

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DU SANG DE CERTAINS SÉLACIENS DU BRÉSIL

Préparation de solutions de perfusion

Rubens Salomé Pereira et Paulo Sawaya

Au cours d'études sur l'action de l'adrénaline et de la noradrénaline sur la fréquence et sur l'amplitude des battements du cœur de certains sélaciens vivant dans les eaux qui baignent le littoral de l'État de São Paulo — Brésil — (1), nous avons été amenés à étudier la composition chimique du sang des poissons employés dans les expériences, dans le but de préparer de liquides de perfusion parfaitement adaptés aux animaux étudiés et comme contribution à l'étude biochimique des poissons qui se trouvent dans les eaux brésiliennes.

Les constituants, pour le moment, comportent pour le sang: le fer et les sucres réducteurs; et pour le sérum: les protéines, l'azote non protéique, l'urée, l'azote des amino-acides, le phosphore acido-soluble, le phosphore inorganique, le chlore, le sodium, le potassium, le calcium et le magnésium.

Les animaux étaient recoltés dans la baie de Santos, transportés à l'aquarium, saignés par ponction au cœur. Une partie du sang était mise dans un tube contenant un anticoagulant, l'autre était laissée à la glacière jusqu'à la coagulation. Pour le sucre, le sang était immédiatement traité par le sulfate de cuivre et par le tungstate de sodium.

Techniques chimiques

1.^o — Dosage du fer par la méthode à l'acide protocatéanique (Salomé Pereira — 1941a).

1) U. von Euler et P. Sawaya — Travaux non publiés.

2.^o — Dosage du sucre réducteur par désalbumination du sang par le sulfate de cuivre et par le tungstate de sodium, réduction du réactif cuivrique de Harding et Downs (1933) modifié par King et Garner (1947) et détermination photométrique de l'oxyde cuivreux par le réactif arseno-molybdique de Nelson (1944).

3.^o — Dosage des protéines par la réaction dite du biuret, après précipitation, dissolution et reprécipitation par l'acide trichloracétique (Fine — 1935; Liëben et Jesserer — 1936; Robinson et Hodgen — 1940, Salomé Pereira — 1944b).

4.^o — Dosage de l'azote non protéique par précipitation des protéines par l'acide tungstique, digestion sulfurique, en présence du sélénium, du liquide surnageant après centrifugation énergique et détermination photométrique du sel d'ammonium au moyen du réactif de Nessler (Folin et Wu — 1919; Levy — 1936; Campbell et Hanna — 1937).

5.^o — Dosage de l'urée suivant Gentzkow (1942).

6.^o — Dosage de l'azote des amino-acides par la méthode de Folin (1922) avec les modifications proposées par Danielson (1935), par Sahyun (1939), par Frame et collaborateurs (1943), par Russel (1944).

7.^o — Dosage du sodium par photométrie après séparation à l'état d'acétate triple d'uranyle, de magnésium et de sodium (Kahane — 1930; Kahane et Dumont — 1932; Piper — 1932; Hoffman et Osgood — 1938; Herbain — 1949).

8.^o — Dosage du potassium par la méthode au cobaltinitrite double d'argent et de potassium (Salomé Pereira — 1945c).

9.^o — Dosage du calcium isolé à l'état d'oxalate par la méthode au 2,7-dihydroxynaphtalène (Salomé Pereira — 1951d).

10.^o — Dosage du magnésium par la méthode au jaune thiazole (Gillam — 1941; Garner — 1947; Salomé Pereira — 1950e).

11.^o — Dosage des chlorures par la méthode à l'iodate d'argent (Sendroy — 1937; Van Slyke et Hiller — 1947).

12.^o — Dosage du phosphore inorganique après séparation à l'état de phosphate de calcium, par la méthode céruléo-molybdique de Denigès (Deniès, Chelle et Labat — 1930; Salomé Pereira — 1939f).

La même méthode a été appliquée à la détermination du phosphore acido-soluble après incinération nitroperchlorique.

