Waarom gaan vissen dood na extreme arbeid? Een ^{31}P-NMR studie

dr.ir.Vincent van Ginneken, dr. Guido van den Thillart, Biologie, Universiteit Leiden

Het visselijf bestaat afhankelijk van de soort voor 40-65% uit witte spier. Stofwisselingsveranderingen die hier plaats vinden na bijvoorbeeld uitputting, extreme arbeid of hanteren kunnen bepalend zijn of een vis de stressvolle situatie overleeft. Zo is het bekend uit de hengelsport dat bijvoorbeeld bij salmoniden maar 40-50% van de dieren het tientallen minuten durend gevecht overleeft. Ook is bekend uit de zeevisserij dat een groot percentage van de dieren van de bijvangst na terugzetting dit niet overleeft (figuur 1). Ook in de aquacultuur zal hanteer- en uitputtingsstress van vissen ongetwijfeld tot mortaliteit leiden. Om inzicht te krijgen in het achterliggend mechanisme is met moderne kernspinresonantie-technieken (zie bijlage) een studie met karper en forel uitgevoerd.



Telegraaf 08/02/2000

Vele tonnen wijting voor niets dood

Vissers gooien hun 'bijvangst' overboord

door Huib Boogert

VLISSINGEN/IJMUIDEN, dinsdag

De Nederlandse Noordzee-kottervissers gooien tienduizenden kilo's gevangen wijting terug in zee. De vis overleeft dat niet.

Oorzaak van die massaverspilling is het quotum van de Europese Unie voor de wijtingvangst. Als de vissers alles aan wal zouden brengen, zou het Nederlandse quotum al binnen een maand 'op' zijn. Daarom gaat de vis overboord.

WIJTING: Merlangius merlangus. Komt voor in Europese kustwateren tot 100 m diepte. Lengte 30-40 cm

De vissers hebben het sterke vermoeden dat de Europese visserijbiologen er naast zitten met hun voorspellingen voor het jaar 2000. De quota werden zeer laag gesteld omdat zij voor overbevissing waarschuwden.

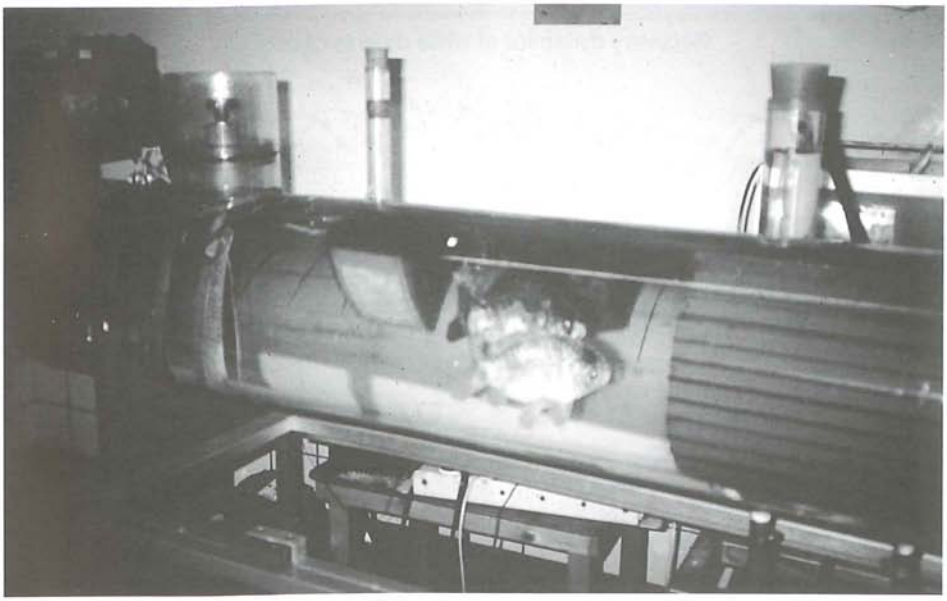
In totaal mogen de Nederlandse Noordzee-kotters dit jaar slechts 975 ton wijting vangen, tegen 2185 ton vorig jaar.

