

АЛЬФА-АМИЛАЗА И МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЕЕ АКТИВНОСТИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ

К.А. Черемисина¹, Ф.Ю. Гарифуллина², Э.Ф. Аглетдинов¹

¹АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

²ГБУЗ РКПЦ МЗ РБ, г. Уфа, Россия

Резюме

Повышение уровня качества оказания медицинской помощи требует постоянного совершенствования клинико-лабораторного сопровождения пациента. Для успешного решения этих задач необходим дальнейший поиск, разработка и внедрение в медицинскую практику новых, с улучшенными характеристиками, методов анализа различных, в том числе, распространенных показателей — таких как, например, активность α -амилазы. В данной статье представлен обзор основных опубликованных за несколько десятилетий в научной отечественной и зарубежной литературе, сведений о строении α -амилазы и ее основных изоферментов; метаболизме фермента, его роли в физиологии и патологии человека; диагностической значимости определения активности изоферментов α -амилазы в клинической лабораторной диагностике. Изложены принципы наиболее распространенных методов определения активности α -амилазы и детальный анализ их ключевых параметров. Метод с субстратом GalG₂CNP обладает наилучшими аналитическими характеристиками для создания на его основе наборов реагентов для измерения активности α -амилазы и ее изоферментов в клинико-диагностических лабораториях, оснащенных автоматическими биохимическими анализаторами различного типа.

Ключевые слова: α -амилаза, изоферменты, методы определения активности, субстрат, клиническая лабораторная диагностика.

DOI: 10.58953/15621790_2023_14_1-2_77

ALPHA-AMYLASE AND METHODS FOR DETERMINATION OF ITS ACTIVITY USED AT CLINICAL LABORATORY

K.A. Cheremisina¹, F.Y. Garifullina², E.F. Agletdinov¹

¹AO "Vector-Best", Novosibirsk, Russia

²SBIR RPCC MH RB, Ufa, Russia

Summary

The quality improvement of medical care requires the developing of clinical laboratory patient support. To achieve the effective results need a searching, developing and applying in practice new, with improved properties, methods for estimation analytes, including common ones, such as α -amylase activity. This article presents a review of the main materials published over the past few decades. It includes a description of the structure of α -amylase and its main isoenzymes; its role in human physiology and pathology; diagnostic significance of the α -amylase isoenzymes activity determination in clinical laboratory diagnostics. The principles of the most common methods of α -amylase activity determination are presented, and their important characteristics are compared. The method based on the substrate GalG₂CNP using has the best analytical characteristics for the developing reagent kits for measuring the total α -amylase and its pancreatic isoenzyme activities, which can be used in clinical diagnostic laboratories.

Keywords: : α -amylase, isoenzymes, activity determination methods, substrate, clinical laboratory diagnostics.

Альфа-амилаза человека и ее изоферменты
 α -Амилаза (альфа-амилаза) — гликозил-гидролаза (ЕС 3.2.1.1), фермент, катализирующий гидролиз гликозидных связей в молекулах углеводов (от лат. amylo — крахмал). Впервые амилаза была описана под названием «диастаза» почти 200 лет назад немец-

ким исследователем (Leuchs, 1831), но позднее — уже в 20 веке — была переименована в амилазу, хотя термин диастаза до сих пор употребляется в клинико-диагностических лабораториях как архаизм [5,21].

α -Амилаза человека продуцируется в различных тканях организма и все же ее основными источниками

являются поджелудочная железа и слюнные железы (панкреатическая α -амилаза и слюнная α -амилаза) [41,42]. У млекопитающих α -амилаза кодируется двумя типами генов *Amy*, экспрессирующихся на высоком уровне либо в слюнных железах (*Amy1*), либо в поджелудочной железе (*Amy2*). Кластер генов α -амилазы человека локализован на коротком плече 1 хромосомы (1p21) и содержит пять интактных генов и два псевдогена. Интактные гены включают три гена слюнной α -амилазы (*Amy1A*, *Amy1B* и *Amy1C*) и два — поджелудочной (*Amy2A* и *Amy2B*), экспрессия которых имеет тканевую специфичность [12,39]. Ген α -амилазы человека состоит из 11 экзонов и 10 интронов и имеет длину около 10 тысяч пар оснований. Размер экзонов варьирует от 100 до 231 пары нуклеотидов [28].

