

# TÈCNIQUES PER A EVITAR LA GLUCOLISIS «IN VITRO»

per

J. PUCHE

J. RAVENTÓS .

Amb el desig d'eliminar qualsevol causa d'error que pogués modificar les valors de les glucèmies en sèrie que realitzem amb diversos fins experimentals, ens hem vist portats a aquesta qüestió de la glucolisi, tan debatuda des que Chauveau, en 1856, i Claudi Bernard, algun temps després, establiren el fet de la desaparició de la glucosa de la sang «in vitro».

Aquest problema de la glucolisi «in vitro», a part la importància pràctica que pugui tenir per valorar justament determinades experiències, té un valor considerable des del punt de vista teòric, ja que la solució experimental de les incògnites que porta aparellades el problema, aclariria molt una de les qüestions més importants de la fisiologia del glúcids.

Claudi Bernard (1) veu produir-se la destrucció de la glucosa des dels 10 primers minuts després de l'extracció. A les 5 hores ha desaparegut un 60 per 100 de la glucosa, i a les 24, no queda cap vestigi de sucre reductor. Resultats anàlegs obté Edelman (2) en la sang normal. Pico, Fontana y Ameriso (17) donen valors que ascendeixen a un 25 per 100 de la glucosa inicial en les 5 primeres hores. Albertoni (8) obté xifres d'un 45

per 100 a les 5 hores. Pavy i Siau (3) donen valors quelcom diferents de les obtingudes pels autors abans esmentats i per Lepine (4), i no manquen autors, com Spencer, Melvin (5) que neguen l'existència del fenomen glucolític.

Les nostres primeres experiències foren encaminades a demostrar la intensitat de la glucolisi en les distintes condicions en què col·locàvem les nostres mostres de sang.

### SANG DESFIBRINADA

Treballant amb mostres de sang desfibrinada a la temperatura de 28°, s'obtenen les valors que indiquem a continuació:

#### Experiment 1

(11-I-1926)

	1. <sup>a</sup> presa.....	1
0.15 h.	2. <sup>a</sup> presa.....	1'07
1.15 h.	3. <sup>a</sup> presa.....	0'95
1.45 h.	4. <sup>a</sup> presa.....	0'76
2.15 h.	5. <sup>a</sup> presa.....	0'75
3.15 h.	6. <sup>a</sup> presa.....	0'75
4.15 h.	7. <sup>a</sup> presa.....	0'54
5.15 h.	8. <sup>a</sup> presa.....	0'40
6.15 h.	9. <sup>a</sup> presa.....	0'32
7.15 h.	10. <sup>a</sup> presa.....	0'35
20 h.	11. <sup>a</sup> presa.....	0'03

#### Experiment 2

(13-I-1926)

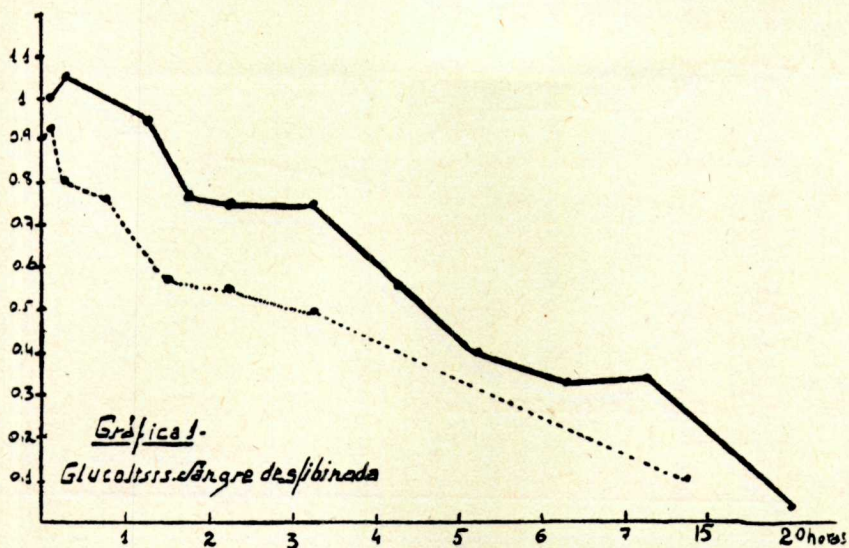
	1. <sup>a</sup> presa.....	0'78
0.15 h.	2. <sup>a</sup> presa.....	0'75
0.45 h.	3. <sup>a</sup> presa.....	0'75
1.0 h.	4. <sup>a</sup> presa.....	0'68
2.30 h.	5. <sup>a</sup> presa.....	0'67
3.30 h.	6. <sup>a</sup> presa.....	0'50
4.30 h.	7. <sup>a</sup> presa.....	0'45
24.30 h.	8. <sup>a</sup> presa.....	0'025
41 h.	9. <sup>a</sup> presa.....	0'02



