I.3.1.1.1. Determinarea activităţii α-amilazei în serul sanguin şi urină (micrometoda Metais şi Bieth)

În organismul animal α-amilaza este sintetizată predominant la nivelul pancreasului şi glandelor salivare, de unde trece în sânge şi se elimină pe cale renală. α-amilaza de proveniență animală este activată de ionii de Cl^-, în concentraţie de 0,01M şi inhibată de ionii citrat şi oxalat.

Determinarea activităţii α-amilazei în ser, urină şi sucul duodenal constituie un important test pentru explorarea fiziopatologică a pancreasului.

Principiul metodei. α-Amilaza hidrolizează în timp de 30 minute la 37°C, amidonul în soluţie tampon de fosfat, cu pH 7,4. La sfârşitul perioadei de incubare amidonul nescindat este dozat spectrofotometric, la lungimea de undă λ=580 nm, după coloraţia violet pe care o dă cu iodul.

Reactivi. *1) Soluţie tampon de fosfaţi M/15 cu pH=7,4*. Într-un balon cotat de 250 ml se dizolvă 4,8837 g de fosfat disodic ($Na_2HPO_4*12H_2O$) şi 0,4130 g de fosfat monopotasic (KH_2PO_4) în 150 ml apă bidistilată. Se corectează pH-ul soluţiei la 7,4 la un pH-metru şi se completează la semn cu apă bidistilată. Se conservă în sticlă brună la +4°C.

2) Soluţie tampon de fosfaţi 30 %. Se prepară prin amestecarea a 30 ml soluţie tampon de fosfaţi M/15 (reactiv 1) cu 70 ml apă bidistilată.

3) Soluţie stoc de amidon 1% în tampon de fosfaţi M/15 cu pH=7,4. Se măsoară 80 ml soluţie tampon de fosfaţi M/15, cu pH=7,4 (reactiv 1) într-un flacon conic de 150-200 ml şi se aduce la fierbere. Într-un pahar Berzelius de 50-100 ml se suspendă 1 g de amidon în 10 ml soluţie tampon fosfaţi M/15 (reactiv 1). Suspensia de amidon se trece cantitativ în cei 80 ml soluţie tampon de fosfaţi M/15 în fierbere. Paharul Berzelius se spală de 2-3 ori cu câte 3-5 ml soluţie tampon de fosfaţi M/15. Lichidele de spălare se adaugă la soluţia de amidon. Pentru distrugerea microorganismelor, soluţia de amidon se fierbe încă 3-5 minute până devine clară. După răcire soluţia de amidon se transvazează cantitativ într-un balon cotat de 100 ml. Flaconul conic în care s-a preparat soluţia de amidon, se spală de 2-3 ori cu volume mici de soluţie tampon de fosfaţi M/15 cu pH=7,4 (reactiv 1) care se adaugă în balonul cotat. Soluţia de amidon preparată astfel este stabilă maximum 10 zile dacă se păstrează la +4°C.

4) Soluţie de iod N/3000. Se va prepara extemporaneu (la momentul utilizării) prin diluarea a 0,33 ml soluţie de iod N/10 (vezi Reactiv 4, *Lucrarea I.1.7*) cu apă distilată într-un balon cotat de 100 ml.

5) Soluţie de acid clorhidric 1N. Se vor dilua 9 ml de acid clorhidric (HCl) concentrat (d=1,19 g/cm^3) cu apă distilată la 100 ml, într-un balon cotat.

Modul de lucru. *A) DILUAREA LICHIDELOR BIOLOGICE*. În mod normal determinarea activităţii α-amilazei se face cu:
- ser nediluat;

- urină diluată 1/3 cu ser fiziologic;
- suc duodenal diluat cu ser fiziologic până la o activitate potrivită.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII α-AMILAZEI. În momentul efectuării lucrării se prepară o soluţie de amidon 0,3 % amestecând 3 ml soluţia stoc de amidon (reactiv 3) cu 7 ml soluţie tampon de fosfaţi 30 % (reactiv 2).

Pentru efectuarea determinării activităţii α-amilazei se procedează conform indicaţiilor din tabelul de mai jos.

