

Bloedfragiliteit, een bruikbare parameter bij de optimalisering van visvoerders (visteeltsystemen)

Ludo Lokin

Aan de universiteiten van Leuven en Wageningen is een onderzoek gedaan naar het verschil in fragiliteit van de rode bloedcellen van wel en niet met *Anguillicollan crassus* geïnfecteerde paling (*Anguilla anguilla*), afkomstig uit het IJsselmeer. Als extra referentie werd een groep gekweekte paling in het onderzoek meegenomen. Het opmerkelijke van de uitkomst van dit experiment was, dat niet alleen de erythrocyten van de geïnfecteerde IJsselmeerpaling maar ook die van de gekweekte paling, significant zwakker waren dan die van de niet geïnfecteerde IJsselmeerpaling. In het hiervolgende stukje wordt wat verteld over het fysiologische belang van het bovengenoemde, de gebruikte technieken en de mogelijkheden die zij bieden aan voederproducenten en systeemontwerpers.

Wat is gezond en wat is ziek in het geval van vissen? Over ziekte kunnen we kort zijn. Dat is het moment waarop de visteler huilend naast zijn bakken staat. Over gezondheid is minder bekend. Een definitie van gezondheid is: een fysiologische conditie waarbij de vis optimaal kan functioneren (produceren) en waarbij zijn welzijn niet wordt geschaad (Heinsbroek). Het probleem zit hem in het woord 'optimaal'. In de intensieve visteelt kan men nooit spreken van een biologische optimale situatie. men streeft er echter wel naar. Zo wordt er veel onderzoek gedaan om het 'ideale voeder' te kunnen samenstellen of het 'ideale systeem' te kunnen ontwerpen. Om dit te kunnen bereiken is men op zoek naar

(gezondheids)parameters die de nuances weergeven. Boon gaf in 1985 zijn idee over het waardeverloop van de ideale parameter (fig 1). Het is de parameter die niet alleen gezondheid en ziekte weergeeft, maar ook alle daartussen liggende gradaties. En daar ligt de winst voor de toekomst! Het is de reden waarom men in Wageningen meer geïnteresseerd is in het brede begrip 'visgezondheid'; dan in het beperkte begrip 'visziekte'. Bloedfragiliteit is een parameter, die zekere nuances kan weergeven. De erythrocyt of rode bloedcel heeft als belangrijkste functie, het transporteren van zuurstof van de kieuwen (longen) naar de verschillende weefsels. De celinhoud, het hemoglobine en in het geval van vissen ook een kern, wordt omgeven door één membraan.

Dit membraan is opgebouwd uit eiwitten, cholesterol en fosfolipiden. Het bijzondere van deze fosfolipiden is, dat één zijde graag met water in aanraking komt terwijl de rest (de vetzuurketens) nu juist waterafstotend is. Om deze reden bestaat de membraan uit een dubbele laag van deze lipiden waarbij de waterafstotende delen naar elkaar toegericht zijn. In deze dubbele laag, of bilaag, zitten eiwitten die allerlei speciale eigenschappen en functies hebben. Er zijn meerdere lipidspecies zoals o.a. fosfatidylcholine (PC), -serine (PS), -ethanolamine (PE), en -inositol (PI), die op hun beurt weer vele moleculaire species kennen (in het geval van PC 20 stuks). Deze moleculaire species hebben dezelfde 'kopgroep' maar sterk verschillende vetzuurstaarten, variërend in lengte en graad van onverzadigdheid. Het zijn in sterke mate deze vetzuren die de fysiologische hoedanigheid van het membraan bepalen. Zo is het aangetoond, dat belangrijke parameters voor de eel, zoals vorm, osmotische fragiliteit en

permeabiliteit, sterk kunnen afhangen van de moleculaire samenstelling van de verschillende lipidspecies. Ook secundaire effecten, als deformeerbaarheid van de cel of de sterk daarmee samenhangende overleving van de cellen in de bloedsomloop, kunnen door variaties in de moleculaire samenstelling van de lipiden sterk beïnvloed worden. Om hun functie goed te kunnen uitvoeren, moeten de erythrocyten haarvaatjes (zeer kleine bloedvaatjes) passeren, die een kleinere diameter hebben dan de erythrocytendoorsnede. Vervorming is dan noodzakelijk. Bevindt de celmembraan zich niet in een optimale conditie, dan zijn er 2 problemen, te weten: 1. de zuurstofafgifte aan de weefsels verloopt niet optimaal, wat zijn gevolgen heeft voor de groei, en 2. de cellen 'slijten' sneller waardoor ze eerder aan vervanging toezijn, wat op zijn beurt het organisme weer energie kost.