De wijting wordt vaak bovengehaald als bijvangst bij schol, tong of kabeljauw. Als wijting eenmaal uit het water is geweest, sterft hij onherroe-

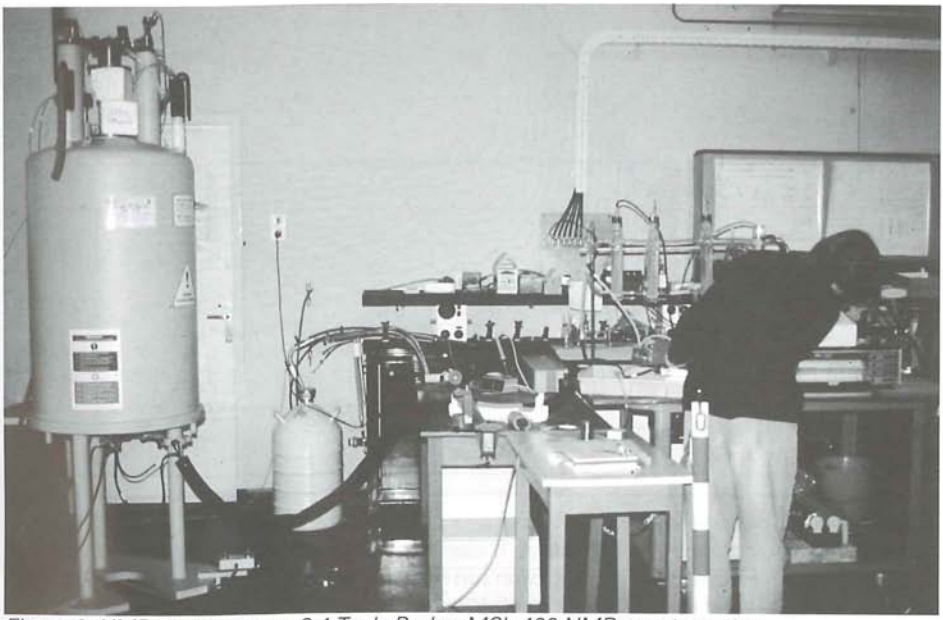
Figuur 1: Krantenbericht over mortaliteit in de bijvangst van de zeevisserij.

Energievoorraden in de witte spier van vis

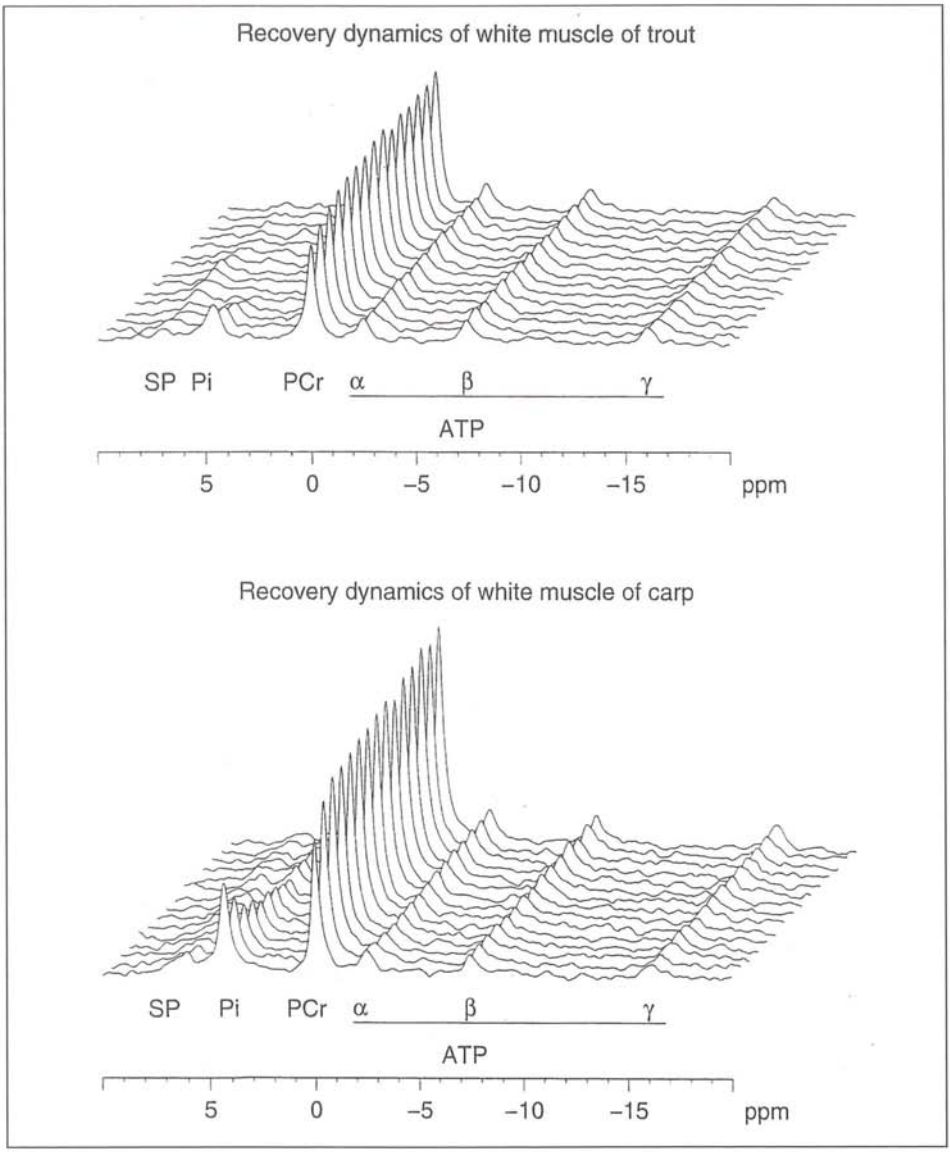
Sprintarbeid bij vissen wordt gevoed door drie interne substraten die in de witte spiermassa van vissen gelegen zijn. Glycogeen, ATP en phosphocreatine (PCr). De eerste momenten van arbeid (de eerste 15 seconden), worden gevoed door PCr en ATP. Daarna is de afbraak van glycogeen in de glycogenolysis het belangrijkste energiegenerende (=ATP) producerende proces. De afbraak van glycogeen gaat hand in hand samen met de productie van melkzuur (=lactaat). Na de extreme arbeid vindt herstel van de PCr en ATP voorraden in de spier plaats binnen ongeveer 1 uur. Herstelprocessen in spier van de glycogeenvoorraden duurt ongeveer 12 uur.



