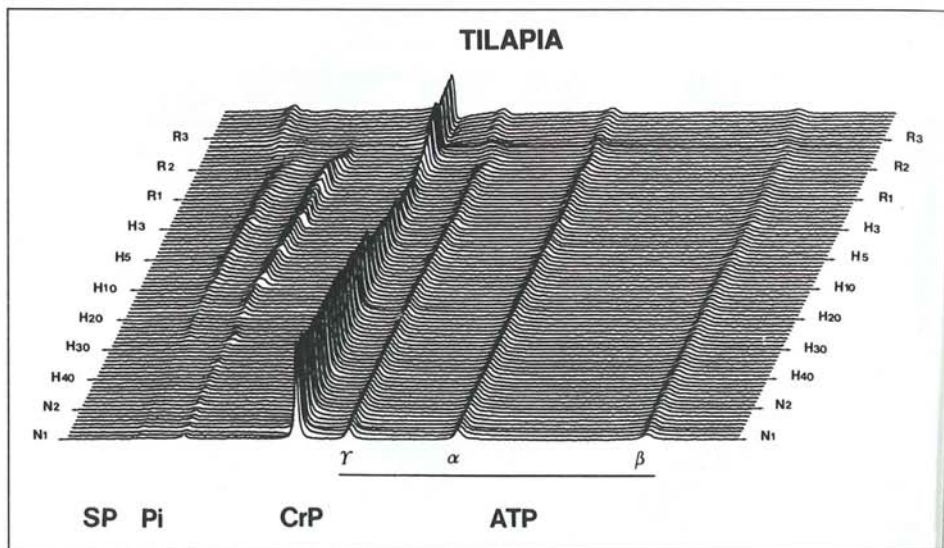


Een manier om extreme milieucondities te overleven

Stofwisselingsonderdrukking bij vissen

Vincent van Ginneken, Dierfysiologie, Biologie, Rijksuniversiteit Leiden

Bij het bestuderen wat de invloed is van nadelige milieufactoren zoals lage zuurstofspanning (hypoxie) en verzuring van het oppervlaktewater op het metabolisme van vissen is gebleken dat stofwisselingsonderdrukking ('metabolic depression') voor sommige vissoorten een belangrijke overlevingsstrategie is. Op deze wijze weten ze zuiniger met hun energievoorraden om te gaan en vermijden ze de ophoping van afvalprodukten in het lichaam. Dit blijkt uit een promotieonderzoek uitgevoerd bij de vakgroep Dierfysiologie (Begeleiders: Prof. Dr. A.D.F. Addink & Dr. G. van den Thillart, Rijksuniversiteit Leiden). Het onderzoek werd gefinancierd door de NWO-Stichting Levenswetenschappen (SLW).



♦ **Figuur 1:** Opeenvolgende spectra van een typisch ^{31}P -NMR experiment met tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Ieder spectrum geeft de accumulatie van 146 scans over een periode van 1 minuten. Normoxie (N) en hypoxie (H) en een deel van de recovery (R) periode zijn weergegeven. De pieken van de suikerfosfaten (sp), anorganisch fosfaat (Pi), de reserve energiestof creatine fosfaat (PCr) en de pieken van de γ -, α -en β -fosfaat atomen van het ATP molecuul zijn zichtbaar. De intracellulaire pH een maat voor de activiteit van de anaerobe glycolyse kan worden afgeleid uit de chemical shift ('afstand') tussen PCr en Pi. (bron: van Ginneken, V. et al. (1997) *Am.J.Physiol.* **268**:R1178-R1187).

De effecten van milieuvervuiling op het aquatisch milieu

De afgelopen 12 jaar is de zuurstofspanning in het Nederlands oppervlaktewater met ongeveer 20% gedaald door o.a. vervuiling met zuurstofconsumerende verbindingen (1). Verder kan de zuurstofconcentratie in het water dalen b.v. in de wintertijd als er een verminderde fotosynthese is door beschaduwning door een laag sneeuw op het ijs (2). Ook kunnen vissen in de aquacultuur te maken hebben met lage zuurstofconcentraties (hypoxie) b.v. door overbezetting (3). Tenslotte is ook gerapporteerd dat de visserij nadelen kan ondervinden van lage zuurstofspanning; bepaalde delen van de Adriatische zee worden in de zomertijd hypoxisch door algenbloei (4).

Verzuring van het Nederlands oppervlaktewater is eveneens een probleem in de slecht gebufferde wateren (5) maar vooral in bepaalde delen van de wereld zoals Scandinavië (6) en het noordoosten van de VS (7). De centrale vraag was nu, hoe reageren vissen qua energiehuishouding op een lage zuurstofspanning en verzuring en op de combinatie daarvan?

