

На правах рукописи

ЧЕРЕМИСИНА

Ксения Александровна

**РАЗРАБОТКА, КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ АПРОБАЦИЯ И
АНАЛИТИЧЕСКАЯ ВАЛИДАЦИЯ НОВОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АКТИВНОСТИ ОБЩЕЙ И ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ АЛЬФА-АМИЛАЗЫ**

Специальность:

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2022

Работа выполнена в ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайных ситуаций и ликвидации последствий стихийных бедствий.

Научный руководитель: член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор **Иванов Андрей Михайлович**.

Официальные оппоненты:

Кзаков Сергей Петрович, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н.Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации, Центр клинической лабораторной диагностики, заведующий;

Соснин Дмитрий Юрьевич, доктор медицинских наук, ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А.Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра факультетской терапии № 2, профпатологии и клинической лабораторной диагностики, профессор.

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится 26 апреля 2022 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте: <https://nrcerm.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук доцент

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Разработка новых методов исследования химического состава биологических жидкостей человека и их внедрение в клиническую лабораторную диагностику способствует совершенствованию эффективности лечения заболеваний, обеспечению сохранения здоровья населения и сокращению сроков временной нетрудоспособности пациентов. В этой связи формирование новых подходов в энзимодиагностике сохраняет свою актуальность.

В клинической лабораторной диагностике определение активности α -амилазы (ЕС 3.2.1.1) в крови и моче человека принято использовать для диагностики и мониторинга широкого спектра заболеваний поджелудочной железы (острый и хронический панкреатит, панкреолитиаз, кисты и опухоли поджелудочной железы), слюнных желез, желчевыводящих путей, органов брюшной полости (некроз, ишемия и перфорация кишечника). Также причинами повышения активности α -амилазы в сыворотке крови и моче могут быть сахарный диабет, болезни простаты, почечная недостаточность и другие патологические состояния. В целом, принято считать, что повышение активности α -амилазы в крови и моче прямо или косвенно связано с воспалением поджелудочной железы или его распространением на данный орган (так называемый реактивный панкреатит), а дифференциальная диагностика заболеваний гастропанкреатодуоденальной зоны нередко бывает значительно затруднена. Наряду с этим наиболее информативным считается определение активности изоферментов α -амилазы ввиду того, что она является секреторным ферментом, участвующим в процессе пищеварения и продуцируемым, в основном, слюнными железами (слюнная α -амилаза) и поджелудочной железой (панкреатическая α -амилаза). Увеличение активности фермента в несколько раз выше референтных значений может свидетельствовать о наличии у пациента острого панкреатита. При этом увеличивается активность панкреатического изофермента, тогда как уровень слюнного остается в норме.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) частота распространённости острого панкреатита в мире достигает 10% от всей неотложной хирургической патологии органов брюшной полости. При этом по разным оценкам у около 20% пациентов развиваются серьезные осложнения, некоторые из которых приводят к смерти. В целом, острый панкреатит диагностируется у 10-30 человек на 100 тысяч населения. За последние несколько десятков лет в индустриальных странах, в том числе и в России, наметилась тенденция к увеличению случаев данного заболевания. У более 80% пациентов заболевание разрешается, не причиняя большого ущерба здоровью, и только в редких случаях переходит в хроническую форму [Т. Leese, et al., 1988; W.R. Matull, et al., 2006]. Вместе с тем по разным оценкам у около 20% (по данным ВОЗ – 15-30%) пациентов развиваются серьезные осложнения, в частности панкреонекроз.

Ввиду полиморфизма клинической симптоматики острого панкреатита в дебюте заболевания с одной стороны, с другой – необходимости скорейшей постановки диагноза и своевременного назначения лечения, существует потребность в адекватном клинико-диагностическом сопровождении пациента, в рамках которого главную роль играет выявление изоферментов α -амилазы. Существующие методы определения активности α -амилазы обладают рядом недостатков, негативно влияющих на доступность анализа и достоверность результатов. В связи с этим, разработка и внедрение в практику наборов реагентов для определения активности изоферментов α -амилазы представляет собой актуальную медико-биологическую проблему.

Степень разработанности темы исследования

За последние несколько десятилетий были предложены различные подходы к определению активности α -амилазы, основанные на способности последней гидролизовать внутренние α -1,4-гликозидные связи олиго- и полисахаридов. Наибольшее распространение получили методы с использованием в качестве субстратов 4,6-ethylidene-(G7)-p-nitrophenyl-(G1)- α ,D-maltoheptaoside (EPS-G₇) и 2-chloro-4-nitrophenyl- α -d-maltotrioside (CNPG₃), которые применяются при создании наборов реагентов для определения активности α -амилазы и ее изоферментов [F.J. Gella, et al., 1997; J.D. Kruse–Jarres, et al., 1989]. Между тем, результаты различных исследований показывают, что данные субстраты обладают рядом недостатков [F.J. Gella, et al., 1997; K. Lorentz, et al., 1999; K. Lorentz, 2000; E. Rauscher, et al., 1985; J. Makise, et al., 2010; A. Scholer, W.E. Hohenwaller, 1984; T. Suganuma, et al., 1997]. В связи с этим, во многих развитых странах систематически ведутся работы по разработке современных методов определения активности α -амилазы и ее панкреатического изофермента, в том числе с использованием новых субстратов. К настоящему времени из доступных источников известно о многих таких безуспешных попытках [H. Okabe, et al., 1984; L. Fridhandler, et al., 1974; Z. Ogawa, 1991; T. Takeuchi, 1974; T. Takeuchi, et al., 1975; R. Uchida, 1995]. Исходя из вышеизложенного, разработка новых методов определения активности α -амилазы и оптимизация реагентных систем с улучшенными характеристиками является актуальной и важной технологической задачей клинической лабораторной науки. Целесообразность разработки и внедрения в практику отечественных наборов реагентов очевидна и актуальна.

Одним из таких потенциальных субстратов, перспективным для создания с его использованием нового метода для определения активности α -амилазы и ее изоферментов может быть рассмотрен субстрат 2-хлор-4-нитрофенил-4-О- β -D-галактопиранозилмальтозид (англ. 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltoside; GalG₂CNP) [Y. Morishita, et al., 2000], применение которого может позволить устранить проблемы, возникающие при использовании субстратов EPS-G₇ и CNPG₃, а также упростить анализ активности данных изоферментов. Очевидно, что для использования субстрата GalG₂CNP необходимо разработать реагенты, пригодные для использования в производстве, а также методику, позволяющую их применение в практике лабораторной медицины. Данная работа посвящена разработке нового метода определения активностей общей и панкреатической α -амилаз с субстратом GalG₂CNP, а также

наборов реагентов на основе кинетического анализа, которые могут быть внедрены в производство и применены в лабораторной диагностике.

Цель исследования

Разработать новый метод определения активностей общей и панкреатической α -амилаз с субстратом GalG₂CNP в крови и в моче человека на основе кинетического колориметрического анализа, адаптированный к широкому применению в клинико-лабораторной практике.

Задачи исследования:

1. Разработать новый кинетический колориметрический метод с использованием в качестве субстрата GalG₂CNP, а также компонентный состав реагентов для определения активностей общей и панкреатической α -амилаз в крови и в моче человека.