В ходе эволюции гены α -амилазы претерпели значительный прирост числа копий, что является одним из наиболее хорошо изученных примеров адаптации к увеличению потребления крахмала в человеческой популяции, произошедшей, вероятно, после отщепления неандертальцев [13,14,33]. Дупликация гена у предков человекообразных обезьян первоначально привела к образованию двух генов α -амилазы (*Amy2A* и *Amy2B*), а затем и к образованию варианта *Amy1*, имеющих органоспецифическую экспрессию. В процессе формирования современного вида человека дальнейшее увеличение числа копий гена *Amy1* привело к повышенной экспрессии кодируемого им фермента в слюне. При этом механизм модулирования тканеспецифической экспрессии неясен. Не исключено, что в этом вопросе особую роль играют клон-специфичные ретротранспозоны или другие регуляторные элементы [32]. В современной популяции человека уровень экспрессии α -амилазы зависит от количества копий генов *Amy1* и *Amy2* и коррелирует со степенью традиционного потребления крахмала в этих сообществах [7,33,43].

Строение α -амилазы

α -Амилаза человека состоит из 496 аминокислотных остатков [6]. Активный центр фермента содержит семь сайтов связывания субстрата и имеет вид глубокой V-образной расщелины. Олигосахарид связывается с каждым из сайтов одним мономером, после чего происходит его расщепление [15]. Молекула α -амилазы содержит три домена (А, В и С). Каталитически активные группы аминокислот находятся в домене А в субстрат-связывающей области в непосредственной близости друг от друга. Недалеко от активного центра в домене А локализован участок связывания иона хлора. Ион Ca^{2+} координирован несколькими аминокислотными остатками, находящимися в доменах

А и В [9,36]. Точная функция домена С не установлена, но, предположительно, он стабилизирует домен А, ограждая гидрофобные остатки аминокислот от растворителя [24].

Слюнная и панкреатическая α -амилазы высоко гомологичны по первичной структуре. Тем не менее, замены аминокислотных остатков в первичных последовательностях ферментов выявлены в их различных структурах. Часть замен приходится на активный центр, что, однако, не оказывает влияния на каталитическую активность ферментов. Также высокая частота аминокислотных замен наблюдается в сегменте полипептидной цепи, которая соединяет домены А и С [45].

Метаболизм изоферментов α -амилазы

Слюнная α -амилаза в большей степени вырабатывается сероцитами околоушных слюнных желез и в меньшей — поднижнечелюстных и подъязычных [28]. По системе выводных протоков этих желез фермент попадает в ротовую полость, где воздействует на пищу. Некоторое время α -амилаза сохраняет активность внутри пищевого комка в желудке. Панкреатическая α -амилаза синтезируется ациноцитами экзокринной части поджелудочной железы. Фермент в составе секреторных гранул по системе протоков транспортируется к устью железы, а затем в просвет двенадцатиперстной кишки через Фатеров сосочек [2].

Большая часть α -амилазы расщепляется в нижней части кишечного тракта трипсином, небольшое количество попадает в кровь. Вследствие своей небольшой молекулярной массы, α -амилаза является одним из немногих ферментов, который фильтруется клубочками почек и присутствует в моче в норме. Поэтому любое изменение активности α -амилазы в крови отражается изменением ее активности в моче. В сыворотке крови человека на долю слюнного изофермента приходится приблизительно 60% от общей активности α -амилазы, а на долю панкреатического около — 40% [38]. Для мочи прослеживается аналогичное соотношение основных изоферментов.

Функция изоферментов α -амилазы

α -Амилаза катализирует гидролиз внутренних α -1,4-гликозидных связей полисахаридов, главным образом крахмала и гликогена, в результате чего образуются олиго- и дисахариды, которые подвергаются дальнейшему расщеплению другими пищеварительными ферментами, что в конечном итоге приводит к образованию моносахаридов. Таким образом, α -амилаза отвечает за первый этап в процессе снабжения клеток организма основным источником энергии и углерода.

