

TEHNICA SIMPLA PENTRU DOZAREA CAPACITĂȚII SERULUI DE INHIBARE A TRIPSINEI

M. Kerekes, Susana Bordy, E. Módy

Serul uman normal conține trei globuline majore diferite cu acțiune antiproteinazică, care inhibă tripsina, respectiv chimotripsina: alfa-1-antitripsina (alfa-1-AT), inhibitorul inter-alfa și alfa-2-macroglobulina (1, 2, 3). Dintre acestea, în serul normal predomină, din punct de vedere cantitativ alfa-1-AT. Dozarea directă a alfa-1-AT se efectuează prin imunodifuzie radială (4), electroimunodifuzie (3) și tehnici radioimunologice (5), metode laborioase și costisitoare. Pe lângă acestea se mai utilizează și metode enzimato-logice indirecte. Acestea se bazează pe dozarea capacității de inhibare a tripsinei (CIT) a serului, 90% a acesteia datorându-se alfa-1-AT atât la sănătoși cât și în diverse stări patologice, în care dozarea CIT poate avea valoare diagnostică (3). Aceste tehnici impun și ele utilizarea unor substraturi speciale (benzoi-arginin-para-nitranilidă, azocazeină).

Ținând seama de dificultățile legate de dozarea alfa-1-AT, respectiv a CIT, am elaborat o tehnică relativ simplă, pentru dozarea CIT.

Descrierea metodei

Principiu. O soluție de cazeină este incubată cu tripsină în prezența, respectiv absența serului. Inhibitorii prezenți în ser inhibă, parțial, tripsina. Diferența dintre activitatea tripsinei în cele două probe este proporțională cu cantitatea alfa-1-AT din ser.

Reactivi. 1. Tampon fosfat 0,1 M, pH 7,6. Conține 7,84 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ sau 15,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ și 0,784 g KH_2PO_4 în 500 ml soluție apoasă. 2. NaOH N. Se prepară dizolvând 8 g NaOH în apă distilată, la un volum final de 200 ml. Se ține în sticlă închisă cu dop de cauciuc. 3. Substrat: 4 g cazeină Hammarsten (de preferință Merck) se pun într-un Erlenmeyer de 300 ml, se adaugă 3,14 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (sau 6,28 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), 0,314 g KH_2PO_4 , 80 ml apă distilată și 5 ml NaOH N. Se încălzește la maximum 90°C, agitând continuu pînă la dizolvare completă, se răcește, se adaugă 20 mg mertiolat, se determină pH-ul soluției care trebuie să fie în jur de 7,6 (la nevoie se corectează cu NaOH N), apoi se completează cu apă distilată la 100 ml. Se păstrează în sticlă bine închisă, la frigider. Se conservă timp de aproximativ o lună. 4. Acid tricloracetic (ATA) 4,5%: 9 g ATA se completează cu apă la 200 ml. 5. Soluție HCl 0,001 N: se prepară din HCl 0,1 N, din care 1 ml se completează cu apă distilată la 100 ml. 6. Soluție de tripsină: 10 mg tripsină cristalizată, cîntărită la balanța analitică, se dizolvă în 10 ml HCl 0,001 N. Se păstrează la frigider, în eprubetă închisă cu dop de cauciuc, *maximum o săptămîină*. Înaintea întrebuintării, din această soluție stoc se prepară soluția de lucru: la 2 ml soluție stoc se adaugă 8 ml tampon fosfat și se amestecă bine. 1 ml din această soluție conține 200 micrograme tripsină.

Tehnica dozării. Înaintea dozării, serul se diluează de 25 ori: la 4,8 ml tampon fosfat se adaugă 0,2 ml ser. Cantitatea de cazeină necesară, așezată într-o eprubetă, se preîncălzește în baie de apă la 40° C.

	Proba	Martor
Ser diluat ml	0,5	—
Apă dist. ml	—	0,5
Tripsină diluată ml	0,5	0,5

Se ține 5 min. la temperatura camerei, apoi se adaugă:

Cazeină 4 ‰ ml	1,0	1,0
Se introduce <i>imediat</i> în baia de apă la 40° C, în care se ține <i>exact 10 minute</i> , după care se adaugă <i>imediat</i>		
ATA 4,5 ‰ ml	4,0	4,0

Se agită și se lasă la temperatura camerei 20 de minute, după care se filtrează prin hîrtie de filtru dens (de ex. Ederol 4) cu diametrul de 5,5 cm. Se prepară și o probă în alb, amestecînd, în ordinea indicată 0,5 ml apă distilată, 1,0 ml cazeină, 4,0 ml ATA și 0,5 ml tripsină diluată. Se agită și se păstrează 20 de minute la temperatura camerei, după care se filtrează. Filtratele trebuie să fie perfect clare.

Se determină extincția probelor și a martorului la spectrofotometru, *față de proba în alb*, la 280 nm, în cuvă de cuarț de 1 cm.

Proba martor se va executa în duplicat, folosind pentru calcul media celor două valori.