2. Провести аналитическую валидацию наборов реагентов на основе разработанного метода путем определения ключевых аналитических характеристик для оценки возможности его применения в клинической лабораторной диагностике, в том числе, оценки специфичности определения активности панкреатического изофермента α -амилазы, возможности длительного хранения реагентов и адаптации к фотометрическим анализаторам различного типа.

3. Определить в экспериментальных условиях воздействие факторов (гемолиз, липемия, гипербилирубинемия), влияющих на результаты лабораторных исследований активностей изоферментов α -амилазы, а также возможность использования в качестве диагностического биоматериала плазму крови человека, стабилизированную гепарином или ЭДТА.

4. Установить референтные величины активностей общей и панкреатической α -амилаз в крови и в моче человека при использовании разработанного метода и провести анализ ключевых аналитических характеристик разработанных наборов реагентов в сопоставлении с другими наборами реагентов, основанных на использовании альтернативных субстратов.

Научная новизна

Разработан новый кинетический колориметрический метод определения активностей общей и панкреатической α -амилаз с использованием в качестве субстрата GalG₂CNP.

Впервые разработаны и апробированы наборы реагентов для определения активностей общей и панкреатической α -амилаз кинетическим колориметрическим методом с использованием в качестве субстрата GalG₂CNP, удовлетворяющие требованиям, предъявляемым к медицинским изделиям для диагностики ин витро в Российской Федерации.

Для повышения стабильности реагентов для определения активностей общей и панкреатической α -амилаз оптимизирован состав компонентов, а также включены дополнительные компоненты. Показано, что введение в состав реагента для определения активности общей α -амилазы таких компонентов как Triton X-100, ЭДТА, а также консерванта кальция ацетата позволяет обеспечить стабильность реагента сроком более двух лет. Показано, что включение в состав

реагента 1 (содержащего антитела к слюнной α -амилазе) набора реагентов для определения активности панкреатической α -амилазы таких компонентов как ЭДТА, БСА, консерванта ацетата кальция, а также включение в состав реагента 2 (содержащего субстрат GalG₂CNP) ЭДТА и добавление консерванта азида натрия также позволяет увеличить срок их хранения до пяти лет.

В ходе клинических испытаний разработанных наборов реагентов изучены факторы, влияющие на результаты лабораторных исследований, обоснована и доказана возможность использования как сыворотки крови, так и плазмы крови, полученной с помощью гепарина или солей ЭДТА, установлены референтные величины и пределы колебаний активностей общей и панкреатической α -амилаз для сыворотки крови, плазмы крови и мочи человека для метода с использованием в качестве субстрата GalG₂CNP.

Теоретическая и практическая значимость работы

Впервые разработана идея, обогащающая научную концепцию о методологии теоретического обоснования принципа нового метода исследования химического состава биоматериалов, а именно, определения активностей общей и панкреатической α -амилаз кинетическим колориметрическим методом с использованием в качестве субстрата GalG₂CNP и экспериментальной апробации наборов реагентов, удовлетворяющих требованиям, предъявляемым к наборам реагентов для диагностики ин витро в Российской Федерации. По результатам серии лабораторных испытаний разработаны оптимальные составы монореагента для определения общей α -амилазы и набора из двух реагентов для определения панкреатической α -амилазы на основе кинетического колориметрического метода с субстратом GalG₂CNP. Показано, что расширение состава компонентов позволяет повысить стабильность разработанных реагентов, обеспечивая тем самым срок их хранения не менее двух лет.

Определена область применения кинетического колориметрического метода анализа активностей общей и панкреатической α -амилаз с использованием в качестве субстрата GalG₂CNP. Установлены референтные пределы активностей общей и панкреатической α -амилаз для сыворотки, гепаринизированной плазмы крови, ЭДТА-плазмы крови и мочи человека. Показано, что аналитическая специфичность определения активности панкреатической α -амилазы составляет не менее 97%. На основе оценки аналитической вариации результатов активностей общей и панкреатической α -амилаз как для одной серии измерений, так и для среднесрочного периода времени при использовании разработанных наборов реагентов, сформулированы методические подходы организации обеспечения своевременного выявления внутри- и межлабораторных ошибок.

Разработаны технические условия для производства набора реагента для определения активности общей α -амилазы, набора реагентов для определения активности панкреатической α -амилазы в сыворотке, плазме крови и моче человека с целью их применения в качестве медицинского изделия для диагностики ин витро в практической работе клинико-диагностических лабораторий. Созданы экспериментальные серии наборов «Амилаза-Ново» и «Амилаза панкреатическая-Ново», которые прошли экспертизу в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения РФ, зарегистрированы в

установленном порядке и разрешены к производству и применению на территории РФ. Разработаны производственные регламенты и организовано промышленное производство данных наборов реагентов.

Методология и методы исследования

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс клинических, лабораторных, инструментальных, статистических методов исследования и анализ литературы. Особое внимание уделено спектроскопическим методам исследования с использованием спектрофотометров, полуавтоматических и автоматических биохимических анализаторов. В работе в качестве объекта исследования использованы образцы сыворотки (n=358), гепаринизированной (n=100), ЭДТА-плазмы (n=100) крови и мочи (n=139), полученных от госпитализированных и амбулаторных пациентов и условно-здоровых добровольцев. Методология проведенных исследований основывается на ГОСТах, публикациях IFCC (Международная федерация клинической химии и лабораторной медицины), CLSI (институт клинико-лабораторных стандартов) [ГОСТ Р 51088–2013, <https://docs.cntd.ru/document/1200107028>; ГОСТ Р 53022.2–2008, <https://docs.cntd.ru/document/1200072564>; G. Schumann, et al., 2006; CLSI EP7. – 3d Ed., 2019].

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан новый кинетический колориметрический метод определения активности α -амилазы с использованием в качестве субстрата GalG₂CNP. На его основе разработаны наборы реагентов для определения активности общей α -амилазы и активности панкреатического изофермента α -амилазы в крови и в моче человека.

2. Разработанные наборы реагентов превосходят по аналитическим характеристикам и потребительским свойствам наборы реагентов, основанных на использовании субстрата EPS-G₇. Наиболее существенными преимуществами данных наборов являются: устойчивость к влиянию интерферентов, что обеспечивает возможность использования сыворотки крови, содержащей гемоглобин в концентрации до 5 г/л, а также гепаринизированной и ЭДТА-плазмы крови человека; высокая стабильность при хранении до пяти лет; монореагентный состав набора для определения активности общей α -амилазы.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обуславливается использованием современных, хорошо апробированных спектроскопических методов исследования, кинетических методов определения активности ферментов, метрологически-поверенного оборудования, а также корректным применением статистического анализа данных, и подтверждается результатами сравнения активностей общей и панкреатической α -амилаз предложенным набором реагентов и импортным аналогом, а также результатами внедрения в практику лабораторной диагностики лечебно-профилактических учреждений Российской Федерации.