Высказано предположение о том, что у большин-

ства видов млекопитающих роль α -амилазы в слюне может также заключаться в высвобождении от полимерных цепей крахмала олигосахаридных молекул, которые затем имеют возможность взаимодействовать с рецепторами сладкого вкуса в полости рта [32]. В эволюционном аспекте, возникающая с помощью такого механизма способность воспринимать безвкусный крахмал в своем рационе, могла дать адаптивное преимущество для видов, имеющих широкий пищевой рацион, позволяя им обнаруживать высококалорийные, т.е. содержащие крахмал, компоненты пищи. Помимо пищеварительных функций, слюнная α -амилаза также может быть участником процесса регуляции метаболизма глюкозы [34], а также влиять на бактериальный состав полости рта, кишечника и других органов [8,35].

Кроме этого, некоторое количество фермента в организме служит для внутриклеточного расщепления гликогена до декстринов и не является секреторной, по этой причине α -амилаза обнаруживается в ряде тканей различных органов человека и в некоторых малигнизированных клетках.

Диагностическое значение определения активности изоферментов α -амилазы

Как известно, увеличение активности α -амилазы в биологических жидкостях человека может наблюдаться при многих заболеваниях, поэтому в клинической практике наиболее информативным считается определение уровня активности ее изоферментов: прежде всего, анализ активности панкреатической α -амилазы используется для диагностики заболеваний поджелудочной железы. По данным Всемирной организации здравоохранения частота распространённости острого панкреатита в мире достигает 10% от всей неотложной хирургической патологии органов брюшной полости. При этом по разным оценкам у примерно 20% пациентов развиваются серьезные осложнения, некоторые из которых приводят к смерти. В целом, острый панкреатит диагностируется у 10-30 человек на 100 тысяч населения, но за последние несколько десятков лет в индустриальных странах, в том числе и в России, наметилась тенденция к увеличению случаев данного заболевания [27].

Между тем, повышение уровня α -амилазы происходит также при состояниях и заболеваниях, не относящихся к патологии поджелудочной железы. Самыми распространенными непанкреатическими причинами повышения активности фермента являются алкоголизм, травма живота, макроамилаземия, мезентериальная ишемия, перфорация язвы двенадцатиперстной кишки, кишечная непроходимость, рак легкого, внематочная беременность, заболевания желчного

пузыря, печеночная недостаточность, почечная недостаточность, некоторые хирургические вмешательства, в том числе малоинвазивные [19,26].

Методы определения активности α -амилазы и ее панкреатического изофермента

Общие принципы определения активности α -амилазы. К настоящему моменту разработаны различные методы определения общей активности α -амилазы и ее панкреатического изофермента в биологических жидкостях человека, основанные на абсорбционном анализе [1]. Принято считать, что активность фермента численно равна скорости катализируемой им реакции на линейном участке кинетической кривой при насыщающей концентрации субстрата в стандартных оптимальных условиях. На практике скорость катализируемой ферментом реакции, а значит и его активность, измеряется по скорости накопления продукта, при этом фиксируется изменение оптической плотности (ΔE) на линейном участке кинетической кривой за определенный промежуток времени (обычно за 1 минуту) (Δt). Расчет активности α -амилазы осуществляется относительно калибратора или по фактору пересчета, учитывающему величину экстинкции индикаторного вещества.

Активность α -амилазы выражается в единицах измерения активности катализаторов по Международной системе единиц измерения (СИ) в каталах (kat, кат) или в условных международных единицах (U, E, ME). В редких случаях для измерения активности α -амилазы применяют тривиальные единицы. При определении ее активности устаревшим методом Каравея используют так называемые «амилазные единицы»: одна единица активности соответствует такому количеству фермента, которое гидролизует 1 грамм крахмала за 1 час инкубации.