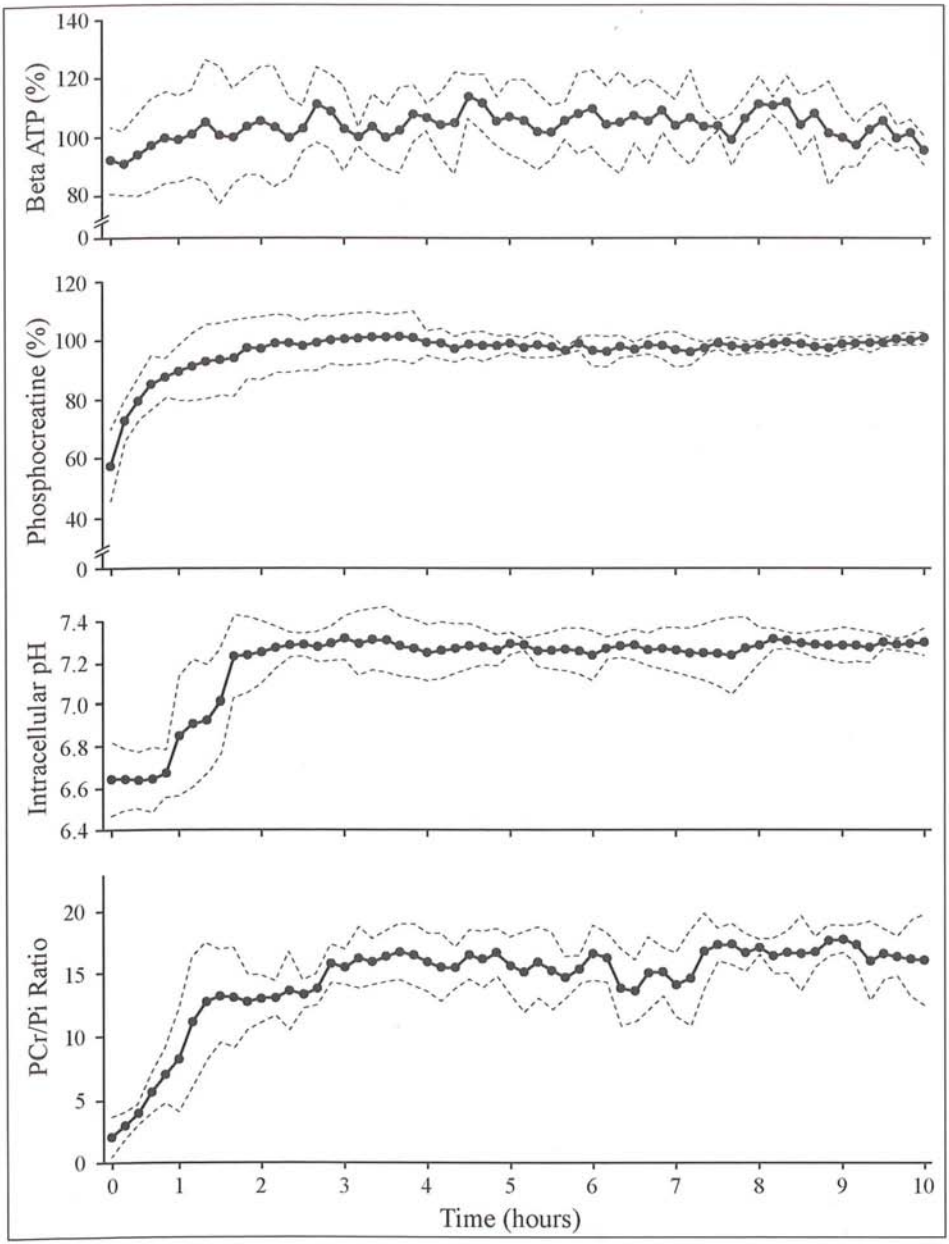
Figuur 2: Zwemtunnel waarin de karpers en forellen uitgeput worden bij een zwemsnelheid van 6 lichaamslengtes per seconde, voordat ze in de NMR magneet worden geplaatst.