Reactivi	Eprubetele	
	Probă	Martor
Soluţie de amidon 0,3 % (ml)	0,50	0,50
Eprubetele se introduc pentru 5 minute în termostat, la 37°C		
Lichid biologic de analizat (ml)	0,02	-
Se incubează exact timp de 30 minute la 37°C		
Soluţie de acid clorhidric 1N (ml)	0,10	0,10
Lichid biologic de analizat (ml)	-	0,02
Apă distilată (ml)	2,00	2,00
Soluţie de iod N/3000 (ml)	9,00	9,00
Agitare şi citirea extincţiei martorului (E_1) şi probei (E_2) la λ=580 nm, faţă de soluţia de iod N/3000		

Calculul rezultatelor. Activitatea α-amilazei se exprimă în unităţi Wohlgemuth într-un mililitru (U.W./ml) şi reprezintă numărul de mg de amidon hidrolizat în timp de 30 minute la 37°C de enzima din 1 ml de lichid biologic.

Extincţia E_1 corespunde la 1,5 mg de amidon. Diferenţa E_1-E_2 reprezintă cantitatea de amidon hidrolizat de α-amilaza din 0,02 ml de lichid de cercetat. Cantitatea de amidon hidrolizat, exprimată în mg, sub acţiunea α-amilazei în timp de 30 minute va fi:

$$X = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 1{,}5$$

Pentru a obţine numărul de mg de amidon hidrolizat la 37°C, timp de 30 minute, de către enzima din 1 ml ser sanguin (U.W./ml) se amplifică cu 50, deoarece volumul de lichid biologic utilizat este de 0,02 ml:

$$UW/ml = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 1{,}5 \cdot 50$$

La determinarea activităţii α-amilazei se va ţine cont şi de eventualele diluţii ale lichidului biologic de analizat.

OBSERVAŢII. Dacă extincţia E_2 este mai mică decât jumătatea extincţiei E_1 ($E_2=E_1/2$) se diluează lichidul biologic cu ser fiziologic până la o activitate corespunzătoare şi se va repeta determinarea.

Pentru determinarea activităţii α-amilazei se recomandă folosirea de lichide biologice proaspete. O uşoară hemoliză a sângelui nu influenţează rezultatele.

Importanţa practică. *Amilazemia* (activitatea amilazei serice) are valorile normale cuprinse între 4,5 şi 10,1 U.W./ml. În practică se admit valori anormale acelea care depăşesc de două ori valorile fiziologice adică 15 U.W./ml, ca şi valorile de trei ori mai mari care sunt net patologice (22 U.W./ml).

Amilazuria (activitatea amilazei din urină) variază foarte puternic în funcţie de volumul urinei din 24 ore: 43,5 ± 16,5 U.W./ml.

Creşterea activităţii α-amilazei se întâlneşte mai ales în bolile pancreasului. În pancreatita acută activitatea α-amilazei serice şi urinare creşte de 10 - 30 ori. *Hiperamilazemia* se instalează imediat după începerea bolii, înregistrează maximul la 12 - 24 ore şi apoi scade revenind la normal în 2 - 6 zile. De obicei *hiperamilazuria* se prelungeşte mai mult decât creşterea activităţii enzimei în serul sanguin.

Pancreatitele cronice, cancerul pancreasului nu duc la o creştere pronunţată a activităţii α-amilazei sanguine şi pentru diagnosticarea lor se utilizează aşa-numitele probe provocate. Activitatea amilazică poate fi mărită într-o serie de maladii care au un tablou clinic asemănător cu pancreatita acută: apendicita acută, peritonita, ulcerul perforat al stomacului, ocluzia intestinală, colecistita acută. În cazul peritonitelor activitatea amilazică se datorează α-amilazei sintetizate de bacterii. Activitatea enzimei în bolile indicate se intensifică de 3 - 5 ori. Deci, hiperamilazemia puternic exprimată permite diferenţierea pancreatitei acute nu numai de bolile cronice ale pancreasului, ci şi de alte afecţiuni.

Aproape totdeauna amilazemia este însoţită de amilazurie, însă determinarea activităţii amilazei urinare este un indicator diagnostic mai puţin exact deoarece eliminarea amilazei în urină poate fi corelată cu funcţia rinichilor. Creşterea activităţii amilazei serice în bolile cronice ale rinichilor şi în uremiile acute se poate explica prin diminuarea sau lipsa eliminării enzimei pe cale renală.

