것으로서, 더욱 자세하게는 산화적 스트레스를 정량적으로 측정하는 방법을 제공하는 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
G01N 2800/7009 (2013.01)
(72) 발명자
김지연
서울특별시 서초구 고무래로 35, 103동 804호(반포동, 반포리체아파트)
임예니
서울특별시 강남구 삼성로 640, 305호(삼성동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012M3A9C4048761
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업-바이오의료기술개발사업
연구과제명 인체시험기반 MC/MT 효능검증 기술개발
기 여 율 1/2
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2018.07.01 ~ 2022.03.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1A6A3A11034115
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)(2017)-학문후속세대양성사업(리서치펠로우)
연구과제명 산화 스트레스에 대한 건강정량지표 발굴
기 여 율 1/2
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2017.06.01 ~ 2020.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

시험 대상에서 측정된 산화적 스트레스 수준의 영향 인자를 이용하여, 시험 대상의 산화적 스트레스 정도를 정량하는 단계를 포함하며,

상기 산화적 스트레스 수준의 영향 인자는, 시험 대상의 연령, 흡연여부, 혈장 지질 과산화물 농도, 전혈 백혈구 수, 및 알라닌 아미노전이효소 농도로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인,

시험 대상의 산화적 스트레스 수준의 측정 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 영향 인자는 각 영향 인자들의 추정량을 고려하여 가중치가 부여되고, 상기 추정량의 고려는, 도구변수추정 (instrumental variable estimation), 보통최소제곱추정 (ordinary least square estimation), 비선형 최소제곱추정 (non-linear least square estimation), 반복가중최소제곱 (iterative weighted least square estimation), 최대 가능성우도 추정 (maximum likelihood estimation), 제한된 최대우도추정 (restricted maximum likelihood estimation), 및 미분방정식을 사용하지 않는 제한최대우도추정 (derivative-free restricted maximum likelihood estimation)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 방법으로 수행되는 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 시험 대상의 산화적 스트레스의 정도는, 하기 수학식 1을 이용하여 결정되는 것인, 방법:

[수학식 1]

$$Y = (-5.85) + (0.07) * Age + (0.57) * Smoking + (0.36) * MDA + (0.88) * WBC + (1.01) * GPT$$

Y는 산화적 스트레스의 정도의 계산값이며, 단위는 점(score)이고,

Age는 대상자의 만 연령으로서 단위는 세이고,

Smoking은 대상자의 흡연여부로서 대상자가 흡연할 경우 1, 대상자가 비흡연 또는 금연한지 1년 이상인 경우 0;

MDA는 대상자의 혈장 지질 과산화물로서 단위는 μM;

WBC는 대상자의 전혈 검체에서 측정된 백혈구 수로서 단위는 $x10^3/\mu\ell$;

GPT는 대상자의 알라닌 아미노전이효소 수치로서 단위는 IU/L이다.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 시험대상의 Y가 2.7점 이상일 때, 상기 시험대상은 산화 스트레스를 가지는 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 시험대상은 인간, 생쥐, 마우스, 햄스터, 래트, 기니피그, 토끼, 소, 개, 고양이, 닭, 곤충, 개구리, 포유류, 영장류, 파충류, 양서류, 및 설치류로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 방법.

청구항 6

후보물질이 투여되기 전과 투여된 후 시험대상에서 산화적 스트레스 수준을 측정하고, 상기 후보물질의 투여 전 및 투여 후에 측정된 산화적 스트레스 수준을 비교하고, 상기 후보물질이 투여된 후 측정된 산화적 스트레스 수준이, 상기 후보물질이 투여되기 전 측정된 산화적 스트레스 수준보다 감소한 경우, 상기 후보물질을 항산화 물

질로 선정하는 단계를 포함하며,

상기 시험대상의 산화적 스트레스 수준을 측정하는 것은,

시험대상의 산화적 스트레스 수준의 영향 인자를 이용하여, 시험 대상의 산화적 스트레스 정도를 정량하는 단계를 포함하며,

상기 산화적 스트레스 수준의 영향 인자는, 시험대상의 연령, 흡연여부, 혈장 지질 과산화물 농도, 전혈 백혈구 수, 및 알라닌 아미노전이효소 농도로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인,

항산화 물질의 스크리닝 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 영향 인자는 각 인자들의 추정량을 고려하여 가중치가 부여되고, 상기 추정량은 도구변수 추정 (instrumental variable estimation), 보통최소제곱추정 (ordinary least square estimation), 비선형 최소제곱추정 (non-linear least square estimation), 반복가중최소제곱 (iterative weighted least square estimation), 최대 가능성우도 추정 (maximum likelihood estimation), 제한된 최대우도추정 (restricted maximum likelihood estimation), 및 미분방정식을 사용하지 않는 제한최대우도추정 (derivative-free restricted maximum likelihood estimation)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 방법으로 고려되는 것인, 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 산화적 스트레스 수준은, 하기 [수학식 1]을 이용하여 측정되는 것인, 방법.

[수학식 1]

$$Y = (-5.85) + (0.07) * Age + (0.57) * Smoking + (0.36) * MDA + (0.88) * WBC + (1.01) * GPT$$

Y는 산화적 스트레스의 정도의 계산값이며, 단위는 점(score)이고,

Age는 대상자의 만 연령으로서 단위는 세이고,

Smoking은 대상자의 흡연여부로서 대상자가 흡연할 경우 1, 대상자가 비흡연 또는 금연한지 1년 이상인 경우 0;

MDA는 대상자의 혈장 지질 과산화물로서 단위는 μM;

WBC는 대상자의 전혈 검체에서 측정된 백혈구 수로서 단위는 $x10^3/\mu\ell$;

GPT는 대상자의 알라닌 아미노전이효소 수치로서 단위는 IU/L이다.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 시험대상은 인간, 생쥐, 마우스, 햄스터, 래트, 기니피그, 토끼, 소, 개, 고양이, 닭, 곤충, 개구리, 포유류, 영장류, 파충류, 양서류, 및 설치류로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 후보물질이 투여되기 전 시험대상에서, 상기 [수학식 1]을 이용하여 측정된 산화적 스트레스의 정도의 계산값은 2.7점 이상인, 방법.

청구항 11

제6항에 있어서, 상기 후보물질은 식품인, 방법.

청구항 12

시험대상의 산화적 스트레스 수준을, 정상 대조군에서 측정된 산화 스트레스 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 산화적 스트레스 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법으로서,

상기 시험대상의 산화적 스트레스 수준을 측정하는 것은,

대상자의 연령, 흡연여부, 혈장 지질 과산화물 농도, 전혈 백혈구 수, 및 알라닌 아미노전이효소 농도로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 산화적 스트레스 수준의 영향 인자를 측정하고,

상기 영향 인자의 측정값을 이용하여 시험 대상의 산화적 스트레스의 정도를 결정하는 단계를 포함하는 것인,

산화적 스트레스 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 영향 인자는 각 인자들의 추정량을 고려하여 가중치가 부여되고, 상기 추정량은 도구변수추정 (instrumental variable estimation), 보통최소제곱추정 (ordinary least square estimation), 비선형 최소제곱추정 (non-linear least square estimation), 반복가중최소제곱 (iterative weighted least square estimation), 최대 가능성우도 추정 (maximum likelihood estimation), 제한된 최대우도추정 (restricted maximum likelihood estimation), 및 미분방정식을 사용하지 않는 제한최대우도추정 (derivative-free restricted maximum likelihood estimation)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 방법으로 고려되는 것인, 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 산화적 스트레스 수준은, 하기 [수학식 1]을 이용하여 측정되는 것인, 방법.

