

**VI. Стандартные образцы**

УДК 006.91:544.6

**ВОПРОСЫ МЕТРОЛОГИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ  
БИОАНАЛИЗА. СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ  
КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ ФЕРМЕНТОВ****Е.В. Кулябина<sup>1</sup>, Т.В. Кулябина<sup>2</sup>, В.В. Морозова<sup>3</sup>,  
О.Н. Мелкова<sup>1</sup>, Е.А. Гуськова<sup>1</sup>**<sup>1</sup>ФГУП «ВНИИМС», г. Москва, Россия,<sup>2</sup>Независимый консультант, г. Санкт-Петербург, Россия,<sup>3</sup>Московский государственный лингвистический университет  
(ИНЯЗ им. Мориса Тореза), г. Москва, Россия,

kuliabina@vniims.ru, t.v.kuliabina@vniim.ru, lerapuri@gmail.com

*Аннотация.* Рассматривается востребованность метрологического обеспечения измерений, проводимых в лабораторной медицине, для повышения точности результатов анализов, а именно измерений каталитической концентрации ферментов организма человека. Поднимается вопрос и приводится пример разработки стандартных образцов с длительным сроком годности. Обсуждаются результаты разработки российских стандартных образцов каталитической концентрации ферментов  $\alpha$ -амилазы и щелочной фосфатазы.

На основании измерительной модели (закон Бугера — Ламберта — Бера) установлены источники неопределённости. Разработанные стандартные образцы позволяют с высокой достоверностью измерять каталитическую концентрацию ферментов, ставить правильные диагнозы на ранних стадиях заболеваний, достичь мирового уровня метрологического обеспечения лабораторной медицины в области измерений параметров ферментов.

*Ключевые слова:* метрологическое обеспечение, биоанализ, стандартные образцы, каталитическая активность ферментов.

**QUESTIONS OF METROLOGICAL SUPPORT  
OF BIOANALYSIS. REFERENCE MATERIALS  
OF CATALYTIC ENZYME ACTIVATION****E.V. Kulyabina<sup>1</sup>, T.V. Kulyabina<sup>2</sup>, V.V. Morozova<sup>3</sup>,  
O.N. Melkova<sup>1</sup>, E.A. Guskova<sup>1</sup>**<sup>1</sup>FSUE "VNIIMS", Moscow, Russia,<sup>2</sup>Independent advisor, St. Petersburg, Russia,<sup>3</sup>Moscow State Linguistic University

(The Maurice Thorez Institute of Foreign Languages), Moscow, Russia,

kuliabina@vniims.ru, t.v.kuliabina@vniim.ru, lerapuri@gmail.com

*Annotation.* The relevance of metrological support of measurements carried out in laboratory medicine is examined to increase the accuracy of analyzes results, namely, measurements of the catalytic concentration of the human body enzymes. The development of reference materials with a long shelf life is discussed. The results of the development of Russian reference materials of

*the catalytic concentration of  $\alpha$ -amylase and alkaline phosphatase are discussed. Based on the measuring model (Beer — Lambert — Bouguer law), sources of uncertainty are established. The developed reference materials make it possible to measure the catalytic concentration of enzymes with high reliability, make the correct diagnoses at the early stages of the disease, and make it possible to achieve the world level of metrological support of laboratory medicine in the field of measuring enzyme parameters.*

*Key words: metrological support, bioanalysis activity, standard samples, catalytic enzymes.*

С чего начинается современный человек? Со здоровья, с интеллекта, с умения правильно организовать время, с невероятной работоспособности и целеустремлённости, а также с горячего желания делать каждый день что-то необходимое для существования человечества. Конечно, это всего лишь наша точка зрения, но данное утверждение выглядит разумно, и вероятность опаривания данного тезиса представляется небольшой.

Итак, на главном месте стоит здоровье. Существуют индивидуумы, которым посчастливилось родиться с хорошими наследственными признаками к правильному функционированию систем организма (по оценкам, не более 4 % всего населения Земли [1]), их геном позволяет, не сильно беспокоясь о здоровье, жить долго здоровыми. Однако существуют и другие индивидуумы, и их достаточно много (остальные 96 %), которым жизненно необходимо обращать пристальное внимание на параметры функционирования своего организма — на уровень холестерина, давление, содержание сахара в крови и в моче, активность ферментов. Точность результатов анализов данных параметров напрямую зависит от развития метрологического обеспечения биоанализа, лабораторной медицины.

Развитие биотехнологий в настоящем мире происходит невероятными темпами. Для точных измерений используются беспрецедентные возможности последних открытий и достижений науки и техники. Важность изучения каталитических процессов, происходящих в организме человека, отмечалась великим биохимиком Альбертом Л. Ленинджером: «Для существования жизни необходимо выполнение двух основных условий. Во-первых, живой организм должен обладать способностью к самовоспроизведению. Во-вторых, организм должен уметь эффективно и селективно катализировать химические реакции» [2].