Результаты исследования были доложены на Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (г. Санкт-Петербург, 2010 г.), научно-образовательном форуме «Актуальные проблемы современной лабораторной диагностики» (г. Барнаул, 2010 г.), научно-образовательном форуме «Современная лабораторная медицина: значение новых лабораторных тестов и технологий в клинической практике» (г. Смоленск, 2010 г.), научно-практической конференции «Лабораторное обеспечение стандартов медицинской помощи» (г. Москва, 2010 г.), научно-образовательном форуме «Инновационная лабораторная медицина: современные технологии и новые тесты в клинической практике» (г. Хабаровск, 2011 г.), Всероссийской научно-практической конференции «Медицинская биохимия и клиническая лабораторная диагностика в аспекте модернизации системы научных исследований» (г. Омск, 2011 г.), краевой научно-практической конференции «Лабораторная диагностика – возможности теории и практики» (г. Пермь, 24 апреля 2015 г.), III Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (г. Санкт-Петербург, 12-14 сентября 2016 г.), Международной научно-практической конференции «Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии» (г. Томск, 1-3 ноября 2017 г.), XXV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (г. Москва, 16–18 сентября 2020 г.).

Публикации по результатам исследования

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 3 статьи в научных журналах, рецензируемых ВАК Министерства образования и науки РФ. Получено 2 патента РФ.

Внедрение результатов исследования в практику

Данные исследования использованы для подготовки производственных регламентов и технических условий для промышленного производства наборов реагентов для определения активности изоферментов α -амилазы в сыворотке, плазме крови и моче человека кинетическим колориметрическим методом с субстратом GalG₂CNP. Результаты исследований подтверждены актами о внедрении научно-исследовательской работы в производство компании АО «Вектор-Бест» г. Новосибирск.

Набор реагентов для определения активности общей α -амилазы «Амилаза-Ново» (РУ от 20.11.2019 № РЗН 2017/6217) и набор реагентов для определения активности панкреатического изофермента α -амилазы «Амилаза панкреатическая-Ново» (РУ от 09.11.2017 № РЗН 2017/6451) прошли регистрацию в надзорных органах и разрешены к производству, продаже и применению на территории Российской Федерации как медицинские изделия для диагностики ин витро.

Зарегистрированные в Российской Федерации диагностические наборы реагентов, разработанные в ходе данного исследования, внедрены в практическую деятельность государственного бюджетного учреждения здравоохранения Новосибирской области «Городская клиническая больница №1» и Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно выполнен весь объем работ с помощью специальных методов исследования, а также анализ полученных данных. Совместно с соавторами обсуждалась постановка задач и выбор методов. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, статистическую обработку полученных данных по разделам диссертации, связанных с выбором биологического материала, пригодного для исследования. В ходе выполнения работы, автором проведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме. Автором самостоятельно проведен анализ полученных результатов и сформулированы выводы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют шифру специальности: 14.03.10 клиническая лабораторная диагностика, п. 7, п. 8 паспорта специальности, а именно: «оптимизация и разработка новых методов исследования химического и клеточного состава биоматериалов, установление референтных величин, предела колебаний каждого параметра биологических жидкостей. Факторы, влияющие на результаты лабораторных исследований, выявление внутри- и межлабораторных ошибок».

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 121 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы о результатах собственных исследований и их обсуждения, выводов и указателя цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 11 таблицами, 13 рисунками и содержит 5 приложений. Список литературы состоит из 146 источников, в том числе 119 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методы исследования

В экспериментах при определении активности общей α -амилазы и ее панкреатического изофермента использовали насыщающую концентрацию субстрата GalG₂CNP, то есть скорость реакции была равна максимальной скорости и не зависела от концентрации субстрата. Анализ проводили с помощью спектрофотометров, полуавтоматических и автоматических биохимических анализаторов.

Материалы, используемые в исследовании

Образцы сыворотки, гепаринизированной плазмы, ЭДТА-плазмы крови и мочи человека. Всего для исследования было использовано три группы образцов биоматериалов человека. Первая группа состояла из 35 и 38 образцов сыворотки крови, использованных для определения общей и панкреатической α -амилаз в них, соответственно. Вторая группа содержала сыворотку крови, гепаринизированную и ЭДТА-плазму крови, полученные одновременно от одного человека (всего от 100 человек). Третья – 185 образцов сыворотки крови и 139 проб мочи от условно-здоровых людей.

Все образцы крови были получены от людей старше 18 лет. Отбор осуществляли натошак при использовании специализированных вакуумных пробирок. Пробы хранили не более 14 дней при минус 20°C [В.В. Меньшиков. – М.: Юнимед–пресс, 2003]. Образцы крови с показателем гематокрита, выходящим за пределы нормальных значений, исключали из исследования. Образцы крови, взятые у одного человека, исследовались в одной аналитической серии.

Контрольные материалы. В качестве первичного калибратора использовали сертифицированный референтный материал IRMM/IFCC-456. Референтный материал был подготовлен для работы согласно инструкции по применению.

Аттестованные контрольные материалы «Precinorm» и «Precipath» («Roche», Германия, РУ № ФСЗ 2010/0752) применяли для контроля хранения реагентов, сходимости и прецизионности результатов анализа.

Кроме того, были использованы образцы слюнной α -амилазы («Sigma-Aldrich», США) при определении эффективности ингибирования слюнного изофермента моноклональными антителами и препарат α -амилазы из поджелудочной железы быка *Bos taurus taurus L.* («Вектор-Бест», Россия).

Интерференты. Свободный гемоглобин получали путем лизирования эритроцитов человека дистиллированной водой [CLSI EP7. – 3d Ed., 2019]. Концентрация гемоглобина в используемом в исследовании лизате составила 119,5 г/л («Вектор-Бест», Россия). В обогащенных пробах концентрацию гемоглобина измеряли на анализаторе HemoCue Plasma/Low Hb («HemoCue», Швеция). Моделирования образцов с различной концентрацией билирубина использовали его лиофилизированный препарат («Sigma-Aldrich», США). Концентрацию билирубина определяли колориметрическим методом с 3,5-дихлорфенилдиазониевой солью («Вектор-Бест», Россия). При создании различной степени липемии образцов применяли фармакологическую эмульсию Интралипид, содержащую 20 г/дл триглицеридов (Fresenius Kabi, Германия).

Наборы реагентов для сравнения. Оценку эффективности разработанных наборов реагентов проводили путем сравнения результатов определения активностей общей и панкреатической α -амилаз с результатами, полученными с помощью диагностических наборов реагентов с субстратом EPS-G₇, являющихся аналогами, зарегистрированными в установленном порядке на территории РФ как медицинские изделия для диагностики ин витро.

Методы статистической обработки полученных результатов

Полученные в результате исследования данные были подвергнуты статистической обработке. Накопление, систематизация, корректировка и визуализация исходной информации и результатов анализа проводилась с использованием программы Microsoft Office Excel 2007-2010. Статистическая обработка данных и расчет параметров производили с помощью пакета прикладных программ Statistica 9.1 (серийный № VX003E612530A91-L).

Полученные данные, исходя из задач исследования, объединялись в вариационные ряды, для которых проводился расчет одного или нескольких параметров, таких как среднее арифметическое значение, коэффициент вариации, среднеквадратичное отклонение, относительная разность средних. Для некоторых

вариационных рядов был проведен регрессионный анализ и вычислены параметры уравнения линейной регрессии вида $y = ax + b$. После проверки на нормальность критерием Колмогорова-Смирнова, данные при оценке использования различных образцов плазмы наряду с сывороткой крови были приведены к нормальному распределению путем логарифмической трансформации.