Les résultats obtenus sont groupés dans le Tableau I et on y trouve aussi la composition de l'eau prise au même endroit où vivaient les poissons examinés.

*

On sait que le milieu intérieur des animaux présente une certaine pression osmotique qui dépend des protéines du fluid circulant — pression osmotique colloïdale — et des constituants inorganiques qu'on y trouve — pression osmotique cristalloïde. Il y a de cas, cependant, où la pression osmotique cristalloïde est maintenue, dans une très large mesure, par des composés organiques. Un tel phénomène, bien connu, d'ailleurs, se vérifie chez les sélaciens, et le taux d'urée chez le *Rhinobatus percellens* (Walbaum) élasmobranche qu'on trouve au Brésil, est 340 m M/1 environ. En regardant le Tableau I, on voit tout de suite que la teneur en sels minéraux de l'eau de la baie de Santos est beaucoup plus élevée que chez les poissons en étude. Cette hypotonicité est compensée par la rétention d'une grande quantité d'urée, de telle sorte que l'animal est capable de maintenir le gradient osmotique nécessaire. Puisque l'urée est responsable par 44 pour cent environ de la pression osmotique du sang des élasmobranches (Duval — 1925) et comme le cœur des élasmobranches de l'eau douce est incapable de battre en l'absence de cette diamide (Baldwin — 1940), nous l'avons incorporée dans les constituants de la solution de perfusion.

Les actions spécifiques des éléments, les relations entre eux, les antagonismes — ce qui constitue un chapitre très large de la physiologie cellulaire — révèlent qu'il faut établir un rapport convenable entre eux dans les liquides de perfusion, puisque l'irritabilité, la perméabilité, la contractilité et d'autres caractères fonctionnels des tissus requièrent un certain équilibre entre les ions, et comme les effets d'un élément varient à mesure de la concentration des autres qui se trouvent dans la solution, les rapports ioniques peuvent présenter une signification plus grande que la concentration même des éléments. Il y a de fonctions cellulaires qui varient suivant le rapport *métaux alcalins*: *métaux alcalino-terreux*, ce qui lève

la possibilité d'une correspondance entre le type de fonction d'un organe animal et la composition inorganique de son milieu intérieur (Florkin — 1949).

On sait depuis Bayliss que le liquide Ringer-Lock n'a pas toute son efficacité que si on ajoute une solution capable de lui donner une viscosité égale à celle du sang, et on a employé la gomme arabique à 6 pour cent. Nous avons pensé à substituer à la gomme arabique la polyvinylpyrrolidone, un colloïde synthétique utilisé comme succédané du plasma sanguin (2), dont l'emploi est devenu courant dans la pratique médicale, dissoute dans la solution saline préparée suivant les chiffres du Tableau I.

Comme les animaux maintiennent une concentration relativement constante des ions hydrogène dans le sang, comprise la plupart du temps entre pH 7.2 et 7.8, nous avons employé le bicarbonate de sodium pour ajuster le pH de la solution de perfusion.

Dans ce travail préliminaire nous n'avons pas eu l'occasion de suivre les variations saisonnières du taux des constituants chimiques du sang des poissons étudiés.

Les solutions de perfusion proposées sont celles qui se trouvent dans les Tableaux II et III.

SUMMARY

In the course of studies on the effect of adrenaline and norepinephrine on the rate and amplitude of the heart beats of certain Brazilian selachians (U. von Euler and P. Sawaya — unpublished results) it became necessary to study the composition of the blood of these fishes, both as a contribution to the knowledge of their biochemistry, and as a preliminary step for preparing convenient perfusing solutions for their hearts.

In the present introductory studies, we have performed the following determinations: iron and reducing sugars in the whole blood; and proteins, non protein nitrogen, urea, amino acids nitrogen, acid soluble phosphorus, inorganic phosphates, chlorides, sodium, potassium, calcium and magnesium.