Determinarea activităţii amilazei în sânge şi urină poate oferi unele indicaţii asupra stării funcţionale a aparatului renal. În nefroze, glomerulonefrite etc. activitatea amilazică a sângelui este crescută iar cea a urinei scade sub valoarea normală. Coeficientul amilazemie/amilazurie poate sluji ca un indicator al realizării depline a procesului de filtrare glomerulară.

O altă maladie caracterizată prin ridicarea însemnată a activităţii α-amilazei în sânge este parotidita, dar tabloul clinic clar al acesteia dă posibilitatea diferenţierii hiperamilazemiei. Administrarea unor hormoni (ACTH etc.) intensifică activitatea enzimei de câteva ori.

În afecţiunile ficatului (hepatite, ciroze, intoxicaţii, tumori canceroase şi metastazele lor în ficat) se observă scăderea activităţii amilazice a sângelui. *Hipoamilazemia*, de asemenea, se observă în arsurile întinse ale pielii, diabetul zaharat, dispepsii, caşexii etc.

I.3.1.1.2. Determinarea activităţii α-amilazei în salivă (micrometoda Metais şi Bieth, adaptată de Vlad Artenie)

Principiul metodei. α-Amilaza hidrolizează în timp de 30 minute la 37°C, amidonul în soluţie tampon de fosfaţi, cu pH 7,0. La sfârşitul perioadei de incubare amidonul nescindat este dozat spectrofotometric, la lungimea de undă λ=580 nm, după coloraţia violet pe care o dă cu iodul.

Reactivi. *1) Soluţie de NaCl (ser fiziologic).* Se dizolvă 0,9 g clorură de sodiu (NaCl) în 100 ml apă bidistilată.

2) Soluţie tampon de fosfaţi M/15 cu pH=7,0. Într-un balon cotat de 250 ml se dizolvă 4,8837 g de fosfat disodic ($Na_2HPO_4*12H_2O$) şi 0,4130 g de fosfat monopotasic(KH_2PO_4) în 150 ml apă bidistilată. Se corectează pH-ul soluţiei la 7,0 cu ajutorul unui pH-metru şi se completează la semn cu apă bidistilată. Se conservă în sticlă brună la +4°C.

3) Soluţie tampon de fosfaţi 30 %. Se prepară prin amestecarea a 30 ml soluţie tampon de fosfaţi M/15 (reactiv 2) cu 70 ml apă bidistilată.

4) Soluţie stoc de amidon 1% în soluţie tampon de fosfaţi M/15 cu pH=7,0. Se măsoară 80 ml soluţie tampon de fosfaţi M/15, cu pH=7,0 (reactiv 2) într-un flacon conic de 150-200 ml şi se aduce la fierbere. Într-un pahar Berzelius de 50-100 ml se suspendă 1 g de amidon în 10 ml soluţie tampon fosfaţi M/15 (reactiv 2). Suspensia de amidon se trece cantitativ în cei 80 ml soluţie tampon de fosfaţi M/15 în fierbere. Paharul Berzelius se spală de 2-3 ori cu câte 5-10 ml de soluţie tampon de fosfaţi M/15 în care s-a turnat suspensia de amidon. Lichidele de spălare se adaugă la soluţia de amidon. Pentru distrugerea microorganismelor, soluţia de amidon se fierbe încă 3-5 minute până devine clară. După răcire soluţia de amidon se transvazează cantitativ într-un balon cotat de 100 ml. Flaconul conic în care s-a preparat soluţia de amidon, se spală de 2-3 ori cu volume mici de soluţie tampon de fosfaţi M/15 cu pH=7,0 (reactiv 2) care se adaugă în balonul cotat. Soluţia de amidon preparată astfel este stabilă maximum 10 zile dacă se păstrează la +4°C.

5) Soluţie de iod N/3000. Se va prepara extemporaneu (la momentul utilizării) prin diluarea a 0,33 ml soluţie de iod 0,1 N (vezi Reactiv 4, *Lucrarea I.1.7*) cu apă distilată la 100 ml.

6) Soluţie de acid clorhidric 1N. Se diluează 9 ml de acid clorhidric (HCl) concentrat (d=1,19) cu apă distilată la 100 ml, într-un balon cotat.