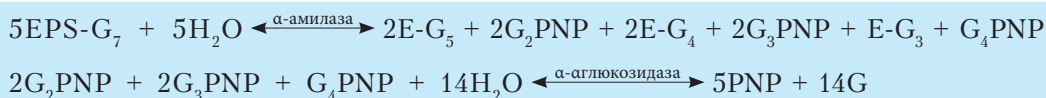
Методы на основе природных субстратов. Первые методы определения активности α -амилазы, получившие широкое распространение в медицинской диагностической лабораторной практике, базировались на использовании природного субстрата этого фермента — крахмала и его различных модификаций [20]. Принцип такого подхода заключается в том, что растворимый крахмал смешивают с йодом, в результате чего получается раствор синего цвета. При гидролизе крахмала α -амилазой с уменьшением длины молекулы цвет реакционного раствора изменяется с синего на красный, а затем обесцвечивается. Обычно время реакции ограничивают, останавливая ее путем добавления ингибитора фермента. Основанные на этом принципе методы разделяют на две группы в зависимости от детектируемого вещества. Методы определения

активности α -амилазы по скорости уменьшения содержания крахмала в ходе реакции называют амилокластическими, а по скорости увеличения содержания продуктов гидролиза крахмала — сахарогенными [23].

Важно отметить, что вышеперечисленные методы имеют множество недостатков, негативно влияющих на точность результатов определения активности α -амилазы. Например, неоднородность крахмала по длине и строению полимерных цепей приводит к невозможности стандартизации данных методов. Кроме того, при анализе наблюдается интерференция с белками и триглицеридами сыворотки крови человека [11]. На основе данных методов невозможно создать наборы реагентов с достаточно широкой областью определения активности α -амилазы, которая бы охватывала как физиологический диапазон активности фермента, так и патологический. Более того, данные методы не обеспечивают определение активности изоферментов α -амилазы по отдельности, а лишь их общую суммарную активность.

Современные методы определения активности общей α -амилазы и ее панкреатического изофермента основаны на колориметрических кинетических методах с использованием однородных синтетических олигосахаридов, содержащих на одном из концов молекулы остаток хромогена — соединения, которое при отщеплении начинает поглощать световое излучение в определенной области спектра. В клинической лабораторной практике наибольшую распространенность получили три синтетических субстрата: *4,6-ethylidene-(G₇)-p-nitrophenyl-(G₁)- α , D-maltoheptaoside (EPS-G₇)*, *2-chloro-4-nitrophenyl- α , D-maltotrioside (CNP G₃)* и *2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltoside (GalG₂CNP)* [16,30,31].

Метод с субстратом EPS-G₇. Субстрат EPS-G₇ состоит из семи остатков глюкозы и хромогена. При этом невозстанавливающий конец молекулы модифицирован внедрением 4,6-этилидена (E) для повышения устойчивости к α -глюкозидазе, которая необходима для полного расщепления глюкозного остова (G) субстрата и высвобождения 4-нитрофенола (PNP), окрашивающего реакцию смесь [17,18]:

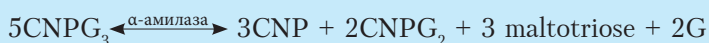


EPS-G₇ является одним из первых субстратов для определения активности α -амилазы в массовых исследованиях: его начали использовать более 30 лет назад и применяют до сих пор. К положительным аспектам применения данного субстрата можно отнести его стабильность в водной среде, удовлетворительные

аналитические характеристики методов на его основе, такие как линейный диапазон измерения, чувствительность и прецизионность.

Тем не менее использование субстрата EPS-G₇ не лишено недостатков: для получения конечных продуктов реакции — глюкозы и окрашенного соединения — необходим дополнительный фермент α -глюкозидаза, что приводит к снижению стабильности и удорожанию реагентов. Более того, существует трудность детекции 4-нитрофенола, связанная с тем, что значение pKa PNP находится вблизи оптимального для взаимодействия α -амилазы с EPS-G₇, pH (~7,0). В результате малейшего изменения pH раствора, например, из-за колебания температуры, значение молярного коэффициента экстинкции PNP будет изменяться, что в конечном счете отразится на определении значения активности α -амилазы. Кроме того, на оптическую плотность PNP могут оказывать влияние такие факторы, как ионная сила раствора, наличие в составе детергентов, присутствие в образце различных белков, в том числе гемоглобина, поэтому определение активности α -амилазы данным методом затруднено в гемолизированных образцах крови и пробах мочи, содержащих кровь [25,37].