[수학식 1]

$$Y = (-5.85) + (0.07) * Age + (0.57) * Smoking + (0.36) * MDA + (0.88) * WBC + (1.01) * GPT$$

Y는 산화적 스트레스의 정도의 계산값이며, 단위는 점(score)이고,

Age는 대상자의 만 연령으로서 단위는 세이고,

Smoking은 대상자의 흡연여부로서 대상자가 흡연할 경우 1, 대상자가 비흡연 또는 금연한지 1년 이상인 경우 0;

MDA는 대상자의 혈장 지질 과산화물로서 단위는 μM;

WBC는 대상자의 전혈 검체에서 측정된 백혈구 수로서 단위는 $x10^3/\mu\ell$;

GPT는 대상자의 알라닌 아미노전이효소 수치로서 단위는 IU/L이다.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 정상 대조군에서 상기 [수학식 1]을 이용하여 측정된 산화적 스트레스의 정도의 계산값은 2.7점 미만인, 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 시험대상은 인간, 생쥐, 마우스, 햄스터, 래트, 기니피그, 토끼, 소, 개, 고양이, 닭, 곤충, 개구리, 포유류, 영장류, 파충류, 양서류, 및 설치류로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 방법.

청구항 17

제12항에 있어서, 상기 산화적 스트레스 관련 질환은, 뇌졸중, 심근경색, 불임, 간염, 관절염, 백내장, 노화, 조직 내 지질과산화물 과생성, 및 세포막의 지질과산화물 축적으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 산화적 스트레스 수준을 측정하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는 대상자의 특성을 고려하여 산화적 스트레스 추정 수식을 개발하고, 정량화된 점수를 바탕으로 대상자의 산화적 스트레스 수준을 평가하는 방법과 이를 이용하여 항산화 물질 또는 식품 소재의 중재효과 판정을 위한 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 활성산소(free radical)은 체내의 대사과정에서 발생하는 반응 부산물로, 인체에 부정적 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 과다한 활성산소는 세포막에 지질과산화물을 축적시켜 뇌졸중, 심근경색 등의 질환을 유발할 위험성이 있으며, 이의 예방적 또는 진단적 차원에서 인체 내 활성산소의 양을 측정하는 것은 대단히 중요하나, 활성산소는 반응성이 매우 뛰어나 직접적으로는 측정하기 어려움이 있다.

[0003] 건강에 대한 관심은 계속해서 높아지고 있으며, 특히 산화적 스트레스에 의한 노화 및 질병에 대한 관심이 나날이 증가하고 있으나, 산화의 정도를 객관적으로 측정할 수 있는 방법은 없는 실정이다. 또한, 산화적 스트레스와 불임, 간염, 관절염, 백내장 등의 관련성이 최근 연구를 통해 밝혀지고 있으며, 이에 산화적 스트레스를 객관적으로 측정할 수 있는 방법의 필요성이 높아지고 있고, 산화적 스트레스를 예방 및 개선할 수 있는 식품에 대한 수요도 증가하고 있는 추세이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 위와 같은 문제점을 해결하기 위해, 산화적 스트레스를 정량적으로 측정할 수 있는 방법 및 이를 이용한 항산화 물질 후보군의 스크리닝 방법을 제공하기 위한 것이다.

[0005] 본 발명은 인구집단으로부터 확보한 임상정보와 산화 스트레스 관련 데이터를 수집, 분석하여 개체의 산화적 스트레스를 평가할 수 있는 정량화 방법을 개발하였고, 내부 검증을 수행하였다. 또한, 이러한 산화적 스트레스의 정량화 방법이 영양중재 시행에 따른 변화까지 측정 가능한지 알아보기 위해, 항산화 식품 소재를 이용한 별도의 임상연구 자료를 활용하여 외부 검증 과정을 수행하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 대상자의 특성을 고려하여 산화적 스트레스 추정 수식을 개발하고, 정량화된 점수를 바탕으로 대상자의 산화적 스트레스 수준을 평가하는 방법과 이를 이용하여 항산화 물질 또는 식품 소재의 중재효과 판정을 위한 방법에 관한 것이다.

[0007] 본 발명의 일예는, 시험 대상에서 측정된 산화적 스트레스 수준의 영향 인자를 이용하여, 시험 대상의 산화적 스트레스 정도를 정량하는 단계를 포함하며, 상기 산화적 스트레스 수준의 영향 인자는, 시험 대상의 연령, 흡연여부, 혈장 지질 과산화물 농도, 전혈 백혈구 수, 및 알라닌 아미노전이효소 농도로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 시험 대상의 산화적 스트레스 수준의 측정 방법에 관한 것이다.

[0008] 본 발명의 추가 일예는 후보물질이 투여되기 전과 투여된 후 시험대상에서 측정된 산화적 스트레스 수준을 비교하고, 상기 후보물질이 투여된 후 측정된 산화적 스트레스 수준이, 상기 후보물질이 투여되기 전 측정된 산화적 스트레스 수준보다 감소한 경우, 상기 후보물질을 항산화 물질로 선정하는 단계를 포함하며,

[0009] 상기 시험대상의 산화적 스트레스 수준을 측정하는 것은,

[0010] 시험대상의 산화적 스트레스 수준의 영향 인자를 이용하여, 시험 대상의 산화적 스트레스 정도를 정량하는 단계를 포함하며,

[0011] 상기 산화적 스트레스 수준의 영향 인자는, 시험대상의 연령, 흡연여부, 혈장 지질 과산화물 농도, 전혈 백혈구 수, 및 알라닌 아미노전이효소 농도로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 항산화 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 일예는, 시험대상의 산화적 스트레스 수준을, 정상 대조군에서 측정된 산화 스트레스 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 산화적 스트레스 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법으로서,

[0013] 상기 시험대상의 산화적 스트레스 수준을 측정하는 것은,

[0014] 대상자의 연령, 흡연여부, 혈장 지질 과산화물 농도, 전혈 백혈구 수, 및 알라닌 아미노전이효소 농도로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 산화적 스트레스 수준의 영향 인자를 측정하고,

[0015] 상기 영향 인자의 측정값을 이용하여 시험 대상의 산화적 스트레스의 정도를 결정하는 단계를 포함하는 것인, 산화적 스트레스 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0016] 본 발명에 따른 산화적 스트레스 수준의 측정방법을 사용하면, 개체의 산화 스트레스 정도를 객관적으로 평가할 수 있으며, 정상 개체와 산화 스트레스 개체를 정확하게 구별해낼 수 있음을 확인하였다. 구체적으로, Leave-One-Out Cross Validation(LOOCV) 방식을 적용한 내부 검증 방법에서 AUC-ROC가 0.82(민감도 76.8%, 특이도 76.7%)로 도출되어, 본 발명에 따른 산화적 스트레스 수준의 측정방법의 정확성을 확인하였다.

[0017] 또한, 항산화 식품 소재의 중재 효과를 확인하는 인체적용연구 데이터를 활용한 외부 검증을 수행하며, 본 발명에 따른 산화적 스트레스 수준의 측정방법을 기반으로, 기저시점과 중재 종료시점의 산화적 스트레스 수준을 추정하여 대조군과 시험식품군을 비교한 결과, 항산화 식품 소재를 섭취한 군에서 산화 스트레스 수준이 유의미하게 감소함을 확인하여, 항산화 식품 소재의 중재효과 판정 도구로도 유용하게 이용될 수 있으며, 개인의 식품 소재 섭취에 반응한 항산화능의 변화 정도 또한 잘 예측할 수 있는 것으로 확인한 것이다.

[0019] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0020] 본 발명의 일예는 시험 대상에서 측정된 산화적 스트레스 수준의 영향 인자를 이용하여, 시험 대상의 산화적 스트레스 정도를 정량하는 단계를 포함하는, 시험 대상의 산화적 스트레스 수준의 측정 방법에 관한 것이다.

[0021] 본 발명의 일예에 따르면, 대상자의 연령, 흡연여부, 혈장 지질 과산화물 농도, 전혈 백혈구 수, 및 알라닌 아미노전이효소 농도로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 산화적 스트레스 수준의 영향 인자를 측정하고, 상기 영향 인자의 측정값을 이용하여 시험 대상의 산화적 스트레스의 정도를 정량하는 단계를 포함하는, 대상의 산화적 스트레스 수준의 측정 방법을 제공하는 것이다.