Urea concentration in the blood of selachians is high, this diamide having a considerable influence upon the maintenance of their blood osmotic pressure, and because the heart of fresh water elas-

TABLEAU I

Sang et sérum sanguin de *Rhinobatus percellens* et de *Narcine brasiliensis*

Sujet	sérum <i>Rhinobatus percellens</i> (Walbaum)													
	Fe	Sucre	N-non protéique	N-urée	N-des amino-acides	Protéines	Na	K	Ca	Mg	Cl	P acido soluble	Inorga-nique	Na + K
	mg%	mg%	g%	g%	g%	gr	milliéq.	milliéq.	milliéq.	milliéq.	milliéq.	mg%	mg%	Ca + Mg
pleine	15,5	30,0	1,120	1,060	20,0	3,25	139,1	7,2	7,7	1,6	150,0	8,4	4,5	15,7
adulte	16,3	26,0	1,050	0,990	22,0	3,91	212,2	8,9	9,0	1,2	214,9	6,5	6,4	21,7
adulte	15,8	24,0	1,150	1,080	21,0	2,92	133,1	13,5	6,4	3,0	115,4	9,5	9,0	15,6
jeune	15,6	25,0	0,942	0,892	21,0	3,34	143,1	11,8	7,6	1,9	137,3	6,5	6,4	13,1
jeune	16,1	40,0	0,990	0,930	21,0	3,42	96,1	16,8	7,0	2,1	94,8	7,2	7,0	12,4
adulte	16,5	24,0	1,060	1,000	18,0	3,20	138,7	10,1	6,0	3,1	135,7	5,8	5,6	16,4
jeune	16,3	127,0	0,990	0,920	23,0	4,00	138,7	14,2	7,1	2,4	134,2	10,2	10,1	16,1
jeune	15,2	25,0	1,000	0,940	30,0	3,64	174,8	20,2	7,5	1,0	166,4	10,9	9,6	22,9
Moyenne	15,9	27,6	1,038	0,977	22,0	3,46	143,2	12,8	7,3	2,0	143,6	8,1	7,3	16,8

Narcine *brasiliensis* (Ölfers)

pleine	—	18,0	0,615	0,585	6,0	2,04	124,8	7,9	9,7	2,0	170,1	9,1	5,0	11,3
adulte	—	16,0	0,630	0,590	10,0	1,95	127,4	6,4	12,6	3,3	159,7	6,9	6,0	8,4
adulte	—	16,0	0,620	0,580	12,0	1,97	149,6	6,8	13,7	3,8	147,5	6,7	5,8	8,9
Moyenne		16,7	0,622	0,585	9,3	1,99	133,9	7,0	12,0	3,0	159,1	7,6	5,6	9,4

Eau de la baie de Santos

(R. S. Pereira — Bol. Fac. Fil., Ciênc. Letr. Univ. S. Paulo — Zool. 9, 69, 1945)

354,2

9,8

16,0

75,7

P total - mg

0,04

TABLEAU II

Solutions de perfusion pour *Rhinobatus percellens* (Walbaum)

Solution	Cl Na	Cl K	Cl ₂ Ca	Cl ₂ Mg	Glucose	Urée	Polyvyl- pyrrolidol
n.º	g.p. 1000 ml	g.p. 1000 ml	g.p. 1000 ml	g.p. 1000 ml	g.p. 1000 ml	g.p. 1000 ml	g.p. 1000
1	8.37	0.95	0.40	0.094	0.276	—	—
2	8.37	0.95	0.40	0.094	0.276	20.94	—
3	8.37	0.95	0.40	0.094	0.276	20.94	17.30
4	8.37	0.95	0.40	0.094	0.276	20.94	34.60

TABLEAU III

Solutions de perfusion pour *Narcine brasiliensis* (Olfers)

Solution	Cl Na	Cl K	Cl ₂ Ca	Cl ₂ Mg	Glucose	Urée	Polyvyl- pyrrolidone
n.º	g.p. 1000 ml	g.p. 1000 ml	g.p. 1000 ml	g.p. 1000 ml	g.p. 1000 ml	g.p. 1000 ml	g.p. 1000 ml
1	7.83	0.52	0.67	0.105	0.167	—	—
2	7.83	0.52	0.67	0.105	0.167	12.54	—
3	7.83	0.52	0.67	0.105	0.167	12.54	10.00
4	7.83	0.52	0.67	0.105	0.167	12.54	20.00

mobranchii is incapable of beating in the absence of urea we have added it to the materials composing the proposed perfusing solution.

