

Invenția se referă la medicină, mai concret la pediatrie și în special la gastroenterologia pediatrică.

În prezent este cunoscută metoda de diagnostic al funcției pancreatice pe baza determinării nivelului tripsinei și inhibitorilor ei: alfa1-antitripsinei și alfa2-macroglobulinei în serul sanguin.

Metoda se realizează în felul următor.

De la pacient se prelevă 5 ml de sânge, care apoi se centrifughează pentru a separa serul sanguin în care ulterior se determină nivelul tripsinei și inhibitorilor ei alfa1-antitripsinei și alfa2-macroglobulinei conform metodicii descrise mai jos.

Pentru determinarea activității tripsinei în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,025 ml din materialul cercetat (ser), se suplimentează cu 0,025 ml soluție de 0,9% NaCl și 0,4 ml soluție de 0,02% BAPNA. Microchiuvetele se agită și se incubează 60 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5 N și se agită. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm în raport cu matorul, care este pregătit în mod similar, acidularea mediului fiind însă produsă până la incubare. Calcularea activității enzimei se efectuează reieșind din curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol pe s la 1 g de țesut (nmol/s•g).

Pentru determinarea activității alfa1-antitripsinei în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,05 ml din materialul cercetat (ser diluat 1:32), se suplimentează cu 0,1 ml soluție-tampon medinal-HCl 0,05M cu pH 8,2, 0,1 ml soluție de 0,04% tripsină și 0,2 ml soluție de 0,06% BAPNA. Microchiuvetele se agită și după 10 min de preincubare la temperatura camerei se incubează 30 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5 N. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm în raport cu apa distilată. La fel se înregistrează densitatea optică a mediului de referință, care este pregătit în mod similar, însă nu conține materialul cercetat. Aprecierea proprietăților inhibitorilor de alfa1-antitripsină se realizează prin compararea gradului de hidroliza a substratului în prezența și în lipsa materialului cercetat. Pentru aceasta se calculează diferența între densitatea optică a probei de referință și celei experimentate. Calcularea activității enzimei se efectuează utilizând curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol/s la 1 g de țesut (nmol/s•g).

Pentru determinarea activității alfa2-macroglobulinei, în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,05 ml din materialul cercetat (ser diluat 1:32), se suplimentează cu 0,1 ml soluție-tampon medinal-HCl 0,05M cu pH 8,2, 0,1 ml soluție de 0,04% tripsină și 0,2 soluție de inhibitor al tripsinei. Microchiuvetele se agită și după 10 min de preincubare la temperatura camerei se incubează 30 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5 N. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm în raport cu apa distilată. La fel se înregistrează densitatea optică a mediului de referință, care este pregătit în mod similar, însă nu conține materialul cercetat. Cantitatea de alfa2-macroglobulină se exprimă în grame la litru de ser (g/L) [1, 2].

Dezavantajele acestei metode constau în aceea că ea este invazivă, traumatizantă și dificilă în realizare.

Problema pe care o rezolvă invenția dată constă în posibilitatea stabilizării funcției pancreatice la copiii cu afecțiuni gastroduodenale cronice pe baza unei metode mai puțin costisitoare, neinvazive, atraumatizante cât și simple în ce privește colectarea materialului de diagnostic de la pacienți.

Esența metodei constă în aceea că pentru diagnosticul funcției pancreasului se determină în lichidele biologice nivelul tripsinei și inhibitorilor ei: alfa 1-antitripsină, alfa 2-macroglobulină, și anume ele se determină în saliva prelevată de la pacienți.

Rezultatul obținut este diagnosticul funcției pancreatice rapid, simplu și necostisitor, atraumatic și neinvaziv.

Metoda se realizează în felul următor.

Dimineața după efectuarea igienei cavității bucale cu apă, timp de 10 min de la pacient se colectează saliva. Saliva se supune centrifugării cu rata de 4500 tur./min, timp de 5 min.

Pentru determinarea activității tripsinei în salivă, în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,025 ml din supernatant (salivă), se suplimentează cu 0,025 ml soluție de 0,9% NaCl și 0,4 ml soluție de 0,02% BAPNA. Microchiuvetele se agită și se incubează 60 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5 N și se agită. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm în raport cu matorul, care este pregătit în mod similar, acidularea mediului fiind însă produsă până la incubare. Calcularea activității enzimei se efectuează reieșind din curba de calibrare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol/s la 1 g de țesut.