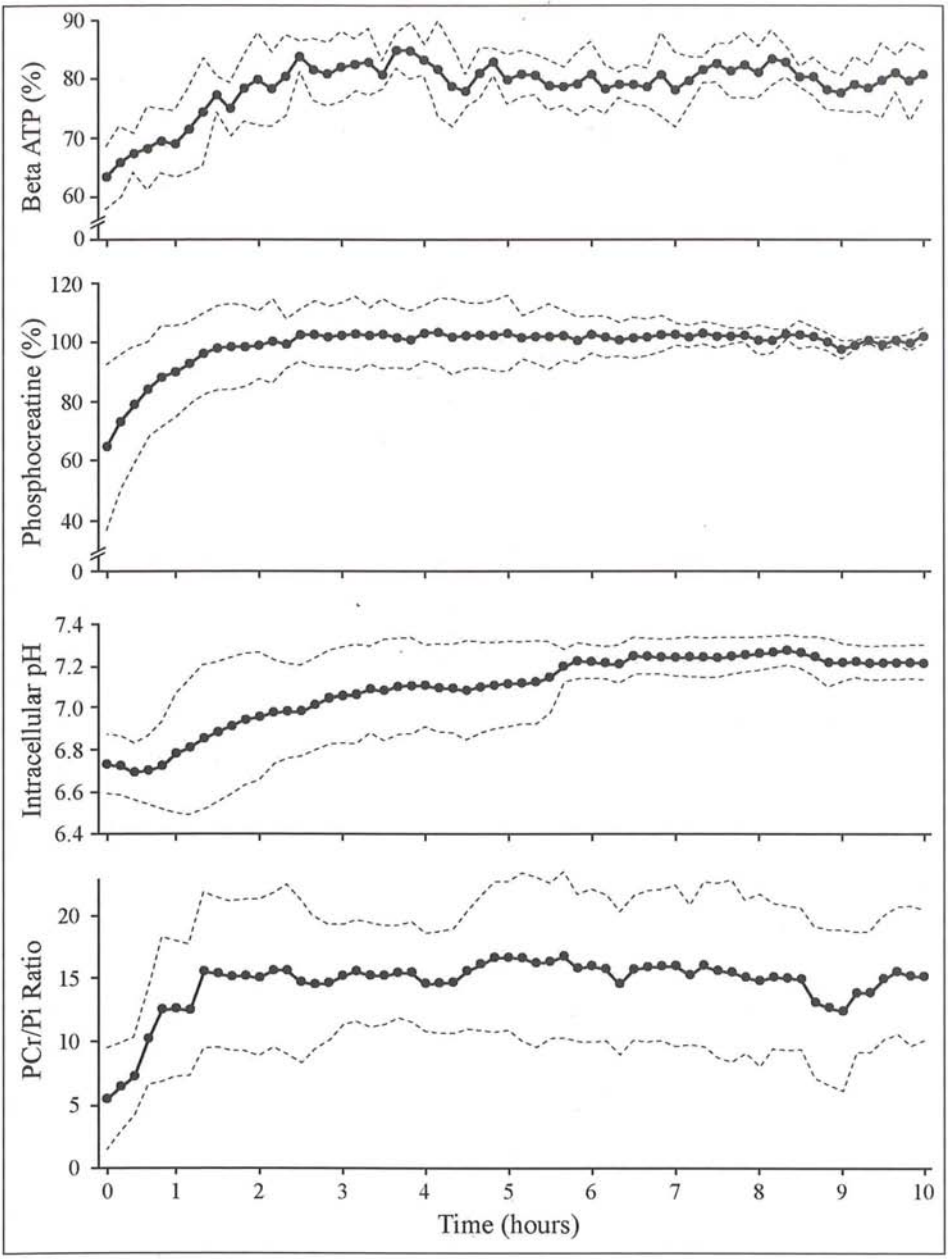
Figuur 3: NMR magneet: een 9.4 Tesla Bruker MSL-400 NMR spectrometer.