[0022] 상기 영향 인자는 각 인자들의 추정량을 고려하여 가중치가 부여되고, 상기 추정량은 도구변수추정(instrumental variable estimation), 보통최소제곱추정 (ordinary least square estimation), 비선형 최소제곱추정 (non-linear least square estimation), 반복가중최소제곱 (iterative weighted least square estimation), 최대 가능성우도 추정 (maximum likelihood estimation; MLE), 제한된 최대우도추정 (restricted MLE), 및 미분방정식을 사용하지 않는 제한최대우도추정 (derivative-free restricted MLE, DF REML)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 방법으로 고려되는 것일 수 있다.

[0023] 상기 시험대상은 인간, 생쥐, 마우스, 햄스터, 래트, 기니피그, 토끼, 소, 개, 고양이, 닭, 곤충, 개구리, 포유류, 영장류, 파충류, 양서류, 및 설치류로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0024] 상기 시험 대상의 산화적 스트레스의 정도는, 하기 [수학식 1]을 이용하여 판정되는 것일 수 있다:

수학식 1

[0025] $$Y = (-5.85) + (0.07) * Age + (0.57) * Smoking + (0.36) * MDA + (0.88) * WBC + (1.01) * GPT$$

[0026] Y는 산화적 스트레스의 정도의 계산값이며, 단위는 점(score)이고,

[0027] Age는 대상자의 만 연령으로서 단위는 세이고,

[0028] Smoking은 대상자의 흡연여부로서 대상자가 흡연할 경우 1, 대상자가 비흡연 또는 금연한지 1년 이상인 경우 0;

[0029] MDA는 대상자의 혈장 지질 과산화물로서 단위는 μM;

[0030] WBC는 대상자의 전혈 검체에서 측정된 백혈구 수로서 단위는 $x10^3/\mu\ell$;

[0031] GPT는 대상자의 알라닌 아미노전이효소 수치로서 단위는 IU/L이다.

[0033] 상기 대상의 산화적 스트레스 수준의 측정 방법은, 상기 계산된 시험대상의 산화 스트레스의 정도의 계산값 Y가 2.7점 이상일 때, 상기 시험대상은 산화 스트레스를 가지는 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명에서 "산화적 스트레스 (oxidative stress)"란 생체 세포에서 활성산소종 (산소이온, 유리 라디칼, 과산화물 등)의 발생과 이를 소거하는 항산화능력 간의 불균형 또는 그 물질로 인한 손상을 복원하는 항산화 방어기전 (antioxidant defense mechanism)의 불균형으로 인하여 세포 단백질, 지질, 핵산의 산화 손상을 일으키는 상

태라고 정의할 수 있다. 이러한 산화적 스트레스는 인체에서 노화 과정뿐 아니라 대사증후군, 고혈압, 심혈관 질환, 고지혈증, 당뇨병, 허혈-재관류 손상, 암, 만성 염증 및 신경계 질환 등의 중요한 발병기전의 주요한 인자로 추정되고 있다. (J Nutr Biochem 2013, 24:1183-1201; Inflammation, Aging, and Oxidative Stress. Springer; 2016: 95-106; Aging Dis 2015, 6:109-120.)

[0035] 본 발명에서 "산화 스트레스 군"은 산화적 스트레스 수준이 높은 것으로 이미 판정된 개체들의 집합을 의미하며, 생체 내 작용기전 또는 임상적으로 보고된 문헌 고찰 등의 방법을 통해, 산화적 스트레스 수준이 높을 것으로 판정된 개체들의 집합을 말한다.

[0036] 본 발명에서 "바이오 정보"는 개체의 생물학적 정보를 뜻하며, 예를 들어 연령, 항산화 식품의 섭취 수준, 흡연 유무, 혈장/적혈구/뇨 중 지질과산화물의 농도, 혈장 항산화영양소 수치, 백혈구 수, 호염기구 수치, 단구 수치, 알라닌 아미노전이효소 수준, 아스파테이트 아미노전이효소 수준, 감마글루타밀 전이효소 수준, 알칼라인 포스파타아제 수준, 알부민 수준, 적혈구용적률, 적혈구 침강속도, C-반응성 단백질(C-reactive protein) 수준, 요산 수준 등의 정보일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명은 개체의 산화적 스트레스 수준을 측정하는 방법에 관한 것으로, 산화 스트레스 군에서 측정된 복수의 바이오 정보 및 정상 군에서 측정된 복수의 바이오 정보를 비교하여, 산화적 스트레스 수준의 영향 인자를 선별하는 단계; 상기 선별된 인자들의 추정량을 고려하여 상기 선별된 인자들에 가중치를 부여하는 단계; 및 상기 가중치가 부여된 인자를 이용하여 시험 대상의 산화적 스트레스의 정도를 판정하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0038] 본 발명에서 산화 스트레스 군에서 측정된 복수의 바이오 정보 및 정상 군에서 측정된 복수의 바이오 정보를 비교하여, 산화적 스트레스 수준의 영향 인자를 선별하는 단계는, 산화 스트레스 군 및 정상 군에서 각각 측정된 바이오 정보를 비교하고, 정상 군과 대비하여 산화 스트레스 군에서 유의미한 차이를 보이는 인자를 산화적 스트레스와 연관된 인자로 선별하는 단계이다. 상기 연관된 인자를 선별하는 것은, 위계적 혼합 모형을 이용하여 선별하는 것일 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서는 서울특별시 보라매병원 건강진단센터에 방문한 만 19세 이상 한국 성인 남녀의 건강검진과 혈액 분석 결과 등의 바이오 정보를, 정상 군과 산화 스트레스 관련 질환을 가진 군을 위계적 혼합 모형을 통해 비교하여, 유의미한 차이를 보이는 바이오 정보를 산화 스트레스와 연관된 인자로 선정하였다(실시예 1-2). 구체적으로, 위계적 혼합 모형(mixed hierarchical model) 결과, 대상자의 연령, 흡연여부, 혈장 지질 과산화물(malondialdehyde; MDA), 전혈 백혈구 수(white blood cell counts; WBC), 및 알라닌 아미노전이효소(glutamate pyruvate transaminase; GPT) 수준이 산화 스트레스 수준을 예측할 수 있는 유의미한 인자임을 확인하였다.

[0039] 상기 위계적 혼합 모형(mixed hierarchical model)은, 개인과 군집 수준의 변수가 혼합된 다층구조를 가지므로 일반적인 회귀모형의 가정에 맞지 않는 자료에 대해서 적절하게 분석할 수 있는 통계적 분석방법이다 (Raudenbush SW, Bryk AS. Hierarchical linear models: Applications and data analysis methods. Sage; 2002.). 위계적 선형회귀모형은 반응변수에 영향을 미치는 요인들 또는 예측변수 중에서 랜덤효과와 고정효과를 구별하여 정하고 동시에 포함시킬 수 있는 혼합모형(mixed model)이다. 본 발명에서는 개인의 산화적 스트레스 수준을 추정하기 위해 개인 수준의 특성과 바이오 지표를 고려하는 다층구조 하에서 위계적 선형모형을 활용하였으며, 연령과 개인의 특성 변수들이 개인별 산화적 스트레스 수준에 미치는 영향을 분석하기 위하여 고정효과(fixed effect)와 랜덤효과 (random effect)로 나누어 분석하였다. 확률적 모형식은 다음과 같다.