Метод с субстратом CNP G₃. Впервые субстрат CNP G₃, состоящий из трех остатков глюкозы и хромогена (CNP), был описан 35 лет назад [44]. Главное его преимущество заключается в том, что для его гидролиза до конечных продуктов с высвобождением молекулы хромогена не нужны вспомогательные ферменты (подобно α -глюкозидазе в методе с EPS-G₇, т.е. такой подход принято считать «прямым» методом определения активности фермента:



Необходимо отметить, что при использовании столь короткого субстрата возникает проблема, связанная с крайне низкой скоростью его гидролиза α -амилазой. Ускорить реакцию позволяет присутствие роданида калия, который представляет собой хаотропный агент, сольбилизирующий неполярные фрагменты молекул. Показано, что такой активатор уменьшает константу Михаэлиса (KM) для CNP G₃, а также увеличивает Vmax [10]. Эффект

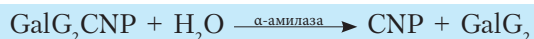
от тиоцианата некоторые исследователи интерпретируют как результат аллостерической перестройки фермента, которая позволяет селективно атаковать связь между агликоном и первой молекулой глюкозы, сводя к минимуму гидролиз по другим гликозидным связям. Таким образом, α -амилаза начинает вести себя подоб-

но α -глюкозидазе [40]. Вместе с тем, замечено, что при определенных концентрациях продуктов реакции гидролиз CNPG₃ сопровождается трансгликозилированием в присутствии тиоцианата калия с получением CNPG_n ($n > 3$) из субстрата и глюкозы, что может нарушить стехиометрию реакции гидролиза [22,40].

Несмотря на это, прямое измерение активности α -амилазы с CNPG₃ имеет безоговорочное преимущество перед EPS-G₇ — реакция проходит в одну стадию, поэтому использование такого субстрата позволяет существенно сократить время и издержки на выполнение теста. Благодаря использованию в качестве хромогена CNP, значение рКа которого (рКа 5,34) ниже оптимального водородного показателя для фермента с данным субстратом (рН 6,2-6,3), небольшие изменения рН раствора, например, вследствие колебаний температуры, не влияют на экстинкцию хромогена, в отличие от методов с 4-нитрофенолом [10].

В целом субстрат CNPG₃ позволяет создавать стабильные реагенты с широким диапазоном измерения активности α -амилазы и возможностью адаптации к автоматическим биохимическим анализаторам, используемых в клинических лабораториях.

Метод с субстратом GalG₂CNP. В 2000-х годах был разработан субстрат GalG₂CNP, представляющий собой неразветвленный олигосахарид, состоящий из галактозы и двух остатков глюкозы с присоединенным к ним CNP [29]. Подобно субстрату CNPG₃, GalG₂CNP не требует вспомогательных ферментов для его гидролиза α -амилазой. Таким образом, методы базирующиеся на использовании данного субстрата также считаются прямыми. В результате реакции происходит образование двух продуктов — CNP и



β -D-галактопиранозилмальтозы (GalG₂).

Из уравнения реакции следует, что отщепление глюкозы от субстрата не происходит, поэтому, несмотря на присутствие роданида калия, добавляемого для увеличения скорости реакции, GalG₂CNP не полимеризуется, а значит, гидролиз проходит стехиометрически в одну стадию. Кроме того, реагенты на основе метода с использованием субстрата GalG₂CNP отличаются высокой стабильностью поскольку не требуют дополнительного фермента α -глюкозидазы, что крайне важно для удобства их использования в условиях клинико-диагностических лабораторий.

Другой важной характеристикой методов лабораторной диагностики является их устойчивость к наиболее распространенным интерферентам — эндогенным, используемым в качестве антикоагулянтов

(гепарин, соли ЭДТА), либо эндогенным, присутствующим в пробе вследствие патологических процессов или нарушений пробоподготовки.

Для определения активности амилазы в плазме крови с помощью наборов реагентов с субстратом EPS-G₇, согласно литературным данным, в качестве антикоагулянта рекомендуется использовать гепарин. Считается также, что соли ЭДТА из-за хелатных свойств могут лишать фермент ионов кальция, что может привести к ингибированию активности α -амилазы.