De meettechnieken

Het doel van het project was om met niet-invasieve technieken als kernspinresonantie (^{31}P -NMR) en calorimetrie de invloed van nadelige milieufactoren zoals lage zuurstofspanning (hypoxie) en verzuring op het energiemetabolisme van vissen te bestuderen.

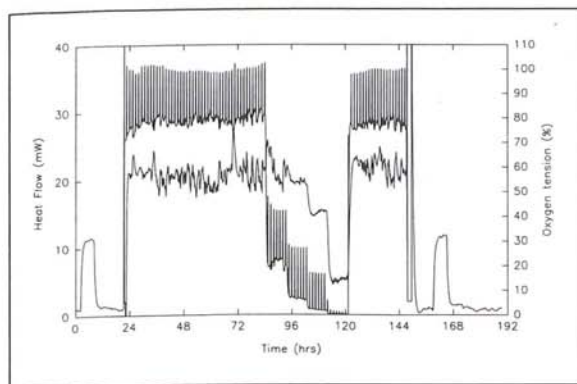
Deze benaderingswijze heeft verschillende voordelen: 1) elk dier fungeert als zijn eigen controle (de effecten van de verschillende experimentele situaties worden in hetzelfde dier bestudeerd hetgeen ons in staat stelt de grootte van de experimentele proefdiargroep te reduceren; 2) de technieken zijn diervriendelijk; 3) er zijn geen artefacten t.g.v. het doden van het dier of t.g.v. extractie van de weefsels (8). Warmteproduktiemetingen (een maat voor de stofwisselingssnelheid) van de vissen vonden plaats in een calorimeter. Een probleem bij het meten van warmteproductie bij vissen is dat ze koudbloedig zijn. Hun stofwisselingssnel-

heid ligt 20 keer lager dan dat van warmbloedigen (9). Bovendien bezit het medium water een hoge warmtecapaciteit hetgeen betekent dat het relatief ongevoelig is voor een temperatuurverandering. Bovendien willen we meten aan dieren die vrij zijn van stress hetgeen kan ontstaan wanneer die dieren in het apparaat worden geplaatst. Om hieraan tegemoet te komen is een doorstroomcalorimeter ontwikkeld (10). Een voorwaarde voor dit doorstroomstelsel is dat de temperatuur van het instromende water tot een honderdduizendste graad stabiel moet zijn om het geringe warmtesignaal van de vissen te kunnen meten.

Via de kernspinresonantietechniek (^{31}P -NMR) werd gekeken hoe de energierijke verbindingen (zoals ATP, creatinefosfaat) alsmede de intracellulaire pH zich in het spierweefsel gedroegen van vissen blootgesteld aan lage zuurstofcondities (figuur 1). Hiertoe werd de vis kort verdoofd en met behulp van een opblaasbaar kussentje klem gezet in een doorstroomcel (11). Vervolgens werden de kieuwen geperfuseerd door water in de bek van het dier te pompen. Het dier werd met de doorstroomcel in de NMR-magneet geplaatst en met een gasmengpomp werden verschillende niveaus van hypoxie aangelegd. Heel duidelijk is te zien dat de energierijke verbindingen zich aanpassen aan het zuurstofaanbod (figuur 1). M.a.w. het dier heeft een reserve energievoorraad creatinefosfaat in de spiercel waarmee het de ATP pool weet te stabiliseren. Ook via de anaërobe glycolyse (daling intracellulaire pH) weet het dier ATP te genereren. Op deze wijze is het dier in staat periodes van lage zuurstof te overleven. Echter daalt de ATP beneden een bepaalde waarde (70%) dan gaat het dier dood (12).

Stofwisselingsonderdrukking bij lage zuurstofspanning

Waarom kan een paling zes uur overleven zonder zuurstof terwijl een forel al na enkele minuten doodgaat? Het antwoord op deze vraag is: stofwisselingsonderdrukking. Stofwisselings-



♦ **Figuur 2:** Registratie van een 8 dagen duren calorimetrisch experiment met 4 goudvissen (*Carassius auratus* L.) gewichten 9.6, 8.1, 9.5 en 6.4 gram. Na 84 uur werden de dieren blootgesteld aan drie niveaus van hypoxie (42.5%, 27.1% en 16.7% luchtverzadiging) gevolgd door anoxie. Het bovenste signaal, alternerend tussen referentie en meetpositie is het zuurstofspanningssignaal. De onregelmatige lijn is het warmteproductiesignaal. (bron: Ginneken van, V.J.T.; et al. (1994). *Thermochimica Acta* **247**:209-224).