[0040] 1-수준:

[0041] $$y_{ij} = \beta_{0j} + \beta_{0j}x_{1j} + \beta_{2j}x_{2j} + \cdots + \beta_{pj}x_{pj} + e_{ij}$$

[0042] 2-수준:

[0043] $$\beta_{0j} = \gamma_{00} + \gamma_{01}z_{01} + \gamma_{02}z_2 + \gamma_{03}z_3 + u_{0j},$$

[0044] $$\beta_{kj} = \gamma_{k0} + u_{kj}, u_{kj} \sim N(0, r_{kk}^2), k = 1, \cdots, p, j = 1, \cdots, j.$$

[0045] 1-수준 모형은 고정변수만 고려한 전통적인 선형회귀모형이며, 여기 해당하는 변수들은 산화적 스트레스 수준에 미치는 영향력이 연령에 상관없이 고정되어 있다고 가정하는 모형이다. Y_{ij}는 j번째 속하는 i번째 개인의 산화적 스트레스 수준을 의미하고, $x_{1j} + \cdots + x_{pj}$는 1-수준 변수이고, 회귀계수 $\beta_k,\ k = 1, \cdots, p$는 고정된 상수이다.

2-수준에서 추정된 회귀계수는 고정된 상수가 아니라 확률 변수로 가정한다. Z는 혼합 모형에 대한 변수를 의미하고, 회귀계수 β_{kj}는 랜덤효과를 나타내는 확률변수를 의미한다. u_{kj}는 2-수준 j에 따라서만 값이 달라지며, j 군집 내에서는 모든 관측치 i가 동일한 값을 갖는다.

[0046] 본 발명에서 선별된 인자들의 추정량을 고려하여 선별된 인자들에 가중치를 부여하는 단계는, 선별된 각 인자들이 산화 스트레스 수준에 미치는 영향력에 따라 가중치를 부여하여, 각 인자들의 산화 스트레스 수준에 미치는 영향력을 반영할 수 있도록 조정하는 단계이다. 산화적 스트레스 수준과 연관된 인자들 중, 산화적 스트레스와 큰 연관성이 있는 인자는 높은 가중치를 부여하고, 비교적 연관성이 적은 인자는 제외하여, 최종적으로 산화 스트레스 도출 시 더욱 정확한 정량화가 가능하다. 상기 추정량은, 도구변수추정 (instrumental variable estimation), 보통최소제곱추정 (ordinary least square estimation), 비선형 최소제곱추정 (non-linear least square estimation), 반복가중최소제곱 (iterative weighted least square estimation), 최대 가능성우도 추정 (MLE), 제한된 최대우도추정 (RMLE), 및 미분방정식을 사용하지 않는 제한최대우도추정 (DF REML)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 방법으로 고려될 수 있으며, 바람직하게 RMLE를 통해 도출될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 상기 제한된 제한된 최대우도추정 (RMLE) 방법은, 선형 혼합 효과 모형의 모수값을 추정하기 위하여 제한 우도 함수를 최대화시키는 방법으로 잔차를 기반으로 우도를 생성하고 이로부터 분산들의 최대우도추정량을 얻는다. 이 방법을 기반으로 적합된 통계량은 동일한 평균 모델을 기반으로 한 서로 다른 공분산 모델을 비교하는 데 사용될 수 있다. 일반적으로 REML의 해는 balanced data의 ANOVA 추정량과 같으며, 최대 가능성우도 추정 (MLE) 방법보다 데이터의 이상치에 덜 민감하며, 비편향(unbiased) 분산을 갖게 한다.

[0048] 예를 들어, 본 발명에서 산화적 스트레스의 정도를 판정하는 것은, 하기 수학식 1을 이용하여 판정하는 것일 수 있다:

[0049] [수학식 1]

[0050] $$Y = (-5.85) + (0.07) * Age + (0.57) * Smoking + (0.36) * MDA + (0.88) * WBC + (1.01) * GPT$$

[0051] 상기 수학식 1에서 각 변수는 다음과 같이 정의된다:

[0052] Y는 산화스트레스 수준의 계산값이며, 단위는 점(score)이고,

[0053] Age는 대상자의 만 연령으로서 단위는 세이고,

[0054] Smoking은 대상자의 흡연여부로서 대상자가 흡연할 경우 1, 대상자가 비흡연 또는 금연한지 1년 이상인 경우 0;

[0055] MDA는 대상자의 혈장 지질 과산화물로서 단위는 μM;

[0056] WBC는 대상자의 전혈 검체에서 측정된 백혈구 수로서 단위는 $x10^3/\mu\ell$;

[0057] GPT는 대상자의 알라닌 아미노전이효소 수치로서 단위는 IU/L이다.

[0059] 본 발명에서 시험대상의 산화적 스트레스의 정도를 정량하는 단계는, 상기 선별된 인자들에 시험대상의 생물학적 정보를 대응시키고, 상기 부여된 가중치를 반영하여 이를 보정하여, 최종적으로 시험대상의 산화적 스트레스 정도를 판정하는 단계이다. 예를 들어, 상기 수학식 1에 시험대상의 각 정보를 대입하여 산화적 스트레스 수준의 수치화된 값을 얻을 수 있다.

[0060] 상기 도출된 산화적 스트레스 수준의 수치화된 값이 2.0이상, 2.1이상, 2.2이상, 2.3이상, 2.4이상, 2.5이상, 2.6이상, 2.7이상, 2.8이상, 2.9이상, 3.0이상, 3.1이상, 3.2이상, 3.3이상, 3.4이상, 또는 3.5이상일 때, 상기 시험대상은 산화적 스트레스를 가지는 것으로 판정될 수 있으며, 보다 바람직하게, 상기 도출된 산화적 스트레스 수준의 수치화된 값이 2.7 이상일 때, 상기 시험대상은 산화적 스트레스를 가지는 것으로 판정될 수 있다.

[0061] 본 발명의 또 다른 일예는 시험 대상에게 후보물질이 투여되기 전과 투여된 후에 산화적 스트레스 수준의 영향인자를 이용하여, 시험 대상의 산화적 스트레스 정도를 정량하는 단계를 포함하는, 항산화 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0062] 본 발명의 또 다른 일예에 따르면, 후보물질이 투여되기 전 시험대상에서 측정된 산화적 스트레스 수준; 및 상기 후보물질이 투여된 후 시험대상에서 측정된 산화적 스트레스 수준을 비교하여, 상기 후보물질이 투여된 후 측정된 산화적 스트레스 수준이, 상기 후보물질이 투여되기 전 산화적 스트레스 수준 대비 감소한 경우, 상기 후보물질을 항산화 물질로 선정하는 단계를 포함하며, 상기 시험대상의 산화적 스트레스 수준을 측정하는 것은, 대상자의 연령, 흡연여부, 혈장 지질 과산화물 농도, 전혈 백혈구 수, 및 알라닌 아미노전이효소 농도로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 산화적 스트레스 수준의 영향 인자를 측정하고, 상기 영향 인자의 측정값을 이용하여 시험 대상의 산화적 스트레스의 정도를 판정하는 단계를 포함하는 것인, 항산화 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0063] 상기 후보물질은 항산화 활성을 가질 것으로 예상되는 물질, 예를 들면, 약물, 또는 식품일 수 있으며, 바람직하게는 식품일 수 있다.

[0064] 본 발명에서 용어 "식품"은, 통상적인 의미의 식품을 모두 포함하며, 음료, 캔디, 분말 등의 형태일 수 있으며, 예를 들어 건강기능성 식품, 또는 건강 식품일 수 있다. 건강기능성 식품 (functional food)이란, 영양공급의 목적 외에도 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능성"이란, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 예를 들어, 본 발명에서 항산화 식품은, 개체의 산화 스트레스 정도를 낮추는 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 후보물질이 투여되기 전에 시험대상에서 측정된 산화적 스트레스 수준과, 후보물질이 투여된 후 시험대상에서 측정된 산화적 스트레스 수준을 비교하였을 때, 상기 후보물질이 투여된 후 측정된 산화적 스트레스 수준이, 상기 후보물질이 투여되기 전 측정된 산화적 스트레스 수준 대비 감소한 경우, 상기 후보물질이 식품일 때, 상기 후보물질을 항산화 식품으로 선정할 수 있다.