Метод, основанный на применении в качестве субстрата GalG₂CNP, в отличие от альтернативных, не имеет ограничений по использованию того или иного типа образца и, наряду с сывороткой крови, позволяет проводить исследования в плазме крови, полученной как при использовании в качестве антикоагулянта как гепарина, так и солей ЭДТА [3]. Кроме того, в ходе клинических испытаний доказана устойчивость данного метода к высоким концентрациям гемоглобина, что, в отличие охарактеризованных выше других методов, делает его пригодным для определения активности изоферментов α -амилазы в образцах с разной степенью гемолиза

Таким образом, субстрат GalG₂CNP, в целом, не только лишен недостатков своих предшественников, но и обладает рядом преимуществ, обеспечивающих технологическую возможность для промышленного производства высокостабильных реагентов с широким диапазоном измерения активности изоферментов α -амилазы [4].

Селективное определение активности панкреатического изофермента α -амилазы. Учитывая приоритетную потребность лабораторной медицины в необходимости определения панкреатической α -амилазы, в состав наборов реагентов включают моноклональные антитела к слюнному изоферменту, которые позволяют с большой точностью разделять панкреатический и слюнный изоферменты α -амилазы [41]. Моноклональные антитела имеют чрезвычайно высокую иммуноспецифичность — 1 моль антител распознает и взаимодействует с 1 молекул антигена, в результате чего формируется растворимый комплекс антиген-антитело, что приводит к практически полному ингибированию каталитической активности слюнного изофермента в широком диапазоне его активности. В этой связи, важно подчеркнуть, что ряд исследователей указывают на имеющиеся трудности определения активности панкреатического изофермента с помощью ингибирования антителами слюнной α -амилазы при использовании субстрата CNPG₃, что не наблюдается при применении субстрата GalG₂CNP [10,22].

Заключение

α -амилаза — один из немногих ферментов, для которого описано наибольшее количество процедур измерения активности. Современные подходы к определению ее активности, применяемые в клинико-диагностических лабораториях, базируются на использовании синтетических гомогенных субстратов, дающих возможность создания унифицированных наборов реагентов для определения активности изоферментов α -амилазы.

Наибольшее распространение в лабораторной медицине получили методы с использованием в качестве субстратов EPS-G₇, CNPG₃ и GalG₂CNP. Однако для полного гидролиза EPS-G₇ необходим дополнительный фермент, что ведет к удорожанию и уменьшению стабильности реагентов. Кроме того, для данного субстрата доказано значительное влияние внешних условий на детекцию индикаторного вещества. Существенным недостатком другого метода, основанного на применении в качестве субстрата CNPG₃, является способность последнего реполимеризоваться в процессе его гидролиза α -амилазой, что ведет к изменению стехиометрии реакции.

Наборы реагентов, базирующиеся на методе с использованием GalG₂CNP, не требуют включения в их состав дополнительного фермента, отличаются высокой стабильностью, позволяют определять активность α -амилазы не только в гепаринизированной, но и в EDTA-плазме крови, обладают высокой устойчивостью к интерферентам, в частности, к гемоглобину, что существенно расширяет возможность их применения в клинико-лабораторном сопровождении пациента.