onderdrukking, een soort winterslaap, is een algemeen voorkomend verschijnsel in de natuur, voorkomend bij een grote groep dieren, zoals insecten in diapauze, hamsters tijdens winterslaap of duikende schildpadden (13). Net zoals de stofwisseling geactiveerd kan worden bij extreme arbeid zijn sommige soorten ook tot het tegenovergestelde in staat: verlaging van de stofwisseling tot beneden het standaard metabolisme. Dat dit verschijnsel ook bij vissen voorkomt is gebleken uit warmteproductiemetingen d.m.v. calorimetrie aan o.a. Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) en goudvissen (*Carassius auratus*). Goudvissen reduceren de stofwisseling tijdens anoxie (geen zuurstof) met 70% (figuur 2) (14) terwijl Mozambique tilapias tijdens extreme hypoxie dit doen tot 50% van het standaardmetabolisme (15).

Gebaseerd op de endogene zuurstofvoorraden en via deconvolutie van het calorimeter-sig-naal (een techniek waarbij de tijdconstante

van een systeem wordt geminimaliseerd) werd geconcludeerd dat stofwisselingsonderdrukking in anoxische goudvissen plaatsvindt op een tijdschaal van 10 tot 20 minuten (16). Tezamen met de stofwisselingsonderdrukking bij Mozambique Tilapia werd de externe activiteit van de dieren gemeten met een videobewegingsanalyse-systeem. Tijdens een experiment werd iedere seconde een foto van het dier genomen. De foto's werden door de computer met elkaar vergeleken en verschillen tussen twee foto's (in pixels uitgedrukt) was een maat voor de activiteit van het dier (figuur 3). Er werd geconcludeerd dat stofwisselingsonderdrukking niet veroorzaakt werd door een reductie van de externe activiteit (15) maar een andere oorzaak heeft, vermoedelijk een reductie van de bloeddorstomping en een reductie van de spierspanning (13).

Verder werd een verband gevonden tussen de concentratie van de neurotransmitter GABA in hersenweefsel en het al of niet op treden van stofwisselingsonderdrukking. In Mozambique tilapia en goudvis (beide soorten met stofwisselingsonderdrukking) werden verhoogde concentraties van GABA in hersenweefsel aangetroffen terwijl dit in de gewone karpers niet het geval was (17). Gewone karpers gingen al na 30 minuten anoxieblootstelling dood, tilapia's na twee uur en goudvis was na acht uur nog in leven. Dit laatste wordt natuurlijk naast de stofwisselingsonderdrukking veroorzaakt door een lactaat-ethanol conversie (een mechanisme waarbij een inwendige verzuring wordt voorkomen door lactaat om te zetten in alcohol welk wordt uitgescheiden aan het water).

De effecten van verzuring

Verzuring als factor op zich bleek geen effecten te hebben op Mozambique tilapia wat betreft metabole snelheid, oxycalorische waarde

(18), stress-hormoon cortisol, ionenbalans, en energiemetabolisme (19), zolang aan twee voorwaarden werd voldaan: 1) een geleidelijke verzuring (van pH 7.6 naar 4.0 over een periode van zes uur), hierdoor wordt voorkomen dat er beschadigingen aan de chloride cellen in het kieuwweefsel optreden en 2) het vermijden van biotische stressoren (gedragseffect, arbeid) en abiotische stressoren (verzuring, zware metalen, aluminium, of hypoxie) (19, 20). Combinatie van op zich zelf weinig verstoren-de stressoren kunnen echter synergistisch (versterkend) werken hetgeen een ernstige bedreiging voor vispopulaties kan zijn, omdat deze effecten niet te voorzien zijn. In ons onderzoek, in een *in vivo* ^{31}P -NMR studie, werd gevonden dat Mozambique tilapia goed overweg kon met verzuring of hypoxie als enkele stressfactor. Werd de combinatie toegepast dan stierf 50% van de dieren terwijl de overle-