Результаты исследования и их обсуждение

Оптимизация компонентного состава наборов реагентов для определения активностей общей и панкреатической α -амилаз

В настоящей работе стояла задача разработать метод с субстратом GalG₂CNP для определения активностей общей и панкреатической α -амилаз для использования в лабораторной диагностике. Очевидно, что для разработки метода на основе субстрата GalG₂CNP необходимо создать реагенты, которые можно внедрить в производство, что в первую очередь предполагает необходимость их стабилизации. Более того, эти реагенты должны быть пригодны для работы с оборудованием, применяемым для биохимических исследований в условиях клиничко-диагностических лабораторий.

Решение этой задачи заключалось в поиске состава и количества компонентов в реагентах. Для этого использовали метод последовательных приближений, общий принцип которого сводится к доказательству существования решения и нахождения его приближения. На первом шаге в качестве нулевого приближения был взят бирагентный вариант методики. При этом в первом реагенте содержался буферный раствор, обеспечивающий рН, необходимый для взаимодействия фермента с субстратом и его гидролиза, а во втором реагенте – субстрат. Помимо этого, в состав реагентов были включены компоненты, поддерживающие конформационно правильное состояние фермента в ходе реакции (ионы Cl⁻ и Ca²⁺). Кроме того, такой короткий субстрат как GalG₂CNP требует присутствия в реакционной среде роданида калия, позволяющего увеличить скорость гидролиза за счет аллостерической перестройки α -амилазы, которая селективно атакует связь между агликоном и первой молекулой глюкозы, сводя к минимуму гидролиз по другим гликозидным связям, что приводит к уменьшению константы Михаэлиса (K_M). Для каждого компонента проводилась процедура варьирования концентрации для нахождения рабочего диапазона и проверки выполнения установленных требований к аналитическим характеристикам получаемой системы.

Далее для упрощения процедуры была проведена оптимизация реагентной системы, сводившаяся к объединению двух реагентов в один. Однако, это оказалось возможным только для реагентов для определения активности общей α -амилазы и неприемлемым для ее панкреатического изофермента по причине объективной необходимости на первоначальном этапе ингибировать активность слюнного изофермента посредством моноклональных антител, что возможно осуществить только в отдельной стадии. В состав набора для определения активности общей α -амилазы входит один реагент, который представляет собой

буферный раствор, содержащий субстрат GalG₂CNP. В состав набора реагентов для определения активности панкреатической α -амилазы входят два реагента: реагент 1 содержит антитела, ингибирующие активность слюнного изофермента, реагент 2 – субстрат. Реагенты не требуют дополнительной подготовки и готовы к использованию.

Таким образом, был подобран основной компонентный состав. Для обеспечения стабильности реагентов в их состав были дополнительно введены Triton X100, ЭДТА, БСА, ацетат кальция и азид натрия, что обеспечило их хранение при температуре 2-8°C в защищенном от света месте в течении 5 лет без существенного влияния на их оптическую плотность ($p \leq 0,05$) (рисунок 1).

Хранение сверх этого срока не было предпринято, так как представляется нецелесообразным для производства и практического применения [К.А. Черемисина, пат. РФ № 2417374, 2011; К.А. Черемисина, пат. РФ № 2417373, 2011].

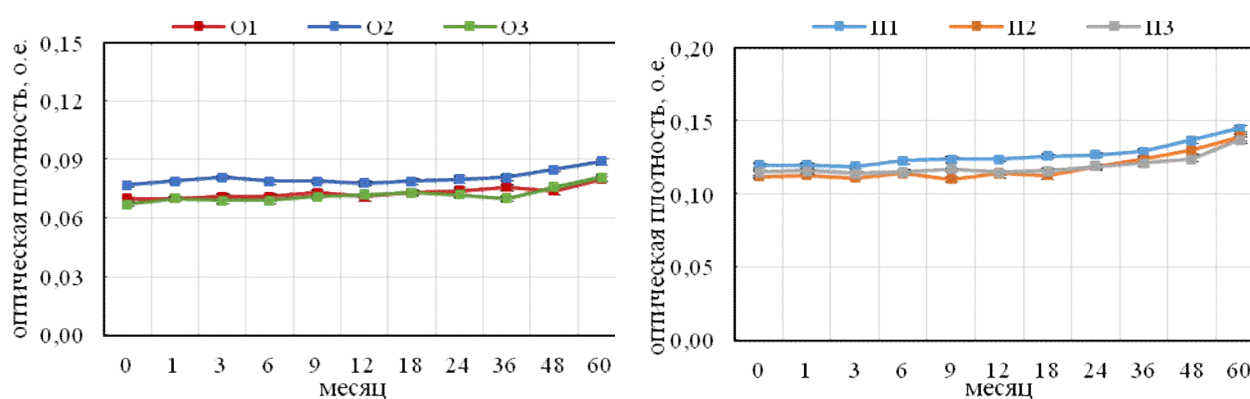


Рисунок 1 – Изменение оптической плотности реагентов при хранении при температуре 2–8°C (λ 405 нм)

Примечание: О – реагент для определения активности общей α -амилазы; П – реагент 1 набора реагентов для определения активности панкреатической α -амилазы; арабскими цифрами указан порядковый номер опытной серии реагента.

Требования к условиям проведения реакции и учету результатов

Для работы с полученными наборами реагентов необходимо было установить требования к условиям проведения реакции и учету результатов. В первую очередь было установлено, что при длине волны 405 нм (максимум для 2-хлор-4-нитрофенол (CNP)) в полученных системах реагентов отсутствует интерференция других веществ. При этом в качестве референтной длины волны для устранения цветности и другой возможной интерференции образца можно использовать длину волны из диапазона 500-800 нм, где отсутствует светопоглощение как продуктом реакции, так и компонентами, входящими в состав реагентов.

Далее был рассчитан теоретический фактор для возможности перевода скорости накопления продукта реакции CNP в условные международные единицы активности ферментов по отношению к объему Ед/л. Для этого был использован сертифицированный референтный материал α -амилазы IRMM/IFCC-456. По

результатам нескольких серий измерений и статистического анализа данных было установлено, что теоретический фактор для расчета активности общей α -амилазы в Ед/л равен 3200, для панкреатической – 2900.

Вследствие того, что разрабатываемые наборы реагентов имели предполагаемое применение для диагностики *in vitro*, немаловажно было провести адаптацию к биохимическим анализаторам, применяемым в клинико-диагностических лабораториях. Поэтому схема и условия проведения реакции подбирались в соответствии с данным требованием. В связи с этим для полученного реагента для определения активности общей α -амилазы была установлена следующая процедура анализа. Реакция проводится при температуре реакции 37°C . 1 мл реагента смешать с 0,025 мл анализируемого образца, перемешать и через 1 минуту начать считывание оптической плотности. Количество считываний должно быть не менее четырех. После чего, рассчитать среднее арифметическое значение изменения оптической плотности за минуту ($\Delta\text{E}/\text{мин}$).

Процедура проведения реакции при использовании набора реагентов для определения активности панкреатического изофермента α -амилазы отличается наличием дополнительной стадии, так как в состав набора входят два реагента: к 0,8 мл реагента 1 добавить 0,02 мл анализируемого образца, перемешать, выдержать 5 мин при температуре 37°C , после чего добавить 0,2 мл реагента 2, перемешать и далее – аналогично как при определении активности общей α -амилазы.