Figuur 4: Opeenvolgende in de tijd verkregen spectra van forel en karper spier. Iedere lijn correspondeert met een opname van 10 minuten. Pieken van de suikerfosfaten (SP), anorganisch fosfaat (Pi), phosphocreatine (PCr) en de pieken van het gamma, alpha, en béta-fosfaat atoom van het ATP molecuul zijn zichtbaar. De intracellulaire pH kan worden berekend uit de afstand tussen Pi en PCr, bij een verzuring van het weefsel verandert deze afstand.



Figuur 5: Herstelprocessen in de witte spier van onder andere ATP, phosphocreatine en de intracellulaire pH voor karper (gemiddelde waarde van 5 dieren met standaarddeviatie).



Figuur 6: Herstelprocessen in de witte spier van onder andere ATP, phosphocreatine en de intracellulaire pH voor forel (gemiddelde waarde van 5 dieren met standaarddeviatie).

Het NMR-experiment met forel en karper

Om inzichten te krijgen in de herstelprocessen van witte spier van energierijke verbindingen en intracellulaire pH zijn karpers en forellen eerst uitgeput in een zwemtunnel (figuur 2) bij een zwemsnelheid van 6 lichaamslengtes per seconde. Forel hield dit ongeveer 60-120 minuten vol terwijl karper dit ongeveer 30 minuten vol hield. Nadat de dieren ophielden met zwemmen werden ze direct in de NMR-magneet (figuur 3) geplaatst om met een oppervlaktespoel de veranderingen in spierweefsel te meten. In figuur 4 zien we het verkregen spectrum van forel en karper. Hieruit kunnen we de herstelprocessen in de witte spier van onder andere ATP, phosphocreatine en de intracellulaire pH voor beide vissoorten afleiden (figuur 5 en 6). We zien dat ATP en PCr zich relatief snel herstellen. In forel binnen 0.5 tot 1.5 uur terwijl dit voor karper 1.5 tot 2 uur duurt. De intracellulaire pH laat zien dat herstel van de verzuring relatief snel gaat in karper (1.75 uur) terwijl dit bij forel zo'n 6 uur duurt. Herstelprocessen in spier zijn dus duidelijk afhankelijk van de vissoort. In principe zijn drie processen verantwoordelijk voor het herstel van de intracellulaire pH. I) een efflux (wegstromen) van lactaat en protonen naar andere het bloedcompartiment (hoewel we in een vorig nummer van Aquacultuur, mei 2004, gezien hebben dat ter bescherming van het dier dit wegstroomprincipe beperkt is) , II) lactaat oxidatie en III) gluconeogenese. Dit laatste proces is de aanmaak van glucose en glycogeen uit onder andere lactaat in de mitochondrieen (energiefabriekjes in de