[0065] 본 발명에서 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의해 제조될 수 있으며, 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분이 첨가되어 제조될 수 있다. 또한, 상기 식품의 제형은 식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있다. 본 발명의 항산화 식품은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 등의 장점이 있고, 산화 스트레스를 저감하기 위한 보조제로 섭취 가능하다. 상기 건강 식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강 유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)는 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강기능식품, 건강식품, 및 건강보조식품의 용어는 혼용되어 사용된다. 구체적으로, 상기 건강기능식품은 개체에 투여되었을 때 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생 가능한 부작용이 없는 장점이 있다. 본 발명에서 건강기능식품은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하여, 산화적 스트레스를 저감할 수 있는 효과를 가져올 수 있다.

[0066] 상기 영향 인자는, 상기 상술한 바와 같이, 각 인자들의 추정량을 고려하여 가중치가 부여되고, 상기 추정량은 도구변수추정 (instrumental variable estimation), 보통최소제곱추정 (ordinary least square estimation), 비선형 최소제곱추정 (non-linear least square estimation), 반복가중최소제곱 (iterative weighted least square estimation), 최대 가능성우도 추정 (MLE), 제한된 최대우도추정 (RMLE), 및 미분방정식을 사용하지 않는 제한최대우도추정 (DF REML)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 방법으로 고려되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0067] 본 발명에서 "개체", "시험개체", "시험대상", "대상", "대상자", 또는 "환자"는 인간, 생쥐, 마우스, 햄스터, 래트, 기니피그, 토끼, 소, 개, 고양이, 닭, 곤충, 개구리, 포유류, 인간을 제외한 포유류, 영장류, 인간을 제외한 영장류, 파충류, 양서류, 설치류 등을 포함하여 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상 또한 포함된다.

[0068] 상기 시험대상은, 상술한 바와 같이, 인간, 생쥐, 마우스, 햄스터, 래트, 기니피그, 토끼, 소, 개, 고양이, 닭, 곤충, 개구리, 포유류, 영장류, 파충류, 양서류, 및 설치류로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0069] 상기 산화적 스트레스 수준은, 상기 [수학식 1]을 이용하여 측정되는 것일 수 있다. 상기 항산화 물질의 스크리닝 방법에서, 상기 후보물질이 투여되기 전 시험대상에서, 상기 [수학식 1]을 이용하여 측정된 산화적 스트레스의 정도의 계산값은 2.7점 이상일 수 있다.

[0070] 본 발명의 일예는 시험대상의 산화적 스트레스 수준을, 정상 대조군에서 측정된 산화 스트레스 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 산화적 스트레스 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0071] 본 발명의 또 다른 일예에 따르면, 시험대상의 산화적 스트레스 수준을, 정상 대조군에서 측정된 산화 스트레스 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 산화적 스트레스 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법으로서, 상기 시험대상의 산화적 스트레스 수준을 측정하는 것은, 대상자의 연령, 흡연여부, 혈장 지질 과산화물 농도, 전혈 백혈구 수, 및 알라닌 아미노전이효소 농도로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 산화적 스트레스 수준의 영향 인자를 측정하고, 상기 영향 인자의 측정값을 이용하여 시험 대상의 산화적 스트레스의 정도를 판정하는 단계를 포함하는 것인, 산화적 스트레스 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0072] 상기 영향 인자는, 상기 상술한 바와 같이, 각 인자들의 추정량을 고려하여 가중치가 부여되고, 상기 추정량은 도구변수추정 (instrumental variable estimation), 보통최소제곱추정 (ordinary least square estimation), 비선형 최소제곱추정 (non-linear least square estimation), 반복가중최소제곱 (iterative weighted least square estimation), 최대 가능성우도 추정 (MLE), 제한된 최대우도추정 (RMLE), 및 미분방정식을 사용하지 않는 제한최대우도추정 (DF REML)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 방법으로 고려되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0073] 상기 산화적 스트레스 수준은, 상기 [수학식 1]을 이용하여 측정되는 것일 수 있다.

[0074] 상기 산화적 스트레스 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에서, 상기 정상 대조군에서 상기 [수학식 1]을 이용하여 측정된 산화적 스트레스의 정도의 계산값은 2.7점 미만일 수 있다.

[0075] 본 발명에서 산화적 스트레스 관련 질환은 체내의 활성산소로 인해 발생 가능한 증상, 또는 발명 가능한 질환 등을 모두 포괄하는 것으로, 예를 들면 체내 조직 내 지질과산화물 생성, 세포막의 지질과산화물 축적, 뇌졸중, 심근경색, 불임, 간염, 관절염, 백내장, 노화 등의 증상 또는 질병을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0076] 본 발명에 따른 산화적 스트레스 수준의 정량적 측정 방법은 항산화 식품 소재의 중재 효과를 확인하는 인체적용연구 데이터를 활용한 외부 검증을 수행하며, 기저시점과 중재 종료시점의 산화적 스트레스 수준을 추정하여 대조군과 시험식품군을 비교한 결과, 항산화 식품 소재의 중재효과 판정 도구로도 유용하게 이용될 수 있으며, 개인의 식품 소재 섭취에 반응한 항산화능의 변화 정도를 예측할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 대상자를 건강상태에 따라 건강군 및 산화 스트레스 질환군으로 분류하는 과정을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 산화 스트레스 측정 방법에 따라 계산된 대상자의 산화 스트레스 정도 추정의 분포를 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따른 산화 스트레스 측정 방법의 예측능력을 LOOCV 방식을 통해 검증한 ROC 곡선을 나타낸 것으로, 대각선(회색)은 기준선 0.5를 나타낸다.

도 4는 항산화 식품 소재 섭취군과 대조식품군의 산화 스트레스 수준을 본 발명에 따른 산화 스트레스 측정방법에 따라 측정해본 결과, 항산화 식품 소재 섭취군에서 산화 스트레스 수준이 유의미하게 감소한 것을 나타낸 그래프이다.

도 5는 추정량을 고려하였을 때의 산화적 스트레스 수준과, 추정량을 고려하지 않았을 때의 산화적 스트레스 수준을 도출하여 비교한 그래프로, 추정량을 고려한 경우에 산화 스트레스 질환 유무에 대한 변별력이 좋은 것을 알 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0078] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0080] **실시예 1: 산화 스트레스의 정량화 방법 개발**

[0081] 1-1: 산화 스트레스 관련 질환을 가진 환자의 분류

[0082] 만 19세 이상 한국 성인 남녀를 대상으로 건강한 대상자와 산화 스트레스 관련 질환을 가진 환자를 구분하는 예후 예측 모델을 개발하였다.

[0083] 구체적으로, 만 19세 이상 성인 남녀 중 연구 참여에 동의한 대상자(2017년 6월 기준 1,464명)에서 혈장 지질과산화물과 카로티노이드류(carotenoids) 수준을 분석하고, 식습관점수(recommended food score, RFS), 인구통계학 및 사회경제학적 특성과 설문지 응답결과를 수집하였다.

[0084] 이 중 식습관점수(RFS)의 데이터가 누락된 대상자, 대사 위험 요소를 적어도 1개 이상을 가지고 있거나, 대사질환을 가지고 있는 대상자(높은 허리둘레, 높은 중성지방 수준, 고혈당, 낮은 저밀도 콜레스테롤, 또는 고혈압을 가지는 대상자), 기타 다른 질병을 가지고 있는 대상자, 과거 질병 또는 치료 이력이 누락된 대상자, 지속적인 약물 치료중인 대상자를 우선 제외하였다. 대사 위험 여부는 미국 국립심폐혈액연구소(National Heart, Lung, and Blood Institute)에서 임상적으로 대사증후군을 진단하기 용이하도록 만든 NCEP ATP III 기준 지침(National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III)에서 제정한 기준(Circulation 2005;112:2735-52)을 바탕으로 판단하였다. 단, 진단 기준 중 허리둘레 항목은 한국인의 복부 비만 허리둘레 기준(Diabetes Res Clin Pract 2007;75:72-80)을 적용하였다.