Список литературы

1. Балябина М.Д., Слепшаева В.В., Козлов А.В. Методы определения α -амилазы // *Лабораторная диагностика*. — 2007. — № 2. — С. 26–32.
2. Быков В.Л. Частная гистология человека / СПб.: СОТИС, 1999. — 301 с.
3. Черемисина К.А. Активность некоторых ферментов в гепаринизированной и ЭДТА-плазме крови: сравнение с сывороткой // *Медицинский алфавит*. — 2016. — № 23 (286). — С. 45–48.
4. Черемисина К.А., Яковлева Г.Е., Барабошкина А.В., Аглетдинов Э.Ф. Результаты валидации нового метода определения активности α -амилазы человека для диагностики патологий поджелудочной железы // *Сибирский научный медицинский журнал*. — 2021. — № 4. — С. 79–85.
5. Akinfemiwa O., Muniraj T. Amylase // *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557738/*. (дата обращения 20.06.2023)
6. Bank R., Hettema E., Arwert F. et al. Electrophoretic characterization of posttranslational modifications of human parotid salivary alpha-amylase // *Electrophoresis*. — 1991. — Vol. 12. — P. 74–79.
7. Carpenter D., Dhar S., Mitchell L. et al. Obesity, starch digestion and amylase: association between copy number variants at human salivary (AMY1) and pancreatic (AMY2) amylase genes // *Hum. Mol. Genet.* — 2015. — Vol. 24. — P. 3472–3480.
8. Davenport E. Tooth be told, genetics influences oral microbiome // *Cell Host Microbe*. — 2017. — Vol. 22. — P. 251–253.
9. Fisher S., Govindasamy L., Tu C. et al. Structure of human salivary α -amylase crystallized in a C-centered monoclinic space group // *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* — 2006. — Vol. 62, Pt. 2. — P. 88–93.
10. Gella F., Gubern G., Vidal R., Canalias F. Determination of total and pancreatic alpha-amylase in human serum with 2-chloro-4-nitrophenyl-alpha-D-maltotriose as su // *Clin. Chim. Acta*. — 1997. — Vol. 259. — P. 147–160.
11. Gitlitz P., Frings C. Interferences with the starch-iodine assay for amylase activity, and effects of hyperlipemia // *Clin. Chem.* — 1976. — Vol. 22. — P. 2006–2009.
12. Gumucio D., Wiebauer K., Caldwell R. et al. Concerted evolution of human amylase genes // *Mol. Cell. Biol.* — 1988. — Vol. 8. — P. 1197–1205.
13. Hardy K., Brand-Miller J., Brown K. et al. The importance of dietary carbohydrate in human evolution // *Rev. Biol.* — 2015. — Vol. 90. — P. 251–268.
14. Inchley C., Larbey C., Shwan N. et al. Selective sweep on human amylase genes postdates the split with Neanderthals // *Sci Rep*. 2016 Nov 17;6:37198. doi: 10.1038/srep37198.
15. Kandra L., Gyémánt G., Remenyik J. et al. Subsite mapping of human salivary alpha-amylase and the mutant Y151M // *FEBS Lett.* — 2003. — Vol. 544. — P. 194–198.
16. Katayama S., Ikeuchi M., Kanazawa N. et al. Amylase-producing lung cancer: case report and review of the literature // *Cancer*. — 1981. — Vol. 48. — P. 2499–2502.
17. Kazmierczak S., Van Lente F. Mechanism of action of human pancreatic and salivary α -amylase on 4,6-ethylidene- α -4-nitrophenylmaltoheptaoside

substrate // *Clin Chem.* - 1989. - Vol. 35. - P. 188-189.

18. Kruse-Jarres J., Kaiser C., Hafkenscheid J. et al. Evaluation of a new α -amylase assay using 4,6-ethylidene-(G7)-1-4-nitrophenyl-(G1)- α -D-maltoheptaoside as substrate // *J Clin Chem Clin Biochem.* - 1989. - Vol. 27. - P. 103-113.

19. Kwon C., Kim H., Korc P. et al. Can we detect chronic pancreatitis with low serum pancreatic enzyme levels? // *Pancreas.* - 2016. - Vol. 45. - P. 184-188.

20. Lehane D., Wissert P., Lum G., Levy A. Amylase activity in serum and urine: comparison of results by the amyloclastic, dyed-starch, and nephelometric techniques // *Clin Chem.* - 1977. - Vol. 23. - P. 1061-1065.

21. Leuchs E. Ueber die verzuckerung des starkmehls // *Arch. Gesamte Naturl.* - 1831. - № 3. - S. 105-107.

22. Lorentz K., Gütschow B., Renner F. Evaluation of a direct alpha-amylase assay using 2-chloro-4-nitrophenyl-alpha-D-maltotrioxide // *Clin Chem Lab Med.* - 1999. - Vol. 37. - P. 1053-1062.

23. Mac Donald R. Standard methods of clinical chemistry // N. Y.: Academic press, 1970.- 281 p.

24. Mac Gregor E., Janecek S., Svensson B. Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes // *Biochim Biophys Acta.* - 2001. - Vol. 1546. - P. 1-20.

25. Makise J., Amakawa T., Nakayama T. Problems in the measurement of α -amylase activity using 4-nitrophenyl maltooligosaccharides as the substrate // *Jpn J Clin Chem.* - 1986. - Vol. 15. - P. 59-67.