Насколько важным является изучение каталитических процессов, в том числе происходящих в организме, говорит и тот факт, что за историю вручения Нобелевской премии, которая в области химии была присуждена 166 раз, 73 раза из них — за открытия, сделанные в биоанализе, а за открытия, непосредственно связанные с изучением катализа и катализаторов, — 18 раз.

В настоящее время в мире проводятся миллионы медицинских анализов в год. Данные о вручённых Нобелевских премиях, а также информация о количестве биоаналитических измерений, ежегодно проводимых в мире, дают

лишь примерное представление о востребованности получения точных результатов измерений величин, относящихся к биоанализу. Точные измерения в биоанализе дают возможность проводить раннюю диагностику заболеваний, позволяющую предотвратить неконтролируемое течение патологии и излечить человека от серьёзного заболевания; контролировать качество фармпрепаратов; обеспечивать точные результаты анализов содержания токсичных, психоактивных, изменяющих сознание средств у пациента, определять возможное наличие допинга в пробах крови, мочи и т.д.

В настоящий момент разрабатываются, совершенствуются и создаются точные и оперативные методы анализа и средства измерений, позволяющие решать эти насущные задачи. Созданием подобных средств измерений занимаются крупные зарубежные и отечественные предприятия.

Вопросы обеспечения метрологической прослеживаемости результатов химических и биологических измерений к первичным эталонам единиц физических величин, к первичным референтным методикам регулярно обсуждаются и решаются на заседаниях Консультативного комитета по количеству вещества (КККВ) Международного бюро мер и весов (МБМВ). В том числе дважды в год проходят заседания трёх Рабочих групп, относящихся к биоанализу, — Рабочей группы по анализу протеинов (PAWG), Рабочей группы по анализу клеток (CAWG), Рабочей группы по анализу нуклеиновых кислот (NAWG).

Россию в данном виде измерений традиционно представляет ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева», а с весны 2015 г. к нему присоединился и ФГУП «ВНИИМС». ВНИИМ имеет 5 ГПЭ в области физико-химических измерений, ВНИИМС в настоящее время создаёт первичную референтную методику измерений каталитической активности фермента  $\alpha$ -амилаза.

Напомним, что система метрологического обеспечения любого вида измерений базируется на наличии соответствующих нормативно-правовых актов, государственного первичного эталона или первичной референтной методики измерений, государственной поверочной схемы передачи размера единицы нижестоящим средствам измерений или иерархической схемы метрологической прослеживаемости, стандартных образцов (СО) и методов передачи размера единицы.

Созданию и применению биологических стандартных образцов и стандартных образцов для обеспечения прослеживаемости измерений в области охраны окружающей среды были посвящены международные симпозиумы по стандартным образцам: BERM 14 (октябрь 2015 г., Вашингтон, США) и BERM 15 (сентябрь 2018 г., Берлин, Германия). На BERM 14 были представлены 23 компании ведущих мировых производителей стандартных образцов, были представлены 99 устных докладов и 108 постерных. Многие страны плотно занимаются решением проблемы создания стабильных, с большим сроком годности стандартных образцов биологических субстанций. Привлёк интерес, например, доклад об очень оригинальных «биологических яйцах».

«Биологические яйца» (BioBall™, Biomérieux) — это стандартные образцы (SRM), заключённые в оболочку, состоящую в основном из кальция и имеющую форму яйца (рис. 1).



Рис. 1. Биологическое яйцо [3]

Внутри этой оболочки в связи с её герметичностью поддерживается постоянный микроклимат, позволяющий заключённым в неё биологическим элементам (ДНК, белкам, пептидам) сохранять свои свойства практически неизменными. Процент СО, хранящихся в BioBall, которые остаются стабильными в течение 12 месяцев, приближается к 100 % (97 %). Тогда как эти же биологические субстанции, хранящиеся традиционно в стеклянной таре, сохраняются стабильными примерно в 70 % случаев (по оценкам фирмы Biomérieux [3]).

В России ГПЭ создаются и совершенствуются, поверочные схемы разработаны, методики разрабатываются, а вот стандартные образцы утверждённых типов, которые в биоанализе играют одну из важнейших ролей (для целей передачи размера единицы), в настоящее время практически отсутствуют. При лишь приближенной оценке потребности в СО, исчисляемой в тысячах, в Федеральном информационном фонде по обеспечению единства измерений их зарегистрировано порядка 22–24.

Проводятся масштабные исследования и разработки российских стандартных образцов, применяемых для целей диагностики заболеваний, а именно стандартных образцов каталитической активности концентрации ферментов. Первыми во всё расширяющемся списке востребованных ферментов встали  $\alpha$ -амилаза и щелочная фосфатаза, стандартные образцы которых созданы в рамках опытно-конструкторской работы.