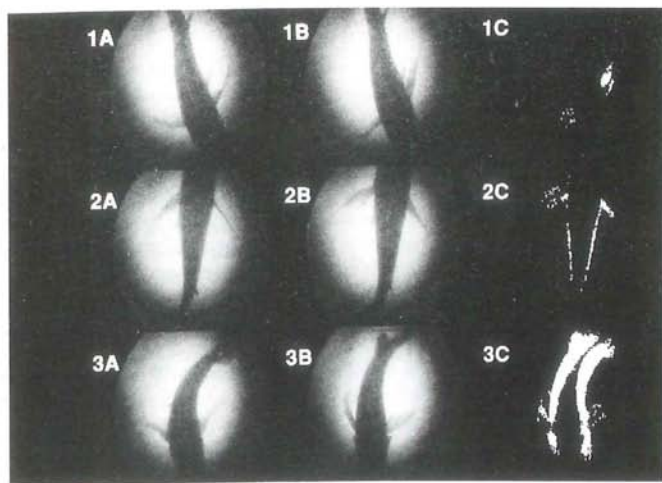
vers een vertraagd herstel vertoonden van de energierijke verbindingen (o.a. creatinefosfaat en ATP) en de intracellulaire pH (21). Verder bleek dat stofwisselingsonderdrukking bij Mozambique tilapia niet kon worden geïnduceerd door een verzuring van het water (18).

Een ander voorbeeld van het synergistisch effect van verzuringstress bleek uit een studie aan gecanuleerde karpers in ons laboratorium. De dieren krijgen een slangetje in de dorsale aorta aangebracht zodat de onderzoeker bloed kan tappen zonder dat het dier het merkt. Op deze wijze kunnen hormonen (zoals de stresshormonen cortisol en de catecholamines) alsmede substraten als glucose, vrije vetzuren en aminozuren stressvrij worden bemonsterd. Uit deze studies bleek dat verzuring op zich geen effecten had op de ionenbalans, cortisolspiegel en bloedplasma pH (22) maar werden de gecanuleerde karpers na verzuring blootge-

steld aan arbeid door ze te laten zwemmen in een zwemtunnel dan daalde de plasma pH, Na^+ en Cl^- in het plasma en nam de concentratie van het stresshormoon cortisol viervoudig toe (23). We kunnen dus concluderen dat combinaties van stressoren een ernstige bedreiging kunnen vormen voor vispopulaties.

Conclusies

Vissen kunnen condities van lage zuurstof overleven via een verhoogde anaërobe glycolyse, met behulp van de reserve-energiestof creatinefosfaat en een stofwisselingsonderdrukking. Het precieze regulatie mechanisme van stofwisselingsonderdrukking in vissen is nog onduidelijk maar waar-



♦ **Figuur 3:** Fotoserie waarbij het inter-image interval tussen **A** en **B** 120 ms is. Image **C** is het verschil beeld waar het witte gebied het verschil weergeeft in pixels tussen beeld **A** en **B**. Met behulp van deze witte gebieden (opgebouwd uit individuele pixels) kan mobiliteit worden gekwantificeerd. Fotoserie 1 geeft alleen activiteit ten gevolge van vinbewegingen van de vis. Fotoserie 2 en 3 geven activiteit van de vis ten gevolge van een verplaatsing van het lichaam. (bron: Ginneken van, V. et al. (1995) *Comp.Biochem.Physiol.* accepted).

schijnlijk wordt het proces veroorzaakt door een reductie van de spierspanning en de bloeddorstomring.

Verzuuring van het oppervlaktewater heeft geen nadelige effecten op de energie status en op de ionen balans en resulteert niet in de vorming van het stresshormoon cortisol als aan twee eisen wordt voldaan: de verzurings-snelheid moet laag zijn en additionele biotische of abiotische stressoren moeten worden vermeden.

Tot besluit kan geconcludeerd worden dat visen zeer goed aangepast zijn om **tijdelijk** met nadelige milieufactoren als hypoxie en verzuuring om te gaan. Echter combinatie van beide stressoren is een ernstige bedreiging voor vispopulaties omdat de effecten elkaar versterken.