7) Soluţie de acid clorhidric 0,1 N. Se diluează 10 ml soluţie de acid clorhidric 1N cu apă distilată la 100 ml, într-un balon cotat.

Modul de lucru. În mod normal determinarea activităţii α-amilazei se face în salivă diluată cu ser fiziologic.

A) OBŢINEREA SALIVEI DILUATE. Gura se spăla de 4 – 5 ori cu apa pentru îndepărtarea resturilor alimentare. După 5 – 10 minute saliva se prelevează în eprubete Eppendorf curate şi uscate, conice. Lichidul adunat se centrifughează 15 minute la 3000 - 4000 rot./min. Supernatantul se transvazează în altc eprubete Eppendorf.

Pentru determinarea activităţii α-amilazei saliva separată prin centrifugare se diluează cu ser fiziologic după schema următoare:

1) Se pipetează 0,1 ml salivă în 14,9 ml ser fiziologic sau 0,05 ml salivă + 7,45 ml ser fiziologic. Se realizează o diluţie de 150 ori. Să denumim acest preparat salivă diluată (I).

2) Se amestecă 0,1 ml salivă diluată (I) cu 2,4 ml ser fiziologic. Gradul de diluţie creşte la 150 + 25 = 175 ori (salivă diluată II). Mai departe se va lucra cu soluţia de saliva diluată II.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII α-AMILAZEI. În momentul efectuării lucrării se prepară o soluţie de amidon 0,3 % amestecând 3 (6) ml soluţie stoc de amidon (reactiv 4) cu 7 (14) ml soluţie tampon de fosfaţi 30 % (reactiv 3), în funcţie de numărul probelor de analizat.

Pentru efectuarea determinării activităţii α-amilazei se procedează conform indicaţiilor din tabelul următor.

Specificaţie	Eprubetele	
	Proba	Martor
Soluţie de amidon 0,3 % (ml)	0,50	0,50
Eprubetele se introduc pentru 5 minute în termostat, la 37°C		
Salivă diluată (ml)	0,10	-
Se incubează exact timp de 30 minute la 37°C		
Soluţie de acid clorhidric 0,1N (ml)	1,00	1,00
Salivă diluată (ml)	-	0,10
Apă distilată (ml)	1,40	1,40
Soluţie de iod N/3000 (ml)	9,00	9,00
Agitare şi citirea extincţiei martorului (E_1) şi probei (E_2) la λ=580 nm, faţă de soluţia de iod N/3000		

Calculul rezultatelor. Activitatea α-amilazei se exprimă în unităţi Wohlgemuth într-un mililitru (U.W./ml) şi reprezintă numărul de mg de amidon hidrolizat în timp de 30 minute la 37°C de enzima din 1 ml de salivă.

Extincţia E_1 corespunde la 1,5 mg de amidon. Diferenţa E_1-E_2 reprezintă cantitatea de amidon hidrolizat de α-amilaza din 0,10 ml salivă diluată. Cantitatea de amidon hidrolizat, exprimată în mg, sub acţiunea α-amilazei în timp de 30 minute va fi:

$$X = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 1{,}5$$

Pentru a obţine numărul de mg de amidon hidrolizat la 37°C, timp de 30 minute, de către enzima din 1 ml salivă (U.W./ml) se utilizează formula următoare:

$$\text{UW/ml} = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \times 1{,}5 \times \frac{2{,}5}{0{,}1} \times \frac{15}{0{,}1} \times \frac{1}{0{,}1}$$

OBSERVAŢII. 1. Dacă extincţia E_2 este foarte apropiată de extincţia E_1, diferenţa dintre E_1 şi E_2 fiind mai mică de 0,100 unităţi de extincţie, atunci se va lucra cu saliva diluată I. La calculul final se va ţine cont de diluţia făcută.

2. Dacă extincţia E_2 este mai mică decât jumătatea extincţiei E_1 ($E_2=E_1/2$) se diluează saliva cu ser fiziologic până la 200 de ori, adăugând 0,1 ml salivă diluată II la 2,4 ml ser fiziologic. Se obţine saliva diluată III. La calculul final se va ţine cont de diluţia făcută.

3. Pentru determinarea activităţii α-amilazei se recomandă folosirea de salivă proaspătă.