Учитывая, что измерения каталитической концентрации проводятся спектрофотометрическим методом, измерительная модель основана на законе Бугера — Ламберта — Бера, и уравнение измерений оптической плотности преобразовано к виду (1):

$$A = \varepsilon l c = \varepsilon l \frac{c_0}{D}, \quad (1)$$

где  $A$  — оптическая плотность раствора;  $\varepsilon$  — коэффициент молярной экстинкции;  $l$  — длина оптического пути (толщина кюветы);  $c$  — концентрация 4-NP в реакционном растворе\*;  $c_0$  — концентрация 4-NP до разбавления\*;  $D$  — фактор разбавления; \* — в случае  $\alpha$ -амилазы.

Продифференцировав уравнение (1), получим уравнение (2):

$$\frac{dA}{dt} = \frac{d(\varepsilon l \frac{c_0}{D})}{dt} = \frac{\varepsilon l}{D} \frac{dc}{dt}. \quad (2)$$

Скорость реакции может быть вычислена из уравнения (3):

$$r = \frac{dc}{dt} = \frac{D}{\varepsilon l} \frac{dA}{dt} = \frac{31k}{1012 \cdot 0,01} \cdot 1000 = 3063k \text{ } \mu\text{kat} / L, \quad (3)$$

где  $r = \frac{dc}{dt}$  — активность  $\alpha$ -амилазы;  $D$  — фактор разбавления;  $\varepsilon$  — коэффициент молярной экстинкции;  $l$  — длина оптического пути (толщина кюветы);  $c$  — концентрация 4-NP в реакционном растворе;  $k = \frac{dA}{dt}$  — угол наклона регрессии.

Основываясь на измерительной модели (1), к рассмотрению принимают следующие источники неопределённости:

- фактор разбавления — учитывает неопределённости всей мерной посуды, применяемой для приготовления растворов;
- длина оптического пути — зависит от точности измеренной толщины кюветы, берётся из сертификата на кюветы или определяется опытным путём;
- угол наклона прямой регрессии — зависит от двух факторов: первый — измерения оптической плотности (берутся из сертификата на спектрофотометр) и времени; второй — линейность регрессии;
- корреляция угла наклона, фактора разбавления и длины оптического пути;
- отклонение метода измерений;
- pH растворов;
- температура растворов.

Создаваемые стандартные образцы имеют характеристики, приведённые в таблице.

## Метрологические характеристики СО [4]

Наименование характеристики	Размерность	Значение характеристики	Предельное отклонение — расширенная неопределённость измерений каталитической концентрации при ( $k = 2$ )
Опытный образец стандартного образца $\alpha$ -амилазы			
Каталитическая концентрация основного компонента	кат/дм <sup>3</sup>	от $5,0 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-5}$	от 0,5 до 7 %
Опытный образец стандартного образца щелочной фосфатазы			
Каталитическая концентрация основного компонента	кат/дм <sup>3</sup>	от $5,0 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-5}$	от 0,5 до 8 %

Срок годности стандартных образцов — 12 месяцев.

На рис. 2 приведён внешний вид стандартных образцов  $\alpha$ -амилазы и щелочной фосфатазы.



Рис. 2. Внешний вид стандартных образцов  $\alpha$ -амилазы и щелочной фосфатазы

Как результат: созданы условия для импортозамещения и импортоопережения; созданы условия для выхода России на передовые позиции по изготовлению доступных высокотехнологичных, конкурентоспособных средств метрологического обеспечения — стандартных образцов для лабораторной медицины; созданы национальные стандартные образцы каталитической концентрации анализируемых ферментов мирового уровня.

Разработанные стандартные образцы созданы с учётом существующего мирового опыта и уровня развития технологий с применением в работе результатов и процедур международных сличений ССQM VIPM. Выполненные исследования позволяют с высокой достоверностью измерять каталитическую концентрацию идентифицированных анализируемых субстанций и ставить правильные диагнозы на ранних стадиях заболеваний, достичь мирового уровня метрологического обеспечения лабораторной медицины в области измерений параметров ферментов.

Таким образом, работы по созданию методов и средств метрологического обеспечения биоанализа приближают нас к более точным результатам анализов и к достижению состояния здорового человека.

### Список литературы

1. Kassebaum N.J., Bertozzi-Villa A., Coggeshall M.S. et al. Global, regional, and national levels and causes of maternal mortality during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [Electronic resource] // Lancet. 2014. V. 384. P. 980–1004. URL: [https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736\(14\)60696-6.pdf](https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736(14)60696-6.pdf).
2. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. Т. 1. С. 269.
3. BIOBALL [Electronic resource] / BioMérieux: official website. URL: <https://www.biomerieux-usa.com/industry/bioball>.

*Статья поступила в редакцию: 22.09.2020 г.*

*Статья прошла рецензирование: 02.10.2020 г.*

*Статья принята в работу: 27.11.2020 г.*