Активность α -амилазы и ее панкреатического изофермента численно равна скорости катализируемой ей реакции гидролиза субстрата на линейном участке кинетической кривой при насыщающей концентрации этого субстрата. Скорость катализируемой ферментом реакции, а значит активность фермента, согласно уравнению Михаэлиса-Ментен, можно определить по скорости накопления продукта реакции CNP (рисунок 2).

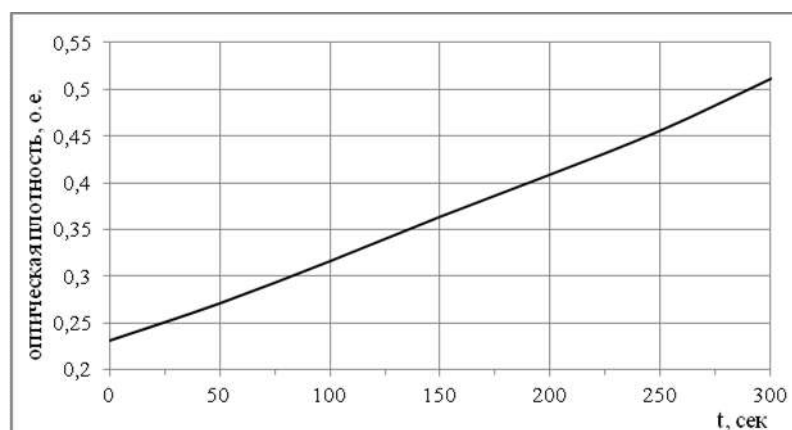


Рисунок 2 – Кинетическая кривая накопления продукта реакции (CNP) при определении активности общей α -амилазы

Таким образом, скорость реакции ($\Delta\text{E}/\text{мин}$) на линейном участке кинетической кривой считается прямо пропорциональной активности фермента.

Расчет активности α -амилазы (А) в анализируемом образце осуществляется по калибратору или рассчитывается по теоретическому фактору расчета: $A = F \cdot \Delta E / \text{мин}$, где $F = 3200$ (λ 405 нм).

Аналитическая валидация наборов реагентов для определения активностей общей и панкреатической α -амилаз с субстратом GalG₂CNP

Валидация методики представляла собой экспериментальное доказательство того, что она применима в клиничко-лабораторной практике. Для этого проводилась оценка методики по характеристикам, выбираемым с учетом типовых рекомендаций (например, ГОСТов, законодательных актов и других регламентирующих документов). Были определены основные аналитические характеристики разработанных наборов реагентов: линейность, предел количественного обнаружения, специфичность, правильность, прецизионность и устойчивость.

При исследовании образцов крови доноров разрабатываемым методом и методом сравнения был найден рабочий диапазон активности ферментов, который составил для общей α -амилазы от 32 до 1322 Ед/л, для панкреатической – от 19 до 1392 Ед/л (рисунок 3). Причем уравнения линейной регрессии ($y = ax + b$) приняли вид $y = 0,94x$ для общей α -амилазы и $y = 0,9x$ для панкреатической α -амилазы поскольку отличие коэффициента регрессии b от 0 оказалось статистически незначимо при использовании для оценки критерия Стьюдента ($\alpha = 0,01$) (таблица 1). Уточнение пределов данного диапазона было проведено при использовании препарата панкреатической α -амилазы, и позволило показать, что рабочий диапазон является линейным и имеет следующие пределы: верхний предел определения активности общей α -амилазы составил 1419 Ед/л, для панкреатической α -амилазы – 1390 Ед/л. Для установления наименьшей определяемой активности фермента в образце количество α -амилазы быка в пробе уменьшали до тех пор, пока значение коэффициента вариации повторных измерений в одной аналитической серии не превысило 5%. Наименьшая активность фермента в образце, которая может быть количественно оценена с требуемой сходимостью, составила 5 Ед/л и 4 Ед/л, соответственно. Таким образом, рабочий диапазон для определения активности общей α -амилазы для реагентов с GalG₂CNP составил от 5 до 1419 Е/л, для панкреатической α -амилазы – от 4 до 1390 Е/л.

Специфичность определения активности панкреатического изофермента α -амилазы была доказана при использовании препаратов слюнного изофермента. В данных образцах были определены общая активность α -амилазы, остаточная активность слюнного изофермента, измеренная реагентами для определения панкреатической α -амилазы, рассчитано их отношение (%). В результате было показано, что эффективность ингибирования слюнного изофермента α -амилазы антителами к нему при определении панкреатического изофермента составляет более 97% (таблица 2).

Таблица 1 – Регрессионный анализ

α -амилаза	Субстрат	a	b	r	n	\bar{y}	SD GalG ₂ CNP	\bar{x}	SD EPS-G ₇
О	GalG ₂ CNP (y); EPS-G ₇ (x)	0,94	1	0,998	35	192,3	305,21	203,4	324,45
П	GalG ₂ CNP (y); EPS-G ₇ (x)	0,90	-4	0,998	38	248,0	338,61	278,5	373,37

Примечание: a , b – параметры линейной регрессии $y = ax + b$; r – коэффициент корреляции; n – количество пар исходных данных; SD – среднеквадратичные отклонения относительно средних для выборок (Ед/л); \bar{y} , \bar{x} – средние арифметические значения активностей для выборок (Ед/л); О – общая α -амилаза; П – панкреатическая α -амилаза.

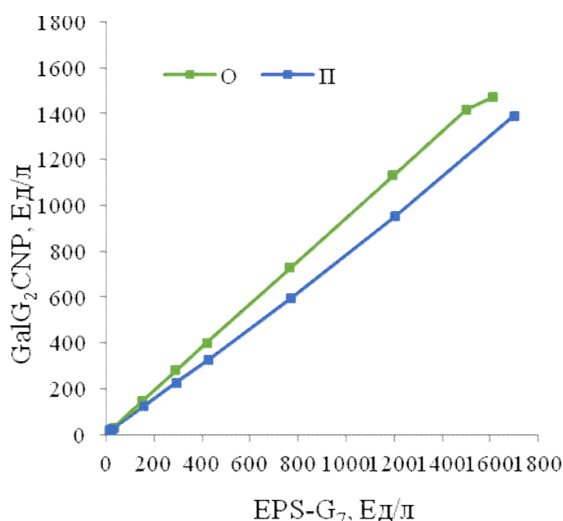


Рисунок 3 – Результаты определения активностей общей (О) и панкреатической (П) α -амилаз в образцах из поджелудочной железы быка, полученные с помощью наборов реагентов с субстратом GalG₂CNP и с субстратом EPS-G₇.

Таблица 2 – Доля остаточной активности слюнной α -амилазы (С, %) при ее ингибировании антителами, входящими в состав реагентов с субстратами GalG₂CNP и EPS-G₇, от общей активности α -амилазы

№ образца слюнной α -амилазы	GalG ₂ CNP			EPS-G ₇		
	О, Е/л	П, Е/л	С, %	О, Е/л	П, Е/л	С, %
1	45	1	2,2	60	4	6,67
2	318	7	2,2	419	12	2,86
3	683	15	2,2	850	22	2,6
4	879	21	2,4	1166	30	2,6
5	1234	29	2,35	1604	40	2,5

Примечания: О – общая, П – панкреатическая, СЛ – слюнная α -амилаза.