Pentru determinarea activității alfa1-antitripsinei în salivă, în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,05 ml din supernatant (salivă), se suplimentează cu 0,1 ml soluție-tampon medinal-HCl 0,05M cu pH 8,2, 0,1 ml soluție de 0,04% tripsină și 0,2 ml soluție de 0,06% BAPNA. Microchiuvetele se agită și după 10 min de preincubare la temperatura camerei se incubează 30 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se

adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5N. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm în raport cu apa distilată. La fel se înregistrează densitatea optică a mediului de referință, care este pregătit în mod similar, însă nu conține materialul cercetat. Aprecierea proprietăților inhibitorilor de alfa1-antitripsină se realizează prin compararea gradului de hidroliză a substratului în prezența și în lipsa materialului cercetat. Pentru aceasta se calculează diferența între densitatea optică a probei de referință și celei experimentale. Calcularea activității enzimei se efectuează utilizând curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol/s la 1 g de țesut.

Pentru determinarea activității alfa2-macroglobulinei, în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,05 ml din supernatant (salivă), se suplimentează cu 0,1 ml soluție-tampon medinal-HCl 0,05M cu pH 8,2, 0,1 ml soluție de 0,04% tripsină și 0,2 soluție de inhibitor al tripsinei. Microchiuvetele se agită și după 10 min de preincubare la temperatura camerei se incubează 30 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5N. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm contra apei distilate. La fel se înregistrează densitatea optică a mediului de referință, care este pregătit în mod similar, însă nu conține materialul cercetat. Cantitatea de alfa2-macroglobulină se exprimă în g/L de ser [1].

Metoda propusă a fost aplicată pe un eșantion de 188 de bolnavi dintre care 98 cu gastroduodenita cronică, 25 cu gastrită cronică, 68 cu afecțiuni eroziv-ulceroase. Rezultatele obținute se interpretează în felul următor:

Nivelul tripsinei și inhibitorilor ei în perioada de acutizare

Indici	Sănătoși, N=25	Gastrită cronică, N=25	Gastroduode-nită cronică, N=98	Afecțiuni eroziv- ulceroase, N=65	p*
Tripsină (nmol/s•g)	24,60±0,78	128,00±5,13	144,40±4,80	150,80±2,61	P1-2<0,010 P1-3<0,001 P1-4<0,001 P2-3<0,050 P2-4<0,001
Alfa1- antitripsină (nmol/s•g)	4,63±0,20	6,70±0,12	5,97±0,26	7,71±0,18	P1-2<0,001 P1-3<0,001 P1-4<0,001 P2-3<0,010 P2-4<0,001 P3-4<0,001
Alfa2-macro- globulină (g/L)	0,96±0,03	1,40±0,11	1,48±0,03	1,67±0,13	P1-2<0,001 P1-3<0,001 P1-4<0,001

Notă: \*p – indicele veridicității.

*Exemplul 1.* Bolnavul M., a.n. 1987, a fost examinat la policlinica republicană pentru copii pe data de 09.XI-1998. Diagnosticul de bază: gastroduodenită cronică eritematoasă cu hipersecreție și hiperaciditate în perioada de acutizare. În saliva a fost determinat nivelul tripsinei (141,3 nmol/s•g), alfa1-antitripsinei (6,4 nmol/s•g), alfa2-macroglobulinei (7,51 g/L). Rezultatul a stabilit hipersecreția pancreatică și majorarea alfa1-antitripsinei și alfa2-macroglobulinei ca manifestare a pancreatitei reactive.

*Exemplul 2.* Bolnabul A., a.n. 1981 a fost examinat la policlinica republicană pentru copii pe data de 28.IX-2002. Diagnosticul de bază: gastroduodenită cronică eritematoasă cu hipersecreție în perioada de acutizare. S-a efectuat analiza salivei, rezultatele obținute fiind următoarele tripsină 145,4 nmol/s•g, alfa1-antitripsină 4,92 nmol/s•g, alfa2-macroglobulina 0,98 g/L.

Nivelul tripsinei și inhibitorilor ei confirmă majorarea secreției tripsinei și reducerea alfa1-antitripsinei și alfa2-macroglobulinei, ceea ce este caracteristic pentru pancreatita cronică.