

I.4. DOZAREA UNOR PRODUSI INTERMEDIARI ȘI FINALI AI METABOLISMULUI GLUCIDIC

I.4.1. DOZAREA ACIDULUI PIRUVIC

Acidul piruvic ocupă un loc central în multe procese metabolice, constituind veriga de legătură între metabolismul glucidic, lipidic și proteic. Formându-se în glicoliză, acidul piruvic se poate transforma prin transaminare în alanină și astfel se integrează în metabolismul proteinelor. Apoi, prin decarboxilare oxidativă acidul piruvic se transformă în acetyl-CoA, care poate intra în reacțiile legate de metabolismul lipidelor sau poate să se oxideze la dioxid de carbon și apă cu eliberare de energie.

Principiul metodei. Acidul piruvic reacționează cu aldehida salicilică în mediul puternic alcalin dând un produs colorat în portocaliu. Intensitatea culorii acestui produs, proporțională cu concentrația acidului piruvic se determină spectrofotometric.

Reactivi. 1) *Soluție de acid tricloraetic 6%.*

2) *Soluție de hidroxid de potasiu.* 100 g de hidroxid de potasiu (KOH) se dizolvă în 60 ml apă distilată. Dacă soluția depune precipitat se ia pentru reacție lichid supernatant limpede.

3) *Soluție de aldehydă salicilică 2% în alcool etilic 96%.* Soluția este stabilă câteva luni.

4) *Soluție stoc de piruvat de sodiu.* Se dizolvă 124,9 mg de piruvat de sodiu în 100 ml apă distilată la balon cotat. Se prepară extemporaneu (în momentul determinării).

5) *Soluție etalon de piruvat de sodiu.* Într-un balon cotat de 50 ml se măsoară 1 ml soluție stoc de piruvat de sodiu și se completează la semn cu apă distilată. Într-un ml soluție etalon se găsesc 0,02 mg acid piruvic.

Modul de lucru. A) *DEPROTEINIZAREA.* Într-o eprubetă de centrifugă se iau 1 ml sânge oxalatat recoltat proaspăt. Se adaugă 1 ml soluție de acid tricloraetic 6%, se agită și se lasă 5 minute în repaus. Apoi se centrifughează timp de 15 minute la 3000 rot/min.

B) *DEZVOLTAREA CULORII.* În două eprubete se măsoară reactivii indicați în tabelul următor.

Reactivi	Probă	Control
Supernatant incolor și transparent(ml)	1	-
Apă distilată (ml)	-	0,5

Reactivi	Probă	Control
Soluție de acid tricloracetic 6% (ml)	-	0,5
Soluție de hidroxid de potasiu (ml)	1	1
Soluție de aldehydă salicilică (ml)	0,5	0,5

Se agită bine și se introduc eprubetele în baia de apă la 37°C pentru 10 minute. Se răcesc repede și se citește extincția probei de cercetat la spectrofotometru, la 470 nm față de control.

Calculul rezultatelor. Pentru calcularea cantității de acid piruvic în volumul de filtrat luat pentru reacția de culoare se trasează o curbă etalon conform tabelului de mai jos.

Specificație	1	2	3	4	5	6	7
Concentrația acidului piruvic în probă (mg)	0,002	0,004	0,008	0,012	0,016	0,020	0
Soluție etalon de piruvat de sodiu (ml)	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	0
Apă distilată (ml)	0,9	0,8	0,6	0,4	0,2	0	1,0
Soluție de KOH (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Soluție de aldehydă salicilică (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Se agită bine, se termostatează timp de 10 minute la 37°C, se răcesc eprubetele și se citesc extincțiile probelor 1-6 la 470 nm, față de proba 7.

Se trasează curba etalon notând pe ordonată extincțiile iar pe abscisă concentrația acidului piruvic în probe.

Notând cu **a** mg de acid piruvic găsite pe curba etalon după extincția probei de cercetat, cantitatea de acid piruvic în 100 ml sânge se calculează cu ajutorul formulei:

$$\text{mg acid piruvic} / 100 \text{ ml sânge} = \mathbf{a} \times 2 \times 100 = \mathbf{a} \times 200$$

Variații fiziopatologice. În sângele omului sănătos conținutul acidului piruvic reprezintă 0,5-1,5 mg%. Creșterea concentrației de acid piruvic în sânge se constată după efort muscular, emoții puternice, regim alimentar bogat în glucide.

Cantitatea acidului piruvic în sânge poate să crească în avitaminoză B₁. Aceasta se explică prin aceea, că în lipsa vitaminei B₁ care sub formă de tiaminpirofosfat constituie una din coenzimele piruvatdehidrogenazei (piruvat:lipoat-oxidoreductaza, E.C. 1.2.4.1), este tulburat procesul de decarboxilare oxidativă a acidului piruvic și ca urmare se observă acumularea acestui acid în sânge.

În unele cazuri creșterea acidului piruvic în sânge poate să fie provocată de anoxie și leziuni ale ficatului.

OBSERVAȚII. Metoda descrisă poate fi folosită și pentru dozarea acidului piruvic în țesuturi (ficat, mușchi, creier etc.). În acest caz, o cantitate determinată de țesut (0,5-1 g) se omogenizează cu sticlă pisată într-un mojar răcit, de unde se preia cu 2,5 ml soluție de acid tricloracetic 6%. Se centrifughează timp de 15 minute la 4000 rot./min. În supernatantul separat se dozează acidul piruvic conform protocolului de mai sus.