In order to give to the perfusing solution the required viscosity, we propose to this effect the use of polyvinylpyrrolidone, a synthetic colloidal substance currently employed in medical practice as a substitute for blood plasma.

Sodium bicarbonate was used for buffering the perfusing solutions.

Tables are given.

RESUMO

No decorrer de pesquisas feitas sobre a ação da adrenalina e da noradrenalina sobre a frequência e sobre a amplitude dos batimentos cardíacos de certos selaceos brasileiros (U. von Euler e P. Sawaya — trabalhos inéditos) fomos levados a estudar a composição química do sangue desses animais com o fito de preparar soluções perfusoras convenientes e como contribuição ao estudo da bioquímica dos peixes que vivem no litoral brasileiro.

Determinaram-se, no sangue, o ferro e os açúcares; e no sôro, as proteínas, o azoto não proteico, a uréia, o azoto dos amino-ácidos, o fósforo ácido solúvel, os fosfatos minerais, os cloretos, o sódio, o potássio, o cálcio e o magnésio.

À vista da elevada concentração da uréia encontrada, e do papel que desempenha na manutenção da pressão osmótica do sangue de tais animais, e, ainda, do fato de o coração dos elasmobrânquios da água doce ser incapaz de bater na ausência de tal composto, incorporamo-la à solução perfusora.

A fim de dar ao líquido perfusor a viscosidade necessária, propomos a inclusão nele da polivinilpirrolidona, colóide sintético utilizado como sucedâneo do plasma sanguíneo, de emprêgo corrente na prática médica.

Como os animais mantêm de modo relativamente constante, a concentração dos iônios hidrogênio no sangue — entre pH 7.2 e 7.8 em geral — utilizamos o bicarbonato de sódio para ajustar o pH da solução perfusora.

A composição do material analisado e a das soluções de perfusão propostas, encontram-se nos quadros anexos.

BIBLIOGRAPHIE

- BALDWIN, E. — An Introduction to Comparative Biochemistry — Cambridge, 1940.
- CAMPBELL, W. R. et HANNA, M. J. — 1937 — The determination of nitrogen by modified Kjeldahl methods — *J. Biol. Chem.*, 119: 1,7.
- DANIELSON, J. S. — 1933 — Amino acid nitrogen in blood and its determination. *J. Biol. Chem.*, 101: 505, 525.
- DENIGES, G., CHELLE, L. & LABAT, A. — Précis de Chimie Analytique — Édit. Méd. Norbert Maloine — Paris — 1930.
- FINE, J. — 1935 — The biuret method of estimating albumin and globulin in serum and urine — *Bioch. J.* 29: 799, 803.
- FŁORKIN, M. — Biochemical Evolution — Academic Press — New York, 1949.
- FOLIN, O. & WU, H. — 1919 — A system of blood analysis. *J. Biol. Chem.*, 38: 81, 110.
- FRAME, E. G., RUSSELL, J. A. & WILHEMI, A. E. — 1943 — The colorimetric estimation of amino nitrogen in blood — *J. Biol. Chem.*, 149: 255, 270.
- GARNER, R. J. — 1946 — Colorimetric determination of magnesium in plasma or serum by means of titan yellow — *Bioch. J.* 40: 828, 831.
- GENTZKOW, C. J. — 1942 — An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization — *J. Biol. Chem.* 143, 531, 544.
- GILLAN, W. S. — 1941 — A photometric method for the determination of magnesium — *Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.)* 13: 499, 501.
- HARDING, V. J. & DOWNS, C. E. — 1933 — Notes on a Schaffer — Somogyi copper reagent. — *J. Biol. Chem.* 101: 487, 492.
- HERBAIN, M. — 1948 — Dosage photométrique du sodium par évaluation différentielle de l'uranium précipité à l'état de sel de Streng — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 30: 231, 234.
- HOFFMAN, W. S. & OSGOOD, B. — 1938 — A photoelectric method for the microdetermination of sodium in serum and urine by the uranyl zinc acetate method. — *J. Biol. Chem.* 124: 347, 357.
- KAHANE, E. — 1930 — Le dosage du sodium par la méthode à l'uranyle. *Bul. Soc. Chim. France* 47-48 (4): 382, 404.
- KAHANE, E. & DUMONT, M. R. — 1932 — Dosage du sodium dans les substances biologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 14: 1257, 1271.
- KING, E. J. — Micro-Analysis in Medical Biochemistry, J. & A. Churchill Ltd. — London — 1947.