	Carp-survival	**Carp-mortality**	**P-value**
Sugarphospate (%)	6,99 (1,83)	6,76 (5,36)	0,9317
Inorganic phosphate (%)	18,55 (12,22)	75,44 (12,22)	0,0001*
Phosphocreatine (%)	67,36 (11,13)	13,65 (11,46)	0,0001*
β-ATP (%)	7,10 (1,56)	4,15 (1,61)	0,0186*
SUM (%)	100	100	-
Intracellular pH	6,64 (0,18)	6,63 (0,20)	0,937

	Trout-survival	**Trout-mortality**	**P-value**
Sugarphospate (%)	5,18 (3,08)	10,26 (4,61)	0,0804
Inorganic phosphate (%)	33,19 (24,67)	80,23 (8,40)	0,0037*
Phosphocreatine (%)	54,87 (25,09)	6,75 (5,52)	0,0030*
β-ATP (%)	6,76 (1,83)	2,76 (3,87)	0,0697
SUM (%)	100	100	-
Intracellular pH	6,76 (0,15)	6,62 (0,09)	0,1619

Figuur 7: Relatieve energievoorraden in spierweefsel en de intracellulaire pH van zowel overlevers als dieren die dood gingen na afloop van het experiment voor forel als karper.

Principe van de NMR-techniek

Thomas Huxley, een beroemd bioloog in de vorige eeuw, zei zo'n 100 jaar geleden. 'Wat een enorme revolutie zouden we doormaken in de biologie als de fysica of de chemie ons een instrument zou verschaffen waarmede we de moleculaire structuur van weefsels zouden kunnen bestuderen op een vergelijkbare wijze als de astronomie ons nu in staat stelt om met sterrekijkers de hemellichamen te bestuderen'. Zo'n techniek bestaat nu al zo'n 20 jaar namelijk de NMR of kernspinresonantie techniek.

Het principe van de techniek is de volgende. Alle kernen van atomen draaien rond hun as (figuur 8). Omdat ze geladen zijn hebben ze een magnetisch moment. Plaatsen we een kern in een sterk magnetisch veld dan kunnen ze in de richting van het veld staan of er tegenin. Een voorbeeld van zo'n kern is fosfor (^{31}P) en het is belangrijk om deze te volgen omdat deze betrokken is in het lichaam bij de energieoverdracht via de belangrijkste energiedrager ATP, adenosine-trifosfaat.

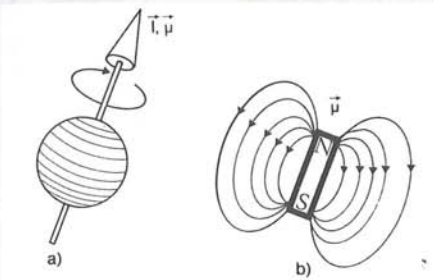
Tijdens de transitie van een hogere energie-staat naar een lagere (of omgekeerd) kunnen de kernen energie uitzenden (of absorberen). Dat uitzenden van resonantiestraling blijkt uit de naam: Nuclear Magnetic Resonance, ofwel ***NMR.***

Deze energie kan worden opgevangen met een spoel en bewerkt worden met de computer. We kunnen deze informatie nu op twee manieren weergeven. A) via spectra (zie figuur 4), of B) in de vorm van plaatjes (figuur 9).

Een kern in een molecuul wordt op een specifieke manier omgeven door elektronen. Het magnetisch veld en de bijbehorende resonantie zal dus specifiek zijn voor elk molecuul. Op deze wijze kunnen we bijvoorbeeld via ^{31}P-NMR informatie krijgen over stoffen als:

- *de suikerfosfaten (producten van de anaerobe glycolyse),*
- *Phosphocreatine (PCr, inert phosphagen opgelagen in grote hoeveelheden in de cel om de ATP pool te stabiliseren),*
- *ATP (1 mol glucose levert 36 mol ATP in het belangrijkste energie genererende proces in vertebraten, de oxidatieve fosforylering),*
- *Pi, (anorganisch fosfaat, een afbraakproduct van PCr),*
- *de intracellulaire pH (een maat voor de verzuring van het weefsel en een maat voor de activatie van de anaerobe glycolyse).*