[0085] (1) 허리둘레: 남자 90 cm 이상, 여자 85 cm 이상;

[0086] (2) 혈압: 수축기 혈압 130 mmHg 이상 또는 이완기 혈압 85 mmHg 이상;

[0087] (3) 공복 혈당: 110 mg/dL 이상;

[0088] (4) 중성지방: 150 mg/dL 이상;

[0089] (5) HDL(고밀도)-콜레스테롤: 남자 40 mg/dL 이하, 여자 50 mg/dL 이하.

[0091] 상기 제외된 대상자를 제외하고, 분석 가능한 대상자 603명으로 선정하였다. 상기 선정된 603명에 대해 건강상태에 따라 건강군(159명)과 산화 스트레스 질환군(444명)으로 분류하였다. 구체적으로, 대상자 중 어떠한 대사위험 요인이나 산화 스트레스와의 관련성이 보고된 질환이 없는 경우에 건강군으로 분류하였다. 산화 스트레스와 관련 질환으로는 당뇨 (J Biochem Mol Toxicol 2003, 17:24-38), 고지혈증 (Obes Res Clin Pract 2013, 7:e330-341), 비만 (J Clin Invest 2004, 114:1752-1761), 심혈관질환 (Nutr J 2007, 6:39), 뇌졸중 (Free Radic Biol Med 2005, 39:841-852), 고혈압 (Nutr J 2007, 6:39), 식이 관련 암(간, 대장, 위, 유방, 전립선, 폐; Lancet 2002, 360:861-868, World Health Organization 2003) 등이 있다.

[0092] 도 1은 대상자를 건강상태에 따라 건강군 및 산화 스트레스 질환군으로 분류하는 과정을 나타낸 것이다.

[0094] 1-2: 산화 스트레스 수준의 평가 인자 및 모델 구축

[0095] 최종 분석 가능한 대상자 603명에 대해 건강군과 산화 스트레스 질환군 사이에 유의확률이 0.05 미만으로 나타난 지표를 선택한 후, 위계적 혼합 모형(hierarchical linear mixed model)을 적용하였다.

[0096] 산화 스트레스와 관련된 임상 지표(연령) 중 랜덤효과 (random effect)로 연령을, 고정효과 (fixed effect)로는 성별, 흡연 여부, 혈장 지질과산화물 수준, 카로티노이드류, 항산화 식품 섭취 점수, 임상화학적지표 (알부민, 알칼라인 포스파타아제, C-반응성 단백질, 알라닌 아미노전이효소, 아스파테이트 아미노전이효소, 요산), 백혈구 감별계수 (호염구, 단구), 혈액학적 지표 (적혈구침강속도, 적혈구용적, 백혈구 수)를 사용하였다. 모형 내에서 산화 스트레스와 관련성이 높은 변수만 선택하기 위하여 가장 도움이 되지 않는 변수(유의확률이 0.05 이상)를 하나씩 제거하는 후진 소거법(backward elimination)과 다중공선성이 있는 변수를 제거하는 방법을 사용하였다.

[0097] 그 다음, 서로 다른 변수를 포함하는 모델의 적합성 검정은 가장 최소의 정보 손실을 갖는 모델이 가장 데이터와 적합한 모델로 선택된다는 가정으로 모델링을 하는 Akaike's information criterion (AIC) 방법을 적용하며, 최소의 AIC 값을 갖는 모델을 최적의 모델로 선택하였다. 최종 모델링 결과, 흡연 유무, 혈장 지질과산화물, 백혈구 수, 알라닌 아미노전이효소 수준이 산화 스트레스 수준을 평가할 수 있는 유의미한 인자(다중공선성이 없으면서 유의확률이 0.05 미만)임을 확인하였다. 최종적으로, 제한된 최대우도추정 (RMLE) 을 통해 도출된 각 인자의 추정량(parameter estimates)을 고려하여 산화 스트레스 평가 방법을 다음과 같이

수식화하였다.

[0098] [수학식 1]

[0099] $$Y = (-5.85) + (0.07) * Age + (0.57) * Smoking + (0.36) * MDA + (0.88) * WBC + (1.01) * GPT$$

[0100] Y는 산화 스트레스 수준의 계산값이며, 단위는 점(score)이고,

[0101] Age는 대상자의 만 연령으로서 단위는 세이고,

[0102] Smoking은 대상자의 흡연여부로서 대상자가 흡연할 경우 1, 대상자가 비흡연 또는 금연한지 1년 이상인 경우 0;

[0103] MDA는 대상자의 혈장 지질 과산화물로서 단위는 μM;

[0104] WBC는 대상자의 전혈 검체에서 측정된 백혈구 수로서 단위는 $x10^3/\mu\ell$;

[0105] GPT는 대상자의 알라닌 아미노전이효소 수치로서 단위는 IU/L이다.

[0107] 1-3: 산화 스트레스 수준의 평가 모델의 평가

[0108] 분석 가능한 대상자 603명에 대해, 최종 도출된 수학식 1을 통하여 산화 스트레스 점수를 재산출한 결과, 이 점수를 통해 건강한 사람과 산화 스트레스 질환을 가진 사람이 잘 구분되는 것으로 나타났다(도 2).

[0109] 도 2는 본 발명에 따른 산화 스트레스 측정 방법에 따라 계산된 대상자의 산화 스트레스 정도 추정의 분포를 나타낸 그래프로서, 가로축은 최종 도출된 수학식 1을 통하여 산출한 산화 스트레스 점수 (단위: 점)이고, 세로축은 각 구간의 백분율 (단위: %)이다.

[0111] **실시예 2: 산화 스트레스 수준의 평가 모델의 내부 검증**

[0112] 실시예 1에서 개발된 산화 스트레스 정량화 방법의 예측능력은 ROC(Receiver Operating Characteristic) curve와 LOOCV 분석을 통해, 내부 검증(internal validation)을 통해 검증하였다.

[0113] 내부 검증은 Leave-One-Out Cross Validation(LOOCV) 방식을 적용하여 수행하였다. 이 방법은 전체 데이터 수(N)만큼 군집화하여 하나하나 검정하는 전수 조사법으로 총 샘플 수에 해당하는 모형을 만들고, 각 모델을 만들 때에 하나의 샘플만 제외하면서 그 제외한 샘플로 테스트 집합(test set)의 성능(performance)을 계산하여 N개의 성능(performance)에 대해서 평균을 내는 방법이다.

[0114] 전체 훈련집합(training set)의 AUC-ROC(Area under the curve-ROC)는 0.91 (민감도 82.0%, 특이도 84.3%)로 도출되었다. LOOCV 방식을 적용한 교차 검증 결과, AUC-ROC가 0.82 (민감도 76.8%, 특이도 76.7%)로 도출되어 개발된 산화 스트레스 예후 예측 모델은 좋은 성능을 갖고 있다는 것을 확인할 수 있었다(도 3). 도 3은 본 발명에 따른 산화 스트레스 측정 방법의 예측능력을 LOOCV 방식을 통해 내부 검증한 ROC 곡선을 나타낸 것으로, 대각선(회색)은 기준선 0.5를 나타낸다. 도 3에서 Original과 LOOCV의 ROC 곡선 아래 영역(AUC-ROC)이 모두 0.8 이상으로 본 발명에 따른 산화 스트레스 측정 방법의 좋은 성능을 보인다는 것을 알 수 있었다.

[0116] **실시예 3: 항산화 식품 소재를 이용한 산화 스트레스 수준의 평가 모델의 검정**

[0117] 실시예 1에서 개발된 정량화 모델이 실제 영양중재효과를 반영하여 산화 스트레스 평가 점수를 변화시킬 수 있을지 확인하기 위하여, 별도의 항산화 식품 소재를 이용한 영양중재연구 데이터를 활용한 외부 검증(external validation) 방법을 진행하였다.