Experiment 3

(15-I-1926)

	1. <sup>a</sup> presa.....	0'92
0.15 h.	2. <sup>a</sup> presa.....	0'80
0.45 h.	3. <sup>a</sup> presa.....	0'77
1.30 h.	4. <sup>a</sup> presa.....	0'58
2.15 h.	5. <sup>a</sup> presa.....	0'55
3.15 h.	6. <sup>a</sup> presa.....	0'50
14.15 h.	7. <sup>a</sup> presa.....	0'10



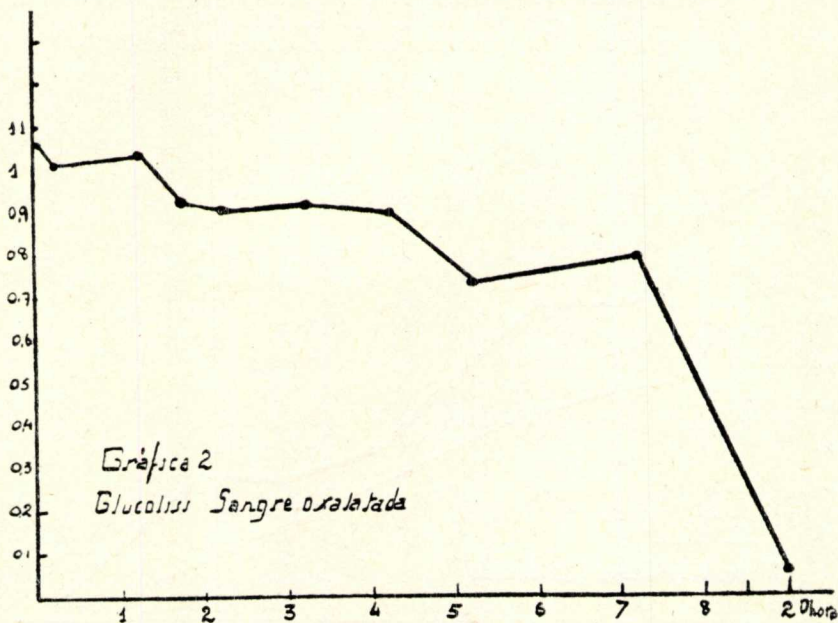
Gràfica I

Sang desafibrinada. Glucolisi «in vitro».

La glucolisi en les mostres de sang desfibrinada comença pocs minuts després d'iniciada l'observació i arriba al màxim (50 a 60 per 100), de 4 a 6 hores després; resultats que concorden amb els obtinguts per la majoria dels autors.

## GLUCOLISI EN SANG OXALATADA

Per a evitar la desfibrinació i la coagulació en les nostres mostres de sang, usem correntment l'oxalat potàssic a la proporció de 0'01 gr. per cada centímetre



Gràfica II

Sang oxalataada. Glucolisis «in vitro».

cúbic de sang. En aquestes condicions la glucolisi, a la temperatura de 28°, assoleix les valors que indiquem a continuació:

## Experiment 4

(11-I-1926)

0.15 h.	1. <sup>a</sup> presa.....	1'06
	2. <sup>a</sup> presa.....	1



1.15 h.	3. <sup>a</sup> presa.....	1'05
1.45 h.	4. <sup>a</sup> presa.....	0'92
2.15 h.	5. <sup>a</sup> presa.....	0'90
3.15 h.	6. <sup>a</sup> presa.....	0'92
4.15 h.	7. <sup>a</sup> presa.....	0'90
5.15 h.	8. <sup>a</sup> presa.....	0'78
6.15 h.	9. <sup>a</sup> presa.....	0'78
7.15 h.	10. <sup>a</sup> presa.....	0'80
20 h.	11. <sup>a</sup> presa.....	0'07

Ljungdahl (6) sosté que les sals de l'àcid oxàlic posseeixen una acció inhibidora sobre la glucolisi. Troba aquest autor, que així com en les mostres de sang tractades per altres sals, a les 4 hores ha desaparegut una gran part del sucre, en les mostres oxalates la glucolisi sofreix un gran retard. Nosaltres hem observat que en les mostres recollides asèpticament i amb oxalat potàssic a la proporció indicada, la glucolisi podia no ésser completa 20 hores després.

