

**1.3.1.1.1. Determinarea activității α -amilazei
în serul sanguin și urină
(micrometoda Metais și Bieth)**

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

Determinarea activității α -amilazei în ser, urină și suc 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 soluție tampon de fosfat, cu pH 7,4. La sfârșitul perioadei de incubare amidonul nescindat este dozat spectrofotometric, la lungimea de undă $\lambda=580\text{ nm}$, după colorația violet pe care o dă cu iodul.

Reactivi. 1) *Soluție tampon de fosfați M/15 cu pH=7,4.* Într-un balon cotat de 250 ml se dizolvă 4,8837 g de fosfat disodic ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) și 0,4130 g de fosfat monopotasic (KH_2PO_4) în 150 ml apă bidistilată. Se corectează pH-ul soluției la 7,4 la un pH-metru și se completează la semn cu apă bidistilată. Se conservă în sticlă brună la $+4^\circ\text{C}$.

2) *Soluție tampon de fosfați 30 %.* Se prepară prin amestecarea a 30 ml soluție tampon de fosfați M/15 (reactiv 1) cu 70 ml apă bidistilată.

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

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

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

Modul de lucru. A) *DILUAREA LICHIDELOR BIOLOGICE.* În mod normal determinarea activității 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 ACTIVITĂȚII α -AMILAZEI. În momentul efectuării lucrării se prepară o soluție de amidon 0,3 % amestecând 3 ml soluția stoc de amidon (reactiv 3) cu 7 ml soluție tampon de fosfați 30 % (reactiv 2).

Pentru efectuarea determinării activității α -amilazei se procedează conform indicațiilor din tabelul de mai jos.

Reactivi	Eprubetele	
	Probă	Martor
Soluție de amidon 0,3 % (ml)	0,50	0,50
Eprubetele se introduc pentru 5 minute în termostaț, la 37°C		
Lichid biologic de analizat (ml)	0,02	-
Se incubează exact timp de 30 minute la 37°C		
Soluție de acid clorhidric 1N (ml)	0,10	0,10
Lichid biologic de analizat (ml)	-	0,02
Apă distilată (ml)	2,00	2,00
Soluție de iod N/3000 (ml)	9,00	9,00
Agitare și citirea extincției martorului (E_1) și probei (E_2) la $\lambda=580$ nm, față de soluția de iod N/3000		

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

Extincția E_1 corespunde la 1,5 mg de amidon. Diferența 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 acțiunea α -amilazei în timp de 30 minute va fi:

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

Pentru a obține 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 activității α -amilazei se va ține cont și de eventualele diluții ale lichidului biologic de analizat.

OBSERVAȚII. Dacă extincția E_2 este mai mică decât jumătatea extincției E_1 ($E_2 = E_1/2$) se diluează lichidul biologic cu ser fiziologic până la o activitate corespunzătoare și se va repeta determinarea.

Pentru determinarea activității α -amilazei se recomandă folosirea de lichide biologice proaspete. O ușoară hemoliză a sângelui nu influențează rezultatele.

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

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

Creșterea activității α -amilazei se întâlnește mai ales în bolile pancreasului. În pancreatita acută activitatea α -amilazei serice și urinare crește de 10 - 30 ori. *Hiperamilazemia* se instalează imediat după începerea bolii, înregistrează maximul la 12 - 24 ore și apoi scade revenind la normal în 2 - 6 zile. De obicei *hiperamilazuria* se prelungește mai mult decât creșterea activității enzimei în serul sanguin.

Pancreatitele cronice, cancerul pancreasului nu duc la o creștere pronunțată a activității α -amilazei sanguine și pentru diagnosticarea lor se utilizează așa-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 diferențierea pancreatitei acute nu numai de bolile cronice ale pancreasului, ci și de alte afecțiuni.

Aproape totdeauna amilazemia este însoțită de amilazurie, însă determinarea activității amilazei urinare este un indicator diagnostic mai puțin exact deoarece eliminarea amilazei în urină poate fi corelată cu funcția rinichilor. Creșterea activității amilazei serice în bolile cronice ale rinichilor și în uremiile acute se poate explica prin diminuarea sau lipsa eliminării enzimei pe cale renală.

Determinarea activității amilazei în sânge și urină poate oferi unele indicații asupra stării funcționale 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 activității α -amilazei în sânge este parotidita, dar tabloul clinic clar al acesteia dă posibilitatea diferențierii hiperamilazemiei. Administrarea unor hormoni (ACTH etc.) intensifică activitatea enzimei de câteva ori.

În afecțiunile ficatului (hepatite, ciroze, intoxicații, tumori canceroase și metastazele lor în ficat) se observă scăderea activității amilazice a sângelui. *Hipoamilazemia*, de asemenea, se observă în arsurile întinse ale pielii, diabetul zaharat, dispepsii, cașexii etc.