[0118] 구체적으로, 질환이 없는 건강한 성인을 대상으로 12주간 항산화 식품 소재의 중재 효과를 관찰하는 무작위배정, 이중맹검, 대조군 비교, 평행 연구 데이터(J Funct Foods, 2018;46:356-364)를 활용하였다. 만 20세 이상 50세 미만의 과체중이거나 또는 비만(BMI 25-30 kg/m^2, 골격근육량 39.8%(남성)/34.1%(여성) 이하)한 성인 남녀 80명(남성 20명, 여성 60명; 평균 연령 37.3세; 평균 체질량지수 27.3 kg/m^2; 공복혈당 91.3 mg/dL)를 항산화 식품 소재를 섭취하는 군 및 대조식품군으로 무작위 배정하였다. 항산화 식품 소재를 섭취하는 군에는 항산화와 항염증 활성이 보고된 씨폴리놀감태(*Ecklonia cava*)주정추출물(총 폴리페놀 함량 960 mg/g 함유)을

한 번에 2 캡슐씩 아침과 저녁 직후에 물과 함께 섭취시켰다.

[0119] 위 개발된 모델을 중재연구데이터에 적용하여 기저시점과 중재종료시점의 산화 스트레스 수준을 평가하고, 추정된 개인의 산화 스트레스 수준이 중재 전후에 차이가 있는지 분석하였다.

[0120] 항산화 식품 소재를 섭취하는 군과 대조식품군 간 비교를 수행한 결과, 항산화 식품 소재를 섭취한 군에서 실시예 1에서 개발된 정량화 모델에 따른 산화 스트레스 수준이 유의미하게 감소됨을 확인하였다(도 4).

[0121] 도 4는 항산화 식품 소재를 섭취한 군에서 실시예 1에서 개발된 정량화 모델에 따른 산화 스트레스 수준이 유의미하게 감소된 것을 나타낸 그래프이다. 연령을 랜덤효과로 포함하는 위계적 혼합 모형(mixed hierarchical model)으로부터 도출된 추정량(parameter estimates)을 고려하여 항산화 식품 소재를 섭취하는 군과 대조식품군의 기저시점과 중재 종료시점에서의 산화적 스트레스 수준을 계산하였다. 통계적 유의성은 항산화 식품 소재를 섭취하는 군 및 대조식품군에서 중재(intervention) 전후의 차이값(중재 종료시점 - 기저시점)을 군간 비교하여 확인하였다. 각 막대그래프는 평균 및 평균의 표준오차(standard error of mean)으로 표현되었다. 통계적 가설검정에서의 유의확률 P-value는 Student's t-test에 의해 결정되었다.

[0123] **실시예 4: 산화 스트레스 질환을 갖는 환자의 구별력 평가**

[0124] 추정량(Estimate)을 고려하였을 때의 산화적 스트레스 수준과 이를 고려하지 않았을 때의 산화적 스트레스 수준을 계산한 다음, 산화 스트레스 질환을 가진 사람을 얼마나 잘 판별할 수 있는지 평가하였다.

[0125] 구체적으로, 실시예 1-2에서 도출된 각 인자들에 적용된 추정량을 적용하지 않고, 원래의 측정값을 단순히 합산하여 아래 수학식 2와 같이 산화 스트레스 수준을 도출하였다.

수학식 2

[0126] $$Y = 1 * Age + 1 * Smoking + 1 * MDA + 1 * WBC + 1 * GPT$$

[0127] Y는 산화스트레스 수준의 계산값이며, 단위는 점(score)이고,

[0128] Age는 대상자의 만 연령으로서 단위는 세이고,

[0129] Smoking은 대상자의 흡연여부로서 대상자가 흡연할 경우 1, 대상자가 비흡연 또는 금연한지 1년 이상인 경우 0;

[0130] MDA는 대상자의 혈장 지질 과산화물로서 단위는 μM;

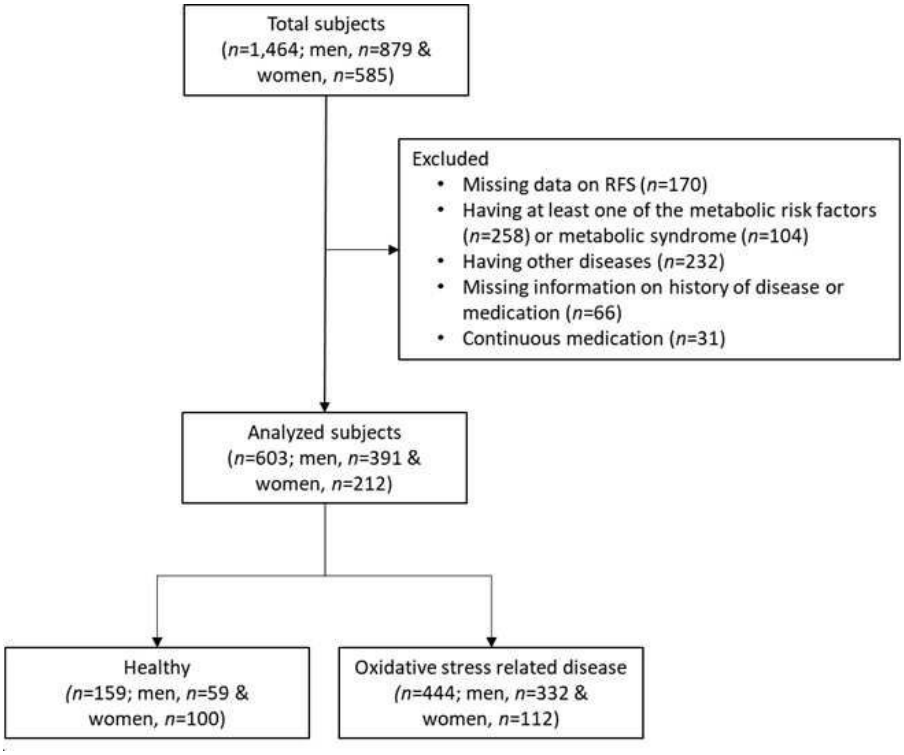
[0131] WBC는 대상자의 전혈 검체에서 측정된 백혈구 수로서 단위는 $x10^3/\mu\ell$;

[0132] GPT는 대상자의 알라닌 아미노전이효소 수치로서 단위는 IU/L이다.

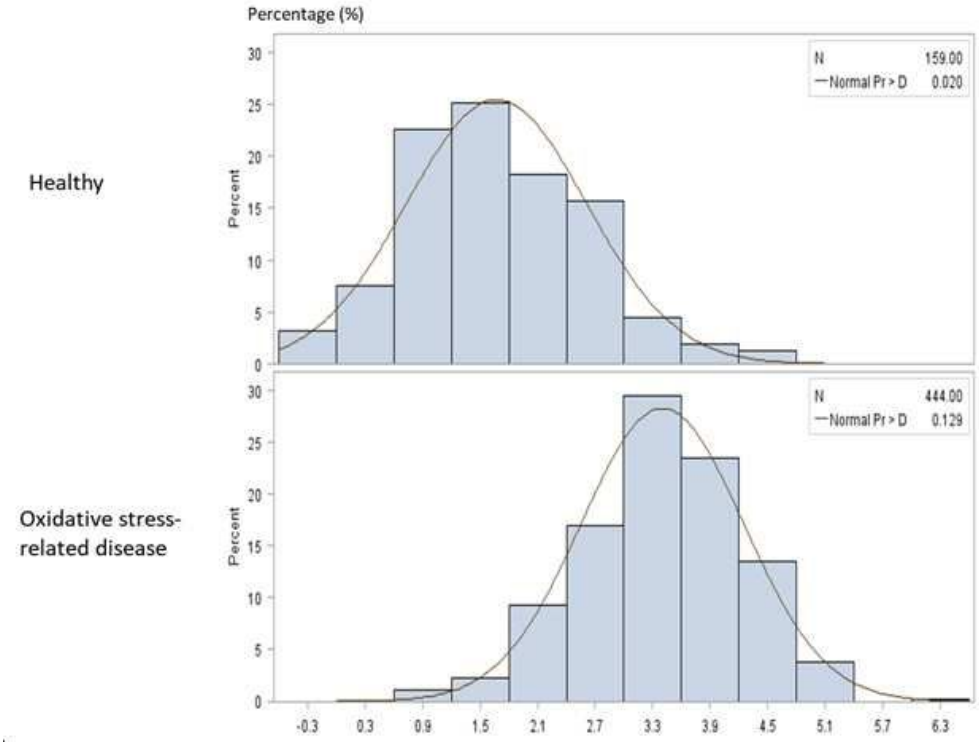
[0134] 추정량을 고려한 경우에는 AUC-ROC(Area under the curve-ROC)는 0.91 (민감도 82.0%, 특이도 84.3%; Youden index 0.66)로 도출되었다. 추정량을 고려하지 않은 경우에는, AUC-ROC가 0.82 (민감도 68.0%, 특이도 82.4%; Youden index 0.50)로 도출되었다. 따라서, 추정량을 고려한 경우가 산화 스트레스 질환 유무에 대한 변별력을 평가하는데 더 좋은 성능을 갖고 있다는 것을 확인할 수 있었다(도 5).