#### GLUCOLISI EN SANG AMB OXALAT I FORMOL

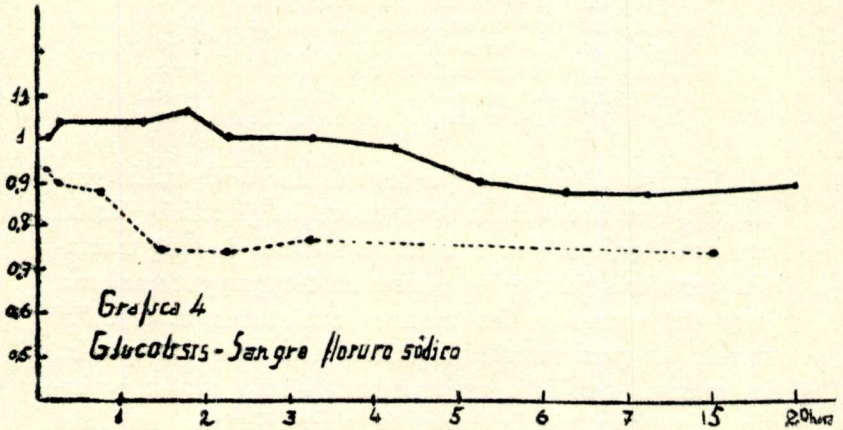
Denis i Aldrich (7) eviten l'alteració química de la sang afegint-li una gota de formaldehid per cada 10 cc. de sang. Utilitzant aquesta tècnica conservadora, hem obtingut els següents resultats:

#### Experiment 5

(11-I-1926)

0.15 h.	1. <sup>a</sup> presa.....	1'05
1.15 h.	2. <sup>a</sup> presa.....	1'07
1.15 h.	3. <sup>a</sup> presa.....	1'05
1.45 h.	4. <sup>a</sup> presa.....	1'06
2.15 h.	5. <sup>a</sup> presa.....	1'05
3.15 h.	6. <sup>a</sup> presa.....	1'07
4.15 h.	7. <sup>a</sup> presa.....	1'04
5.15 h.	8. <sup>a</sup> presa.....	0'94

6.15 h.	9. <sup>a</sup> presa.....	0'63
7.15 h.	10. <sup>a</sup> presa.....	0'92
20 h.	11. <sup>a</sup> presa.....	0'93



Gràfica IV

Sang fluorur sòdico. Glucòlisi «in vitro».

## Experiment 6

(15-I-1926)

	1. <sup>a</sup> presa.....	0'95
0.15 h.	2. <sup>a</sup> presa.....	0'93
0.45 h.	3. <sup>a</sup> presa.....	0'90
1.15 h.	4. <sup>a</sup> presa.....	0'86
2.15 h.	5. <sup>a</sup> presa.....	0'83
3.15 h.	6. <sup>a</sup> presa.....	0'84
14.15 h.	7. <sup>a</sup> presa.....	0'85

Aquesta tècnica té per a nosaltres l'inconvenient que fent preses de sang d'uns 3 cc., resulta difícil l'addició d'una quantitat adequada de formol a cada una de les mostres. A més, a la temperatura que hem treballat, aquest mètode conservador no evita, d'una manera absoluta, la glucòlisi de les primeres hores.