Аналитическая вариация результатов была оценена как для одной серии измерений (20 параллельных измерений в одной аналитической серии), так и для среднесрочного периода времени (по одному измерению раз в день в течение 30 дней). Внутрисерийный коэффициент вариации для GalG₂CNP не превышал 1,4%, среднесрочный – 3,5% (таблица 3).

Правильность определения – отклонение среднего результата определений от значения, принимаемого за истинное, была проверена при использовании двух контрольных материалов, с известным диапазоном активностей общей и панкреатической α -амилаз. Было показано, что значения активности изоферментов укладываются в аттестованный диапазон контрольных материалов (таблица 3).

Таблица 3 – Статистические характеристики результатов определения активностей общей и панкреатической α -амилаз реагентами GalG₂CNP и EPS-G₇ в контрольных материалах

Статистические параметры	Контрольный материал 1				Контрольный материал 2			
	аттестованный диапазон				аттестованный диапазон			
	О		П		О		П	
	(62,4-90,0) Е/л		(30,0-43,2) Е/л		(157-223) Е/л		(82-118) Е/л	
	EPS-G ₇	GalG ₂ CNP	EPS-G ₇	GalG ₂ CNP	EPS-G ₇	GalG ₂ CNP	EPS-G ₇	GalG ₂ CNP
одна серия измерений, n=20								
M, Е/л	77,5	76,1/80,9*	36,5	36,0/39,9*	190,0	188,2/200,2*	100,0	99,9/110,9*
SD, Е/л	1,1	0,69/0,73*	0,5	0,51/0,57*	3,4	2,04/2,17*	1,1	1,23/1,36*
CV, %	1,4	0,9	1,4	1,4	1,8	1,1	1,1	1,2
одно измерение один раз в день в течении месяца, n=30								
M, Е/л	76,8	76,6/81,5*	36,9	36,7/40,8*	191,4	188,4/200,4*	100,1	100,2/111,4*
SD, Е/л	1,3	1,54/1,64*	1,3	1,29/1,43*	5,5	3,24/3,45*	1,9	1,94/2,16*
CV, %	1,7	2,0	3,4	3,5	2,9	1,7	1,9	1,9

Примечания: М – среднее арифметическое значение результатов измерений активности для заданного образца, Ед/л; SD – среднеквадратичное отклонение от среднего значения, Ед/л; CV – коэффициент вариации, %; n – количество измерений; О – общая, П – панкреатическая α -амилаза.

* Полученное значение активности при измерении/пересчитанное значение активности из GalG₂CNP в EPS-G₇ по установленной в работе зависимости.

Таким образом, сравнение двух реагентов (GalG₂CNP и EPS-G₇) для определения изоферментов α -амилазы показало высокую степень согласия между ними. Вместе с тем, использованный в работе калибратор аттестован методом с субстратом с EPS-G₇, и, несмотря на то, что значение активности α -амилазы для него прослежено до сертифицированного референтного материала, рекомендованного Международным бюро мер и весов (*Bureau International des Poids et Mesures*, ВІРМ), и что нами установлена высокая положительная корреляция при анализе сывороток крови человека, регрессионный анализ показал, что результаты, полученные с помощью метода GalG₂CNP ниже таковых, определенных методом EPS-G₇. Известно, что скорость ферментативной реакции, а значит активность фермента, зависит от природы субстрата. Поэтому необходимо учитывать тот факт, что получаемые в образцах значения активности α -амилазы будут различаться. В связи с этим необходимо применять для расчетов фактор для реагентов с GalG₂CNP, что в медицинской лабораторной практике представляется не всегда возможным, либо использовать калибратор, значение активности α -амилазы в котором аттестовано методом с субстратом GalG₂CNP. При этом, если значение в калибраторе будет прослежено до референтного материала более высокого уровня, то это позволит гармонизировать результаты, получаемые в различных лабораториях реагентами с разными субстратами.

Согласно критериям точности, предъявляемым в РФ к анализу ферментов в биологических жидкостях [ГОСТ Р 53022.2–2008, <https://docs.cntd.ru/document/1200072564>], разработанный нами метод и наборы реагентов на его основе для определения активности общей α -амилазы и ее панкреатического изофермента соответствуют национальным стандартам. Таким образом, кинетический колориметрический метод с использованием в качестве субстрата GalG₂CNP может быть рекомендован для использования в клинико-диагностических лабораториях [К.А. Черемисина, и др., 2021].

Оценка влияния потенциально интерферирующих веществ на результаты определения активностей общей и панкреатической α -амилаз

Далее было проведено испытание устойчивости методик для высоких концентраций в образцах крови человека гемоглобина, билирубина и триглицеридов, которые часто становятся причиной ошибки преаналитического этапа лабораторных исследований. Для создания ряда образцов с разной концентрацией интерферента пробы нескольких пациентов разделялась на равные части, в каждую из которых добавляли один из интерферентов: гемоглобин, билирубин, жировую эмульсию (триглицериды) до заданных концентрации в диапазоне 0-10 г/л, 0-770 мкмоль/л, 0-1500 мг/дл, соответственно. Далее проводили определение активности ферментов в каждом образце; полученные значения сравнивали со значением в контрольной пробе. На основании анализа данных были выявлены пороговые значения концентраций гемоглобина, билирубина и триглицеридов, при которых относительная погрешность определения активности, т.е. разность между значениями активности в контрольной пробе и опытной пробе, не превышала 10% для каждого из пациентов.

Найдены предельные концентрации гемоглобина, билирубина и триглицеридов, ниже которых отсутствует влияние на результаты определения активности общей, панкреатической α -амилазы методом с субстратом GalG₂CNP, которые составляют 5,0 г/л, 770,0 мкмоль/л и 1500,0 мг/дл, соответственно.

Столь высокие пороговые значения дают возможность проводить анализ этих ферментов для пациентов с различной патологией, что имеет существенное практическую значимость. Например, пробы крови со значением липемического индекса 1500 мг/дл имеют высокую мутность. Тем не менее, при такой значительной степени липемии уровень общей и панкреатической α -амилазы может быть установлен методом с GalG₂CNP, что важно для пациентов с сахарным диабетом, хронической болезнью почек, панкреатитами различной этиологии и других заболеваниях. Следует отметить, что билирубин в высокой концентрации нередко становится источником спектральной интерференции из-за свойства поглощать свет в широком диапазоне длин волн: от 340 нм до 500 нм, однако, полученные данные указывают на отсутствие влияния билирубина в концентрации до 770 мкмоль/л на результаты определения активности исследуемых ферментов, что свидетельствует о высокой устойчивости аналитической системы разработанного нами метода к билирубину. Кроме того, согласно литературным данным, для метода с субстратом EPS-G₇, определение активности α -амилазы затруднено в гемолизованных пробах крови и образцах мочи, содержащих кровь. На практике, использование метода с субстратом GalG₂CNP позволяет не отбраковывать гемолизованные образцы сыворотки крови.