도면

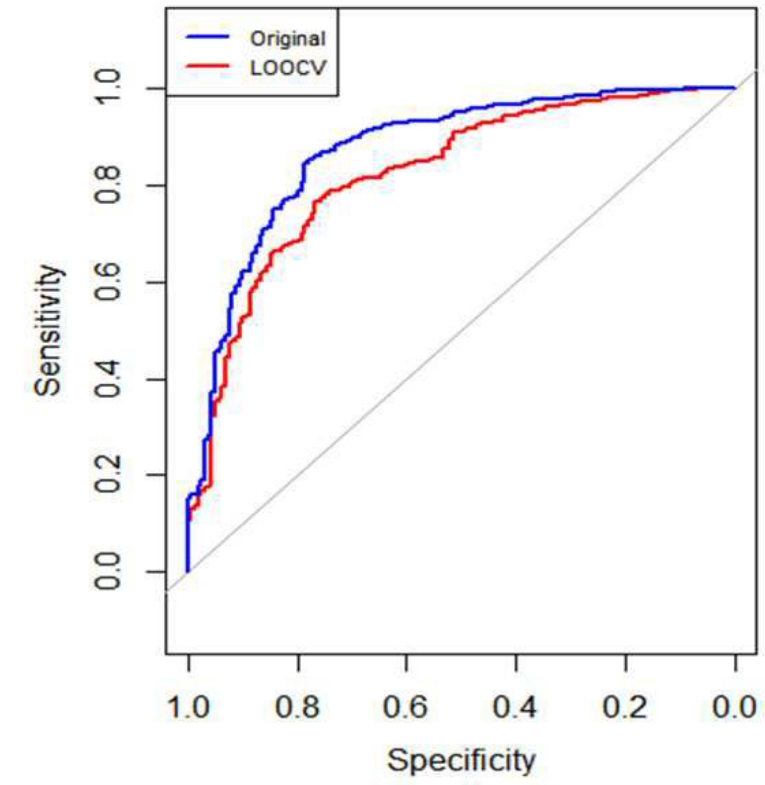
도면1


Total subjects
(n=1,464; men, n=879 &
women, n=585)
Excluded
• Missing data on RFS (n=170)
• Having at least one of the metabolic risk factors (n=258) or metabolic syndrome (n=104)
• Having other diseases (n=232)
• Missing information on history of disease or medication (n=66)
• Continuous medication (n=31)
Analyzed subjects
(n=603; men, n=391 &
women, n=212)
Healthy
(n=159; men, n=59 &
women, n=100)
Oxidative stress related disease
(n=444; men, n=332 &
women, n=112)

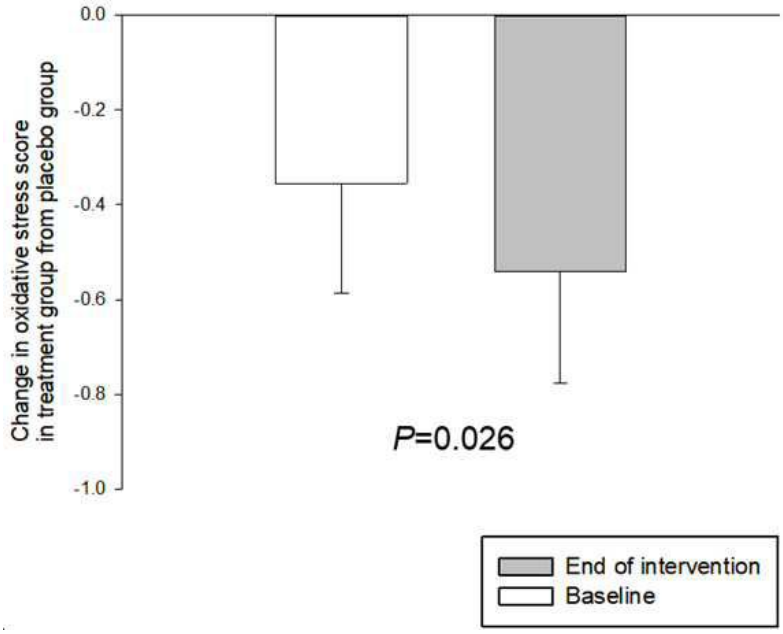
도면2


Percentage (%)
Healthy
Oxidative stress-related disease
Percent
N 159.00
Normal Pr > D 0.020
N 444.00
Normal Pr > D 0.129
0
5
10
15
20
25
30
-0.3
0.3
0.9
1.5
2.1
2.7
3.3
3.9
4.5
5.1
5.7
6.3

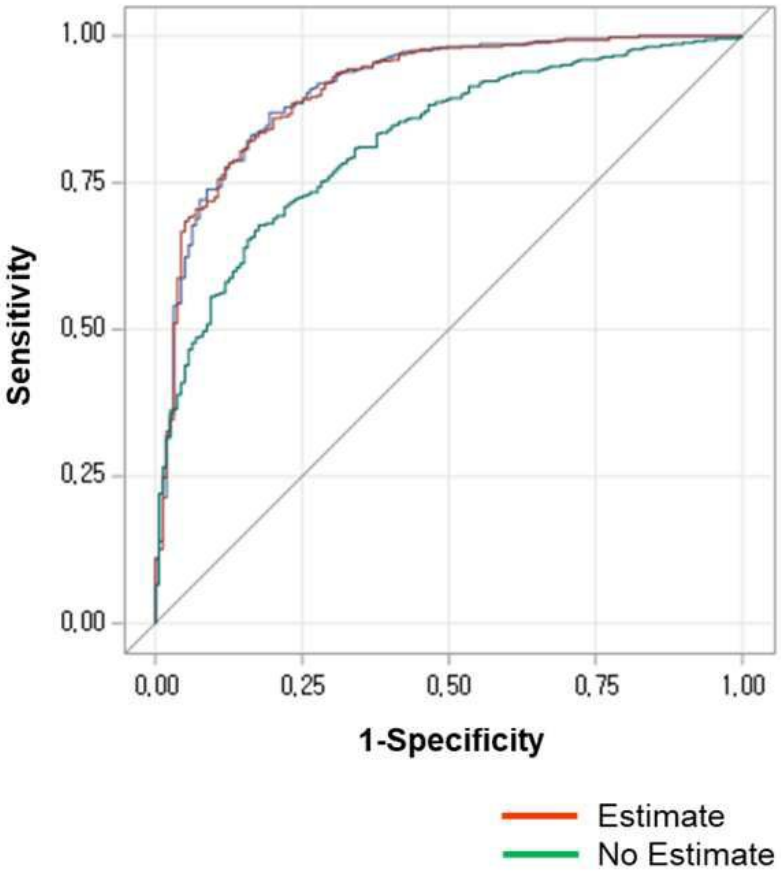
도면3


Original
LOOCV
Sensitivity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Specificity

도면4


Change in oxidative stress score
in treatment group from placebo group
0.0
-0.2
-0.4
-0.6
-0.8
-1.0
P=0.026
End of intervention
Baseline

도면5


1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Sensitivity
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1-Specificity
Estimate
No Estimate