În caz de mai multe probe, adăugarea cazeinei și așezarea eprubetelor în baia de apă se va face la intervale de cîte un minut. În aceeași ordine și tot la intervale de un minut se va face și precipitarea cu ATA, după cele 10 minute de incubare.

Calcul. Cantitatea inhibitorilor se exprimă în unități (U), o unitate reprezentînd cantitatea inhibitorului cuprinsă în 1 ml ser, care este în stare să inhibe 1 mg tripsină cristalizată. Extincția martorului = EM; extincția probei = EP.

$$\text{Inhibitor U/ml ser} = \frac{\text{EM} - \text{EP}}{\text{EM}} \times 5$$

Factorul 5 provine din produsul 0,1×50, unde 0,1 reprezintă cantitatea de tripsină în mg conținută în amestecul de reacție, iar 50 rezultă din cantitatea serului utilizat: 0,5 ml ser diluat 1:25 = 0,02 ser (se transformă la 1 ml înmulțînd cu 50).

Observații. Diluția 1:25 reprezintă diluția standard pentru ser uman, care permite dozarea CIT în cantități cuprinse între 0—5 U/ml ser. În cazul unor valori mai mari (EP sub 0,1), se va repeta dozarea cu ser diluat 1:50, iar rezultatul calculat cu formula indicată se va înmulți cu 2.

Rezultate și discuții

Cu metoda descrisă, am dozat CIT la 84 donatori de sînge practic sănătoși, de vîrstă și sex diferit. Media cantității CIT obținută pe acest material a fost de 1,85±0,05 (deviația standard 0,44), valorile fiind cuprinse între 1,5—2,5 U, pe care în consecință le considerăm limitele normale. Aceste cifre sînt în bună concordanță cu datele din literatura de specia-

litate (1, 6, 7). Dealtfel, s-a constatat că CIT practic nu variază în funcție de sex și vîrstă (5).

În condiții patologice (stări infecțioase, procese maligne), cantitatea CIT de obicei crește (3, 8, 9, 10). Un deficit al CIT se observă în bronhopneumopatiile obstructive (11, 12, 13, 14).

Am dozat CIT a serului la 68 persoane suferind de diverse maladii, găsind în majoritatea cazurilor valori ușor crescute. Cele mai ridicate valori (peste 3) le-am întîlnit în pneumonii, pleurite exsudative și procese maligne. În continuare, ne propunem efectuarea dozării CIT la un mai mare număr de bolnavi, în vederea precizării mai concrete a eventualei aplicabilități diagnostice a testului.

Bibliografie

1. Vogel R., Trautschold J., Werle E.: Natural proteinase inhibitors, Academic Press, New York, 1968; 2. Metais, P., Bieth J., Warter J., in: Girard M. L. (ed.): Problèmes actuels de biochimie appliquée, 2. série, Masson, Paris 1968, 219; 3. Miesch F., Bieth J., Metais P.: Clin. Chim. Acta (1971), 31, 231; 4. Lellouch J., Claude J. R., Thevenin M.: Clin. Chim. Acta (1979), 95, 337; 5. Kitahara T., Takatsuka Y., Fujimoto K., Tanaka S., Ogawa M., Kosaki K.: Clin. Chim. Acta (1980), 103, 135; 6. Fritz H., Trautschold J., Werle E.: Z. physiol. Chem. (1965), 342, 253; 7. Schwick H. G., Heimbürger N., Haupt H.: Zschr. inn. Med. (1966), 11, 1; 8. Warter J., Metais P., Bieth J.: Rev. Franç. Etudes Clin. Biol. (1969), 14, 466; 9. Bukaresti L., Făgărășan M., Sikó G., Nagy I., Roșca S., Szövérfy A., Kovács A.: Sesiunea științifică anuală a Centrului de cercetări medicale Tîrgu Mureș 1978, Rezumatele comunicărilor. 84; 10. Bukaresti L., Sikó G., Făgărășan M., Nagy I., Roșca S., Szövérfy A., Kovács A.: Sesiunea științifică anuală a Centrului de cercetări medicale Tîrgu Mureș 1979, Rezumatele comunicărilor. 79; 11. Laurell C. B., Eriksson S.: Clin. Chim. Acta (1965), 11, 395; 12. Laurell C. B., Eriksson S.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. (1963), 15, 132; 13. Anastasatu C., Păunescu E., Morgenstern H., Burnea D., Mușăteanu R.: Medicina internă (1977), 29, 129; 14. Barbu Z., Szabó S., Barbu E., Szabó A., Lakatos L.: Sesiunea științifică anuală a Centrului de cercetări medicale Tîrgu Mureș 1977, Rezumatele comunicărilor. 14.

M. Kerekes, Susana Bordy, E. Módy

SIMPLE TECHNIQUE FOR THE ASSAY OF TRYPSIN-INHIBITORY CAPACITY OF SERUM

The technique described is based upon the assay of casein hydrolysis produced by trypsin, in the presence of serum. The degree of hydrolysis, in inverse ratio to the amount of alpha-1-antitrypsin present in the serum is determined spectrophotometrically, at 280 nm. Normal values were stated in 84 healthy blood donors. Increased values occurred mainly in pneumonias and malignant processes.