Nu is aangetoond dat middels het dieet de vetzuursamenstelling en daarmee dus de integriteit van de erythrocytenmembraan in vivo kan worden gevarieerd. Met behulp van de osmotische fragiliteitsmeting kunnen de gevolgen van deze variaties zichtbaar worden gemaakt. Ook zou men zich m.b.v. de osmotische fragiliteit een idee kunnen vormen over de (relatieve) kwaliteit van een recirculatiesysteem of de wijze waarop een systeem op dat moment functioneert.

Kleine veranderingen in het milieu kunnen reeds lichte beschadigingen van de bloedcellen en daarmee verminderde gezondheid ten gevolge hebben. Er is dan nog lang geen sprake van een manifest ziektebeeld, maar het kost wel geld of kan geld gaan kosten. Het feit dat de erythrocyten van met commercieel voeder gekweekte paling net zo fragiel zijn (géén significant verschil) als die van met *Anguilla colla* cras-

W. & T. Handel GmbH

aangeboden

Kwaliteits glasaal

Kwaliteits pootaal

Kwaliteits meervalpootvis

W. & T. Handel GmbH

An der Raubkammer 3. 3042 Munster

telefoon 09 495192. 7557. telex 924178 swd. telefax 09 495192-10515

sus geïnfecteerde 'wilde' paling, duidt erop dat er, wat betreft deze gevoeligheid, goed reproduceerbare en zich betrekkelijk snel instellende parameterwaarde, nog wel het een en ander aan voeding en/of systeem verbeterd kan worden. Het aanpassingsvermogen van membranen van ectotherme (koudbloedige) dieren aan variërende temperaturen, de zogenaamde homeoviscuze adaptatie, is in dit verhaal buiten beschouwing gelaten. Men moet er echter bij de proefneming wel rekening mee houden. De osmofrag zou mogelijk zelfs informatie kunnen verschaffen over de snelheid en herleidt de waarde van de homeoviscuze adaptatie onder de gegeven omstandigheden plaatsvindt. De osmotische fragiliteit kan, als gevoelige parameter, bij bovengenoemd streven gebruikt worden.

De methode(n)

Osmotische fragiliteit: met behulp van een injectiespuit wordt bij de vis bloed afgenomen, waarna d.m.v. centrifugatie het plasma van de bloedcellen wordt gescheiden. De bloedcellen worden drie keer gewassen in een 0,9 procent NaCl oplossing (isotone opl.). De osmotische fragiliteit van een erythrocytensuspensie wordt bepaald door het meten van veranderingen in absorptie bij 690 nm als een functie van de zoutconcentratie. In een thermostatische cuvet worden 12 μ l 'packed cells' (afgedraaide rode bloedcellen) gesuspendeerd in 10 ml 60 procent isotone buffer (5.4 g NaCl/l Tris-HCl, pH 7.4). Aan deze oplossing wordt met een snelheid van 1 ml/min een 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 (hypotoon) oplossing toegevoegd.

Hiervoor wordt een zeer nauwkeurige peristaltische pomp gebruikt. De bloedcellen zwellen op. De veranderingen in absorptie worden continu geregistreerd. De waargenomen veranderingen worden voor het 'verdunnings effect' gecorrigeerd, door

het experiment te herhalen met gebruikmaking van een isotone buffer i.p.v. de 10 mM Tris-HCl oplossing. Afhankelijk van hun membraanintegriteit beginnen de erythrocyten bij een zeker osmolariteit (= procent van de isotone oplossing) te barsten. verticale is het percentage gebarsten cellen (homolyse) weergegeven. Bepalend voor de 'kwaliteit' van de membraan is de osmolwaarde waarop 50 procent van de bloedcellen is gehemolyseerd. In het geval van de gekweekte paling lag deze waarde op 32,9 procent osmol, significant verschillend van de 31,1 procent osmol bij de niet geïnfecteerde IJsselmeer paling. De informatie, verkregen uit de osmolariteitsmetingen, moet men relateren aan de informatie, verkregen uit de lipidanalyse. De fosfolipidsamenstelling van de lipidextracten wordt bepaald met tweedimensionale High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) (modificatie op de TLC techniek van Broekhuysse, 1969), gevolgd door een fosfaatbepaling van de individuele fosfolipidspots (Böttcher et al., 1961). Zo vallen de verhoudingen tussen de verschillende fosfolipidspaties te bepalen. De moleculaire samenstelling van de fosfolipiden d.w.z. het antwoord op de vraag welke vetzuren er zijn gebonden aan de 'kopgroep', kan men achterhalen door gebruik te maken van Gaschromatografische technieken.

Samenvattend kan gezegd worden dat voeding van invloed is op de kwaliteit van de erythrocytenmembraan, belangrijk voor het functioneren van de erythrocyt en daarmee voor het algehele welzijn van het organisme. Osmotische fragiliteitsmetingen, gekoppeld aan enkele andere technieken, geeft een betrouwbaar (reproduceerbaar) beeld van de membraankwaliteit. •