- LEVY, M. 1936 — Beiträge zur enzymatischen Histochemie. XVII: Mikro-methode zur Bestimmung von Stickstoff. — Zeitschr. physiolog. Chem. 240: 33, 42.
- LIEBEN, F. & JESSERER, H. — 1936 — Studien zur Biuretreaktion der Proteine — Bioch. Zeitschr. 285: 36, 44.
- NELSON, N. 1944 — A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. — J. Biol. Chem. 153: 375, 380.
- PIPER, C. S. 1932 — The determination of sodium by precipitation as the triple salt of sodium — uranyl — magnesium acetate — J. Agric. Sc., 22: 675, 687.
- ROBINSON, H. & HOGDEN, C. G. — (a) — 1940 — The biuret reaction in the determination of serum proteins. J. Biol. Chem., 135: 707, 725.
(b) — 1940 — The biuret reaction in the determination of proteins — J. Biol. Chem., 135: 727, 731.
- RUSSELL, J. 1944 — Note on the colorimetric determination of amino-nitrogen. — J. Biol. Chem., 156: 467, 468.
- SAHYUN, M. 1939 — The determination of amino-acid nitrogen in blood and urine. — J. Lab. and Clin. Med., 24: 548, 553.
- SALOME' PEREIRA, R. — (a) — 1941 — A new photometric method for the determination of iron — J. Biol. Chem. 137: 417, 428.
(b) — 1944 — Sôbre a determinação fotométrica das proteínas do sêro, ou do plasma, por meio da reação do biureto. Rev. Fac. Med. Vet. (Univ. S. Paulo) — 2: 257, 629.
(c) — 1945 — Photometric determination of potassium in biological materials — J. Biol. Chem., 160: 617, 629.
(d) — 1951 — A photometric method for the determination of oxalic acid. Mikrochemie ver. Mikrochim. Acta. 36-37: 398, 406.
(e) — 1950 — Sôbre a determinação fotométrica da microquantidades de magnésio. Adaptação do método do amarelo de tiazol. — Rev. ac. Med. Vet. (Univ. S. Paulo) 4: 295, 302.
(f) — 1939 — Sur la détermination spectrophotométrique de l'acide phosphorique au moyen de la réaction céruléo-molybdique de Denigès. Bull. Soc. Chim. Biol. 21: 827, 835.
- SENDROY, J. 1937 — Microdetermination of chloride in biological fluids with solid silver iodate.
I — Gazometric analysis — J. Biol. Chem. 120: 335, 403.
II — Titrimetric analysis — J. Biol. Chem. 120: 405, 417.
III — Colorimetric analysis — J. Biol. Chem. 120: 419, 439.

- SOMOGYI, M. — (a) — 1931 — The use of copper and iron salts for the deproteinization of blood. *J. Biol. Chem.*, 90 — 725, 729.
(b) — 1945 — A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, 160: 61, 68.
(c) — 1945 — Determination of blood sugar. *J. Biol. Chem.*, 160: 69, 73.
- VAN SLYKE, D. & HILLER, A. — 1947 — Application of Sendroy's iodometric chloride titration to protein containing fluids. *J. Biol. Chem.* 167: 107, 124.