Literatuur

- Aalderink, R.H.(1991). *Analysis of the oxygen content in the Dutch surface water 1978 until 1989*. Agricultural University Wageningen, Department of Nature Conservation, Section Water-quality.
- Baird, D.J.; Gates, T.E.; Davies, R.W.(1987). Oxygen conditions in two prairie potholelakes during winter ice cover. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 44:1092-1095.
- Boyd, C.E.(1979). *Water quality in warmwater fish ponds*. Auburn University, Agricultural Experiment Station, R.Dennis Rouse, Director/Auburn, Alabama, 359 pp.
- Thillart van den G.; Dalla Via, J.; Vitali, G.; Cortesi, P.(1994). Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea* 1. Critical O_2 levels for aerobic and anaerobic metabolism. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 104:109-117.
- Leuven, R.S.E.W.; Oyen, F.G.F.(1987). Impact of acidification and eutrophication on the distribution of fish species in shallow and lentic soft waters of the Netherlands: a historical perspective. *J.Fish.Biol.* 31:753-774.
- Leivestad, H.; Muniz, I.P.(1976). Fish kill at low pH in a Norwegian river. *Nature* 259:391-392.
- Haines, T.A.(1981). Acidic precipitation and its consequences for aquatic ecosystems: A review. *Transactions of the American fisheries society* 110: 669-707.
- Thillart van den, G.; Waarde van, A.; Muller, H.J.; Erkelens, C.; Lugtenburg, J.(1990). Determination of high-energy phosphate compounds in fish muscle: ^{31}P -NMR spectroscopy and enzymatic methods. *Comp.Biochem.Physiol.* 95B: 789-795.
- Robinson, W.R.; Peters, R.H.; Zimmerman, J.(1983). The effects of body size and temperature on metabolic rate of organism. *Canadian Journal of Zoology* 61:281-288.
- Addink, A.D.F.; Thillart, van den, G.; Smit, H.; Waversveld van, J.(1991). A novel 1 liter flow-through calorimeter for heat production measurements on aquatic animals without stress. *Thermochimica Acta* 193:41-48.
- Thillart van den, G.; Körner, F.; Waarde van, A.; Erkelens, C. and Lugtenburg, J.(1989). A flow-through probe for *in vivo* ^{31}P -NMR spectroscopy of unanesthetized aquatic vertebrates at 9.4 Tesla. *J.Magn.Reson.* 84:573-579.
- Ginneken van, V.; Thillart van den, G.; Addink, A.; Erkelens, C.(1995). Fish muscle energy metabolism measured during hypoxia and recovery: an *in vivo* ^{31}P -NMR study. *Am.J.Physiol.* 268:R1178-R1187.
- Thillart van den, G.; Ginneken van, V.(1996). Flexible metabolic depression of fish: a review. *Comp.Biochem.Physiol.* submitted.
- Ginneken van, V.J.T.; Gluvers, A.; Linden van der, R.W.; Addink, A.D.F.; Thillart van den, G.E.E.J.M. (1994). Direct calorimetry of aquatic animals: automated and computerized data-acquisition system for simultaneous direct and indirect calorimetry. *Thermochimica Acta* 247: 209-224.
- Ginneken van, V.; Addink, A.; Thillart van den, G.; Körner, F.; Noldus, L.; Buma, M.(1995). Metabolic rate and level of activity determined in tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) by direct and indirect calorimetry and video monitoring. *Comp.Biochem. Physiol.* accepted.
- Ginneken van, V.J.T.; Vanderschoot, J.; Addink, A.D.F.; Thillart van den, G.E.E.J.M. (1995). Direct calorimetry of aquatic animals: dynamic response of biological processes. *Thermochimica Acta* 249:143-159.
- Ginneken van, V.; Nieveen, M.; Thillart van den, G.; Addink, A.(1996). Neurotransmitter levels and energy status in brain of fish species with and without the survival strategy of metabolic depression. *Comp.Biochem.Physiol.* in press.
- Ginneken van, V.; Addink, A.; Thillart van den,

- G.(1996). Direct calorimetry of aquatic animals. Effects of the combination of acidification and hypoxia on the metabolic rate of fish. *Thermochimica Acta* accepted.
- 19) Ginneken van, V.; Eersel van, R.; Balm, P.; Thillart van den, G.(1996). The effect of long term exposure to low environmental pH on the energy status, ionic-balance and plasma cortisol of Tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters). In preparation.
 - 20) Balm, P.H.M.; Pottinger, T.G. (1993). Acclimation of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to low environmental pH does not involve an activation of the pituitary interrenal axis, but evokes adjustments in branchial structure. *Can.J.Fish.Aquat. Sci.* 50:2532-2541.
 - 21) Ginneken van, V.; Thillart van den, G.; Addink, A.; Erkelens, C.(1995). Potentiating effect of acidification and hypoxia: an *in vivo* ^{31}P -NMR study and respirometric study. *Am.J.Physiol.* submitted.
 - 22) Dijk van, P.L.M. Thillart van den, G.; Wendelaar-Bonga, S.(1993). The influence of gradual water acidification on the acid/base status and plasma hormone levels in carp. *J.Fish.Biol.*42:661-671.
 - 23) Dijk van, P.L.M. Thillart van den, G.; Wendelaar-Bonga, S.(1993). Is there a synergistic effect of steady state exercise and water acidification in carp ? *J.Fish.Biol.* 42:673-681.