Возможность использования плазмы крови наряду с сывороткой крови человека при применении полученных реагентов

В лабораторной медицине для оценки основных параметров метаболизма человека в качестве материала для анализа используют сыворотку или плазму крови. На сегодняшний день сыворотка является универсальным и самым распространенным типом образца для биохимических исследований. Между тем, в медицинских лабораториях все чаще стали использовать плазму крови, чему в значительной мере поспособствовало развитие медицинской техники и возросшая потребность лабораторий в оптимизации своей работы. Несмотря на ряд преимуществ плазмы, например, сокращение времени между взятием образца крови у пациента и его анализом, антикоагулянты могут оказывать негативное влияние на результат определения аналитов, в том числе активности ферментов, что может привести даже к ошибочному диагнозу [M. Ferdinando, 2008; S. Barelli, et al., 2007].

Нами было проведено сравнение активностей общей α -амилазы и панкреатической α -амилазы в гепаринизированной, ЭДТА-плазме с активностью в сыворотке крови человека при использовании разработанных наборов реагентов. Согласно полученным данным, тип образца не влиял на активность общей α -амилазы и ее панкреатического изофермента (таблицы 4 и 5).

Различия средних значений для сыворотки и обеих плазм были статистически незначимы; показана высокая корреляция между результатами в парах сыворотка-плазма и плазма-плазма: коэффициент корреляции для этих пар

образцов составил 1,0. Между тем, в литературе содержатся сведения о том, что соли ЭДТА снижают активность фермента, и в качестве антикоагулянта при анализе активности α -амилазы предпочтительно использовать гепарин [В.В. Меньшиков. – М.: Юнимед–пресс, 2003; G. Lima–Oliveira, et al., 2014; D.F. Davidson, 2002]. Большинство наборов реагентов для определения активности как общей, так и панкреатической α -амилазы основаны на методе с использованием в качестве субстрата EPS-G₇. Именно для EPS-G₇ показано выраженное влияние ЭДТА на результат исследования [E. Rauscher, et al., 1985]. Нами установлено, что при использовании разработанных наборов реагентов для определения общей, панкреатической α -амилаз с субстратом GalG₂CNP не обнаружено аналогичного влияния образца на результат, как в случаях с другими субстратами. Поэтому определять активность α -амилазы и ее изофермента с данным субстратом можно как в сыворотке, так и в плазме, полученной с помощью гепарина или солей ЭДТА [К.А. Черемисина, 2016].

Таблица 4 – Характеристики выборок значений активностей общей α -амилазы и панкреатической α -амилазы в сыворотке, гепаринизированной и ЭДТА-плазме крови

Фермент	Средние арифметические значения			Относительная разность средних, %			Значимость различия средних (p=0.05)		
	СВ $\bar{X}_{СВ} \pm \sigma$, Е/л	Г $\bar{X}_{Г} \pm \sigma$, Е/л	Э $\bar{X}_{Э} \pm \sigma$, Е/л	СВ/Г	СВ/Э	Г/Э	СВ/ Г	СВ/ Э	Г/Э
О	66±132	63±128	63±123	-4,8	-4,8	0,0	+	+	+
П	36±104	35±100	35±101	-4,3	-2,3	2,1	+	+	+

Примечания: \bar{X} – среднее арифметическое значение активности фермента в соответствующем типе образца; σ – стандартное отклонение; СВ – сыворотка; Г – гепаринизированная плазма, Э – ЭДТА-плазма; относительная разность средних $\frac{\bar{X}_1}{\bar{X}_2}$, равная $(100\% \cdot \frac{\bar{X}_2 - \bar{X}_1}{\bar{X}_1})$; результаты *t*-теста (+ различия между средними значениями незначимы); О – общая, П – панкреатическая α -амилаза.

Таблица 5 – Результаты регрессионного анализа

Фермент	СВ/Г			СВ/Э			Г/Э		
	a	b	r	a	b	r	a	b	r
О	0,97	-1	1,00	0,93	2	1,00	0,96	3	1,00
П	0,96	0	1,00	0,97	0	1,00	1,01	1	1,00

Примечания: a, b – параметры уравнения линейной регрессии вида $y = ax + b$; r – коэффициент корреляции для пар x/y.

Референтные пределы общей и панкреатической α -амилазы для сыворотки, плазмы крови и мочи человека

Согласно ГОСТ Р 53022.3-2008 референтный интервал представляет собой ограниченный референтными пределами и статистически охарактеризованный диапазон значений результатов лабораторных исследований фермента, полученный при обследовании группы лиц, отобранных по специальным критериям. Поскольку активность α -амилазы в биологических жидкостях не зависит от возраста и пола, то критериями для отбора образцов сыворотки и мочи были отсутствие заболевания у человека поджелудочной железой, алкоголизма, травм живота, макроамилаземии, заболеваний желчного пузыря, хирургических вмешательств, других состояний, для которых показана возможность увеличения активности фермента в биологических жидкостях. Кроме того, для всех тестируемых образцов предварительно с помощью диагностических наборов реагентов, зарегистрированных на территории РФ как медицинские изделия было установлено, что уровни общей и панкреатической α -амилазы не выходят за референтные пределы.

Нормальность распределения результатов активностей общей и панкреатической α -амилазы в сыворотке крови, полученных с помощью разработанных наборов реагентов, подтверждено с применением критерия Колмогорова-Смирнова ($p \leq 0,01$). Для каждой выборки были рассчитаны среднее арифметическое значение (M) и среднеквадратичное отклонение (S). Как известно, при нормальном распределении 95% площади под графиком функции Гаусса ограничено $M \pm 1,96S$. Между тем, очевидно, что как для общей α -амилазы, так и для панкреатического изофермента, значения, выходящие за пределы нижней границы референтного интервала, не имеют диагностического значения, поэтому принято указывать только верхний предел.

Поскольку нами было доказано, что в качестве образца наряду с сывороткой может быть использована гепаринизированная и ЭДТА-плазма крови, для которых показано отсутствие влияния типа образца на результаты определения активности α -амилазы, то выводы по установлению референтного интервала для сыворотки крови могут быть экстраполированы и для плазмы. Таким образом, верхний референтный предел для общей α -амилазы в сыворотке (плазме) крови составляет 100 Ед/л, в моче – 500 Ед/л. Для панкреатического изофермента – 53 и 350 Ед/л, соответственно.

Внедрение в практику результатов исследования

По результатам работы были разработаны регламенты для производства следующих наборов реагентов:

1. для определения активности общей α -амилазы в сыворотке, плазме крови и моче «Амилаза-Ново» (до 2017 года – «Амилаза-Ново-1»);
2. для определения активности панкреатической α -амилазы в сыворотке, плазме крови и моче «Амилаза панкреатическая-Ново» (до 2017 года – «Амилаза панкреатическая-Ново-1»).

Кроме того, разработаны технические условия для выходного контроля производственных серий наборов, которые регламентируют физические

(технические) параметры, показатели правильности определения активности ферментов и допустимый разброс результатов, получаемых разными наборами одной серии.

В соответствии с требованиями Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения РФ к медицинским изделиям для диагностики *in vitro* наборы реагентов прошли технические и клинические испытания, по результатам которых получены регистрационные удостоверения, разрешающие производство наборов реагентов, а также их применение в учреждениях здравоохранения РФ.

Наборы реагентов «Амилаза-Ново» и «Амилаза панкреатическая-Ново» внедрены в производство компанией АО «Вектор-Бест» (Россия).