## GLUCOLISI EN SANG AMB FLUORUR SÒDIC

Aquest mètode, emprat per Albertoni (8), Arthus, Lepine i Boulud i per Mayor (10), l'hem usat en algunes experiències amb els següents resultats:

## Experiment 7

(11-I-1926)

	1. <sup>a</sup> presa.....	1
0.15 h.	2. <sup>a</sup> presa.....	1'03
1.15 h.	3. <sup>a</sup> presa.....	1'03
1.45 h.	4. <sup>a</sup> presa.....	1'06
2.15 h.	5. <sup>a</sup> presa.....	1
3.15 h.	6. <sup>a</sup> presa.....	1
4.15 h.	7. <sup>a</sup> presa.....	0'98
5.15 h.	8. <sup>a</sup> presa.....	0'90
6.15 h.	9. <sup>a</sup> presa.....	0'87
7.15 h.	10. <sup>a</sup> presa.....	0'88
20 h.	11. <sup>a</sup> presa.....	0'90

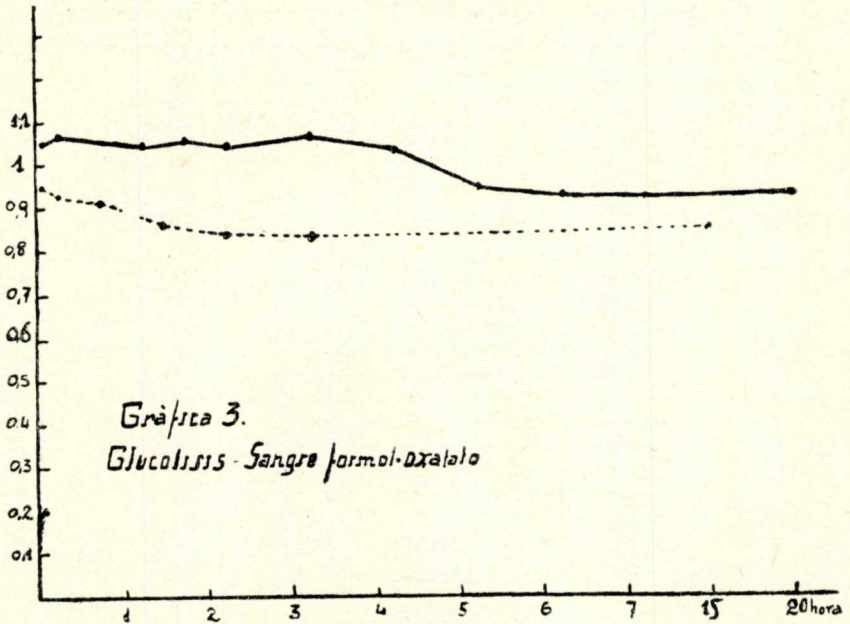
## Experiment 8

(15-I-1926)

	1. <sup>a</sup> presa.....	0'94
0.15 h.	2. <sup>a</sup> presa.....	0'90
0.45 h.	3. <sup>a</sup> presa.....	0'88
1.30 h.	4. <sup>a</sup> presa.....	0'75
2.15 h.	5. <sup>a</sup> presa.....	0'75
3.15 h.	6. <sup>a</sup> presa.....	0'77
14.15 h.	7. <sup>a</sup> presa.....	0'75

En alguns dels nostres assaigs, el fluorur sòdic, a la proporció de 1 a 2 per 100, no ha estat d'una eficàcia absoluta per a prevenir la glucolisi 20 hores després de l'extracció de sang.

Altres mitjans han estat preconitzats per a evitar la glucolisi; així Rona i Arnheim (11) sostenen que l'hemolisi, per mitjà de l'aigua destil·lada, evita la glucolisi, negant valor al factor leucocitari, sostingut per Lepine



Gràfica III

Sang formol-oxalat. Glucolisis «in vitro».

i Boulud (12), De Meyer (14), Braunstein (15) i Arthus (16), en la producció del fenomen, i donant una valor extraordinària al contingut en fosfats.

L'augment de l'acidesa, com a mitjà d'evitar la glucolisi, havia estat observat per Claudi Bernard i comprovat per Rona i Wilenko (18), els quals han vist que un augment de l'acidesa de la sang és desfavorable a la glucolisi. Quan  $[H^+]$  és igual a  $2 - 3 \times 10^{-7}$ , la



glucolisi és debilitada i en arribar a  $[H^+] = 4 \text{ a } 6 \times 10^{-7}$ , s'inhibeix en absolut. Mauriac i Servantie donen com a reacció actual òptima, per a produir-se la glucolisi, una valor de  $pH = 8$ .