Magnetic Resonance Imaging (MRI) gebruikt dezelfde principes als NMR , maar meet en bewerkt de gegevens op een andere manier om zo een beeld op te bouwen. De verdeling van met name watermoleculen verschilt per weefsel, waardoor ieder weefsel een subtiel ander signaal uitzendt in een MRI-machine. Die signaalverschillen kunnen op een beeldscherm worden omgezet in zwart-wit en grijstinten. Een voorbeeld in dit artikel is de afbeelding van een palingkop van een paling van ongeveer 10 gram (figuur 7). Dit is gedaan met een nieuwe machine, een nieuwe trend binnen de MRI: MRM, magnetic Resonance Microscopy. Gewone magneten in het ziekenhuis hebben een veldsterkte van ongeveer 1-2 Tesla. De hier beschreven 31P-NMR studie naar herstelmechanismen in spieren van vis, na uitputting in een zwemtunnel, is uitgevoerd op een 9.4 Tesla magneet, terwijl MRM-techniek zich bedient van magneten met een veldsterkte van rond de 18 Tesla. Op deze wijze kunnen we tot op 0.1 mm weefsels in levende dieren visualiseren zonder de dieren te opereren of te doden.



Figuur 8: Kern van atoom draait om z'n as. Omdat hij geladen is heeft hij een magnetisch moment.

cel) met voornamelijk vrije vetzuren als brandstof.

Vijftig procent mortaliteit

Het interessante aan deze studie was dat we (net als de eerder genoemde hengelsportliteratuur en informatie over hoge mortaliteit in de bijvangst van de zeevisserij), eveneens een 50% mortaliteit waarnamen bij de uitgeputte dieren, zowel voor karpers als forel. In het verleden heeft een auteur gesuggereerd dat deze sterfte veroorzaakt wordt door een sterke verzuring van het spiercompartiment van de vissen (Wood et al. 1983). In figuur 7 zijn de relatieve energievoorraden in spierweefsel en de intracellulaire pH (een maat voor de verzuring van het weefsel) gegeven van zowel overlevers als dieren die dood gingen na afloop van het experiment. We zien dat er geen verschil is in de mate van verzuring van het spierweefsel bij overlevers en dieren die sterven: de intracelullaire pH ligt na uitputting in de zwemtunnel bij beide groepen rond de 6.6-6.7. Wat wel opvalt is dat bij de overlevers de PCr en ATP voorraden minder uitgeput zijn. Mogelijk dat de dieren die overleven door hun hogere energievoorraden beter in staat zijn om te herstellen.

Kip of het ei kwestie

De vraagt blijft open of dit tekort aan energie in de "sterfte groep" wel de directe doodsoorzaak is of dat er toch een gecombineerd effect een rol speelt. Het verwijderen van giftige afvalstoffen zoals lactaat kost energie. In diverse studies is aangetoond dat het transport van lactaat via een 'anion' uitwisselaar verloopt en dat het een energie vergend proces is. Dus het is mogelijk dat dieren die sterven door een energietekort niet in staat zijn om afvalstoffen te verwijderen, dat er hierdoor een te langdurige verzuring in het lichaam blijft bestaan en dat dit uiteindelijk leidt tot de dood. Van onderzoek wordt gezegd dat het vaak verder leidt tot nieuwe vragen en vervolgonderzoek. Dit is zo'n typisch voorbeeld hiervan. Met zeer moderne technieken hebben we aangetoond dat een tekort aan energie en niet een verzuring de oorzaak is voor sterfte bij uitgeputte dieren. De vraag blijft open wat primair de doodsoorzaak is, het eigenlijke energietekort of het hierdoor vermindert in staat zijn om afvalstoffen te verwijderen. Het blijft dus een kip of het ei kwestie.

Literatuur

1. V.van Ginneken, T.Sundermeier, R.Boot, K.Coldenhoff, J.Hollander, F.Lefeber, G.van den Thillart. Depletion of energy stores in white muscle and not internal acidosis may be a possible cause for fish mortality after streneous exercise; an in vivo ^{31}P-NMR study. *Am.J.Physiology*, submitted.
2. C.M. Wood, J.D. Turner, M.S. Graham. Why do fish die after severe exercise? *J.Fish.Biol.* 22: 189-201, 1983.



Figuur 9: MRM-plaatje van een palingkop van een dier van ongeveer 10 gram.