Наборы реагентов «Амилаза-Ново» и «Амилаза панкреатическая-Ново» несколько лет применяются в практике клинико-диагностических лабораторий РФ.

ВЫВОДЫ

1. Разработан новый метод и компонентный состав наборов реагентов для определения активностей общей и панкреатической α -амилаз кинетическим колориметрическим методом с субстратом GalG₂CNP. Включение в состав реагентов Triton X-100, ЭДТА, кальция ацетата, азида натрия и дополнительно БСА в реагент для определения активности панкреатической α -амилазы позволяет обеспечить их хранение сроком до пяти лет.

2. Аналитические характеристики для разработанных наборов реагентов для определения активностей общей и панкреатической α -амилаз в крови и моче человека на основе метода с субстратом GalG₂CNP составляют: диапазон измерения активности общей α -амилазы – 5-1419 Ед/л, панкреатического изофермента – 4-1390 Ед/л; внутрисерийный коэффициент вариации не превышает 1,1% и 1,4%, среднесрочный коэффициент вариации – 2,0% и 3,5%, соответственно.

3. Специфичность определения активности панкреатического изофермента α -амилазы при уровне активности слюнного изофермента до 1200 Ед/л с использованием разработанного набора реагентов составляет более 97%.

4. Активности общей и панкреатической α -амилаз в образцах крови, мочи сопоставимы по значениям и имеют коэффициент корреляции 0,99 при сравнении результатов определения разработанными наборами реагентов и их импортными аналогами с субстратом EPS-G₇.

5. Присутствие в образцах сыворотки крови интерферирующих веществ – гемоглобина до 5 г/л, триглицеридов до 1500 мг/дл, билирубина до 770 мкмоль/л – не оказывает значимого влияния на результаты определения активностей общей и панкреатической α -амилаз данным методом. Доказана возможность использования предложенных реагентов для определения активности общей α -амилазы и ее панкреатического изофермента в гепаринизированной и ЭДТА-плазме крови наряду с сывороткой крови человека.

6. Референтные пределы значений активностей общей и панкреатической α -амилаз в сыворотке (плазме) крови составляют до 100 и до 53 Ед/л и в моче человека до 500 и до 350 Ед/л, соответственно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики:

1. Для определения активности общей, панкреатической α -амилазы в сыворотке, плазме крови и моче человека кинетическим колориметрическим методом с использованием субстрата GalG₂CNP рекомендован для клинико-лабораторной диагностики.

2. При выборе коммерческих наборов реагентов для выполнения в клинико-диагностических лабораториях исследований активностей общей и панкреатической α -амилазы, основанных на использовании различных субстратов, рекомендуется учитывать преимущества разработанного метода с субстратом GalG₂CNP: устойчивость к влиянию интерферентов, стабильность при хранении до пяти лет; монореагентный состав набора для определения активности общей α -амилазы.

3. Для определения активностей общей, панкреатической α -амилаз в пробах сыворотки крови с признаками гемолиза, гепаринизированной плазмы, ЭДТА-плазмы крови рекомендуется использовать наборы реагентов с субстратом GalG₂CNP, устойчивые к влиянию данных интерферирующих веществ.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В качестве перспектив разработки темы можно рассматривать проведение межлабораторных сличительных исследований определения активностей общей и панкреатической α -амилаз в клиническом материале с целью гармонизации результатов, получаемых в различных клинико-диагностических лабораториях предложенным методом и другими наиболее распространенными методами, имеющими метрологическую прослеживаемость результатов измерений величин активности до первичного международно-признанного стандартного образца.

С учетом выраженной зависимости эффективности терапии, а также частоты возникновения постморбидных осложнений и степени их тяжести от своевременности постановки диагноза, перспективы дальнейшей разработки состоят в расширении объемов оказания медицинской помощи на раннем госпитальном этапе.

Целесообразно проведение исследований по установлению физиологических значений активностей различных изоферментов α -амилазы в крови и моче с учетом возрастных, половых и региональных особенностей. Необходимо продолжить более детальное изучение динамики развития патологической амилаземии и амилазурии с целью уточнения лабораторных критериев, позволяющих осуществить своевременный выбор наиболее эффективных терапевтических органосохраняющих стратегий и здоровьесберегающих технологий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**Статьи в научных журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования основных результатов диссертационных работ**

1. Черемисина, К.А. Результаты валидации нового метода определения активности α -амилазы человека для диагностики патологий поджелудочной железы / К.А. Черемисина, Г.Е. Яковлева, А.В. Барабошкина, Э.Ф. Аглетдинов // Сибирский научный медицинский журнал. – 2021. – Т. 41, № 4. – С. 79–85.
2. Черемисина, К.А. Влияние способа пробоподготовки на результат определения активности некоторых ферментов в крови / К.А. Черемисина, К.С. Бабин, А.А. Пахомова // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т. 16, № 4. – С. 117-118.
3. Черемисина, К.А. Активность некоторых ферментов в гепаринизированной и ЭДТА-плазме крови: сравнение с сывороткой / К.А. Черемисина // Медицинский алфавит. – 2016. – № 23 (286). – С. 45–48.

Авторские свидетельства, патенты

4. Набор реагентов для определения активности панкреатической α -амилазы: пат. № 2 417 373 Рос. Федерация / Яковлева Г.Е., Черемисина К.А. – Заявл. 2009135209/15; Оpubл. 27.04.2011. Бюл. №12.
5. Реагент для определения общей α -амилазы: пат. № 2 417 374 Рос. Федерация / Яковлева Г.Е., Черемисина К.А. – Заявл. 2009135238/15; Оpubл. 27.04.2009. Бюл. №12.

Статьи в научных журналах, тезисы докладов в материалах конференций и симпозиумов

6. Черемисина, К.А. Влияние интерферентов на результат определения активности изоферментов α -амилазы крови методом с субстратом $GALG_2CNP$ / К.А. Черемисина, Н.М. Малыгина, А.М. Иванов // Лабораторная служба. – 2020. – №. 9 (1). – С. 68.
7. Черемисина, К.А. Использование реагентов во флаконах-картриджах для анализатора «САПФИР 400» / К.А. Черемисина // Поликлиника. – 2011. – № 4 (2). – С. 20-21.
8. Черемисина, К.А. Возможность использования нового метода для определения активности изоферментов α -амилазы / К.А. Черемисина, Г.Е. Яковлева // Лабораторная медицина. – 2011. г. – Спец.выпуск. – С. 66-67.
9. Черемисина, К.А. Совершенствование методов определения активности изоферментов α -амилазы человека / К.А. Черемисина, Г.Е. Яковлева // Медицинский академический журнал. – 2010. – № 5 (10). – С. 112.
10. Черемисина, К.А. Новое в определении активности общей и панкреатической альфа-амилазы. / К.А. Черемисина // Лаборатория. – 2010 г. – №2. – С.19.
11. Черемисина, К.А. Определение активности панкреатической α -амилазы / К.А. Черемисина // Новости Вектор-Бест. – 2009 г. – № 3 (53). – С.12-14.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

РФ – Российская Федерация

РУ – регистрационное удостоверение

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

IFCC – Международная федерация клинической химии и лабораторной медицины

IRMM – Институт референтных материалов и измерений

CLSI – институт клинико-лабораторных стандартов

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ГОСТ – государственный стандарт

БСА – бычий сывороточный альбумин