L'eficàcia del mitjà àcid per a evitar la glucolisi es manifesta en els filtrats del mètode de Folin i Wu per a la dosificació de la glucosa, com pot veure's en les dades que donem a continuació:

Experiment 9

(31-XII-1926)

Determinacions inicials	Als 4 dies a 28°
0'97.....	0'95
0'90.....	0'87
0'70.....	0'70
0'47.....	0'50
0'45.....	0'45
0'53.....	0'56
0'45.....	0'47
0'41.....	0'40

Dels altres mitjans utilitzats per a evitar la glucolisi, com la cocaïna al 1 per 100 i la urotropina al 1 per 100 (Albertoni), no en tenim cap experiència. Doyon i Savornat (20) empren el nucleïnat sòdic que, segons aquests autors, evitaria quasi completament la glucolisi.

No entrarem, en aquesta breu nota, en l'estudi dels factors biològics que expliquen i condicionen la glucolisi. Tan sols hem volgut fer un resum de les tècniques correntment utilitzades per a evitar aquest fenomen pertorbador de les experiències dirigides a la investigació de la glucèmia.

El nostre «modus operandi» per a salvar-nos dels perills de la glucolisi, és el següent : Fem les preses de sang amb oxalat potàssic a l'1 per 100, mantenint-les a

la nevera a 6° - 8° fins acabar l'experiència. Si utilitzem el mètode de Folin i Wu, efectuem la coagulació poc després de la presa de sang, i en el cas de treballar amb el mètode de Hagedorn, no estem satisfets fins després d'haver verificat la coagulació, que efectuem en sèrie.

#### CONCLUSIONS

a) En la sang desfibrinada a 28° la glucolisi es produeix ràpidament, assolint un 35 per 100 a les 3 hores i un 60 per 100 a les 6 hores.

b) La glucolisi, almenys la inicial, no s'evita d'una manera absoluta per cap dels mètodes emprats; la tardana sembla ésser detinguda a 28° fins més enllà de 24 hores.

c) L'ús de fluorur sòdic sembla ésser bastant eficaç, així com el de l'oxalat potàssic a la mateixa proporció, no essent adequat, pel nostre objecte, l'ús del formol.

d) Les variacions del pH i del contingut salí de la sang poden explicar algunes variacions en la intensitat de la glucolisi.

e) Els filtrats àcids del mètode de Folin poden resistir la glucolisi, sempre que es mantinguin estèrils durant alguns dies.

*Institut de Fisiologia  
Facultat de Medicina de Barcelona*



## BIBLIOGRAFIA

1. *Claudi Bernard*, Leçons sur la diabète et la glycogénèse animale, 207. Paris, 1877.
2. *J. Edelmann*, Bioch. Zeits., XI, 314; 1912.
3. *F. Pavy et Siau*, Journal of Physiology, XXVII, 451; 1902.
4. *Lepine*, Le sucre du sang. Paris, 1921.
5. *G. Spencer Melvin*, Bioch. Journ., VI, 422; 1912.
6. *M. Ljungdahl*, C. R. Soc. Biol., LXXXVI, 498; 1922.
7. *Denis y Aldrich*, Journ. of Biol. Chem., XLIV, 203; 1920.
8. *Albertoni, P.*, Archivio di Fisiologia, 20, gener-març 1925.
9. *R. Lepine y Boulud*, Sur le sucre virtuel du sang. Comunicació al sisè Congrés Internacional de Fisiologia; 1904.
10. *Mayor, R. M.*, Journ. of Amer. Med. Assoc., LXXXI, 1952; 1923.
11. *P. Rona-F. Arnheim*, Bioch. Zeits., XLVIII, 35; 1913.
12. *Lepine y Boulud*, C. R. Soc. Biol., LXXII, 1064; 1912.
13. *R. Lepine et Boulud*, C. R. Soc. Biol., LX, 805; 1906.
14. *J. de Meyer*, Arch. Inter. de Phys., II, 131; 1905.
15. *A. Braunstein*, Zeitschrift. für allg. Phys. 1908.
16. *Arthus*. Citat per Albertoni i per Lepine.
17. *O. Pico-H. Fontana y J. Ameriso*, Rev. de la Soc. Argentina de Biologia, I, 199; 1924.
18. *P. Rona-G. Wilenko*, Bioch. Zeits., LXII, 1; 1914.
19. *P. Mauriac, L. Servantie*, C. R. Soc. Biol., LXXXVII, 200; 1922.
20. *M. Doyon, F. Sarvonat*, C. R. Soc. Biol., LXXIV, 569; 1913.