26. Marini J. Critical care medicine: The essentials/Philadelphia: Wollters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2010. - 720 p.

27. Matull W., Pereira S., O'Donohu J. Biochemical markers of acute // *J Clin Pathol.* - 2006. - Vol. 59. - P. 340-344.

28. Meisler M., Ting C. The remarkable evolutionary history of the human amylase // *Crit Rev Oral Biol Med.* - 1993. - Vol. 4. - P. 503-509.

29. Morishita Y., Iinuma Y., Nakashima N. et al. Total and pancreatic amylase measured with 2-chloro-4-nitrophenyl-4-o- β -d-galactopyranosylmaltoside // *Clin Chem.* - 2000. - Vol. 46. - P. 928-933.

30. Okabe H., Uji Y., Netsu K., Noma A. Automated measurement of amylase isoenzymes with 4-nitrophenyl-maltoheptaoside as substrate and use

of a selective amylase inhibitor // *Clin Chem.* - 1984. - Vol. 30. - P. 1219-1222.

31. Otsu N., Oami H., Okawa M. et al. Amylase in the thyroid gland // *Histochemistry.* - 1982. - Vol. 74. - P. 21-26.

32. Pajic P., Pavlidis P., Dean K. et al. Independent amylase gene copy number bursts correlate with dietary preferences in mammals // *Elife.* 2019 May 14;8:e44628. doi: 10.7554/eLife.44628.

33. Perry G., Dominy N., Claw K. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation // *Nat Genet.* - 2007. - Vol. 39. - P. 1256-1260.

34. Peyrot des Gachons C., Breslin P. Salivary amylase: digestion and metabolic syndrome // *Curr Diab Rep.* 2016 Oct;16(10):102. doi: 10.1007/s11892-016-0794-7.

35. Poole A., Goodrich J., Youngblut N. et al. Human salivary amylase gene copy number impacts oral and gut microbiomes // *Cell Host Microbe.* - 2019. - Vol. 25. - P. 553-564.

36. Ramasubbu N., Paloth V., Luo Y. et al. Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity // *Acta Crystallogr Sect D. Biol. Crystallogr.* - 1996. - Vol. 52. - P. 435-446.

37. Rauscher E., Neumann U., Schaich E. et al. Optimized conditions for determining activity concentration of α -amylase in serum, with 1,4- α -D-4-nitrophenylmaltoheptaoside as // *Clin Chem.* - 1985. - Vol. 31. - P. 14-19.

38. Royse V., Jensen D. Development of an agarose gel electrophoresis technique for determining α -amylase isoenzymes // *Clin Chem.* - 1984. - Vol. 30. - P. 387-390.

39. Samuelson L., Wiebauerl K., Gumucio D., Meisler M. Expression of the human amylase genes: recent origin of a salivary amylase promoter from an actin pseudogene // *Nucl Acids Res.* - 1988. - Vol. 16. - P. 8261-8276.

40. Suganuma T., Maeda Y., Kltahara K., Naga-hama T. Study of the human salivary alpha-amylase on 2-chloro-4-nitrophenyl- α -maltotrioxide in the presence of potassium thiocyanate // *Carbohydr Res.* - 1997. - Vol. 303. - P. 219-227.

41. Svens E., Kapyaho K., Tanner P., WeberT. Immunocatalytic assay of pancreatic alpha-amylase in serum and urine with a specific monoclonal antibody // *Clin Chem.* - 1989. - Vol. 35. - P. 662-664.

42. Takeuchi T. Human amylase isoenzymes separated on concanavalin A-Sepharose // *Clin Chem.*

- 1979. - Vol. 25.- P. 1406-1410.

43. Usher C., Handsaker R., Esko T. et al. Structural forms of the human amylase locus and their relationships to SNPs, haplotypes and obesity // *Nat Genet.* - 2015. - Vol. 47. - P. 921-925.

44. Winn-Deen E., David H., Sigier G., Chavez R. Development of a direct assay for α -amylase // *Clin Chem.* - 1988. - Vol. 34. - P. 2005-2008.

45. Yamamoto T. *Enzyme chemistry and molecular biology of amylase and related enzymes / USA: CRC Press, 1995.- 224 p.*