

Is de Afrikaanse meerval een waterademhaler of een luchtademhaler?

Ir. J.C.F. van Heeswijk, Dr. G.J. Vianen en Dr. G.E.E.J.M. van den Thillart.

Biologie, Universiteit Leiden.

Zoogdieren en vissen verschillen sterk in hun omgang met zuurstoftekort met betrekking tot hun vetmetabolisme. Zoogdieren ondergaan dit lijdzaam, terwijl vissen er ogenschijnlijk een beschermingsmechanisme tegen hebben. Wij vermoeden dat dit te maken heeft met hoe een dier ademhaalt: lucht of water. De Afrikaanse meerval, wel bekend in Nederland, is een goed model voor dit onderzoek. Maar is deze vis fysiologisch gezien nu vooral een luchtademhaler zoals iedereen hem kent of toch een gewone waterademhalende vis?

Fysiologie van zuurstofstress

Zoals bij iedereen wel bekend zal zijn, zorgt stress voor het zogenaamde "fright-flight"-effect. In het Nederlands betekent dat in een stresssituatie een dier zich voorbereert om om te gaan met de stresssituatie. In fysiologische termen betekent dit dat er stresshormonen vrij komen die er voor zorgen dat er energie in het lichaam wordt vrij gemaakt in de vorm van glucose en vetzuren. Het meest bekende stresshormoon is adrenaline, wat minder bekend is noradrenaline. Beiden zijn vergelijkbaar in de functie die ze hebben in zoogdieren, maar niet in vissen zoals we later zullen zien.

In zoogdieren zorgen beide hormonen voor het vrijkomen van vetzuren. Vetzuren zijn goede energieleveranciers die echter alleen verbrand kunnen worden als er zuurstof aanwezig is. Nu kennen zoogdieren als luchtademhalers een constante bron van zuurstof, namelijk de lucht. Zelden zal er

du sprake zijn van een zuurstoftekort; dergelijke gevallen bestaan wel en dan moeten denken aan het afsluiten van bloedvaten waardoor weefsel geen bloed krijgt en dus geen zuurstof. Een hartaanval is één van de duidelijkste voorbeelden. Bij deze zuurstofstress worden er onder invloed van de stresshormonen extra vetzuren vrij gemaakt terwijl er geen afbraak meer mogelijk is; uiteindelijk bereiken de vetzuren zelfs giftige niveaus waarbij ze celmembranen verstoren en daarmee cellen laten lekken. Uiteindelijk sterven deze cellen af met alle schadelijke gevolgen van dien voor het organisme (Moore, 1985). Kortom een "vetzuurvergiftiging" onder zuurstofgebrek kan een serieus gevaar opleveren ware het niet dat voor luchtademhalende zoogdieren dit zelden voorkomt.

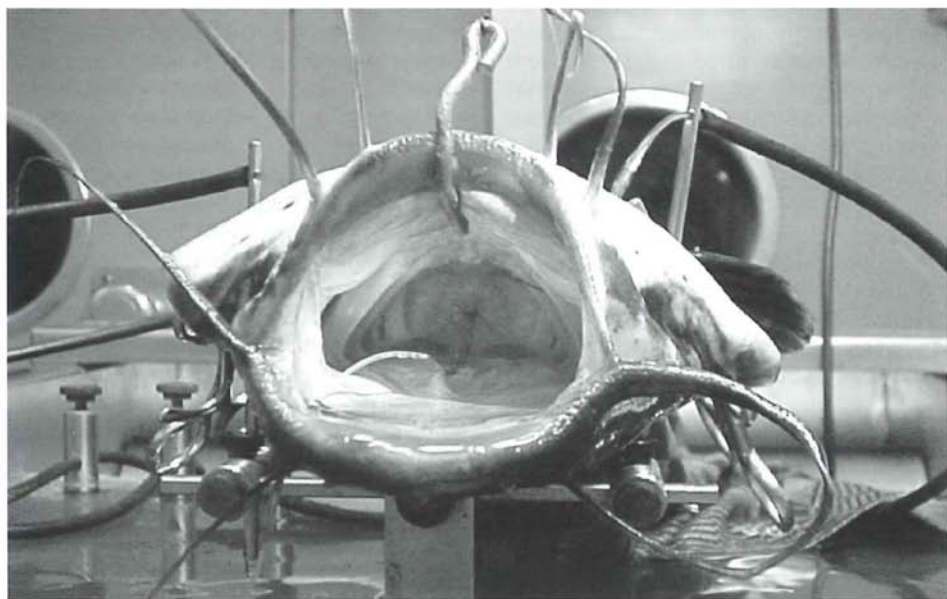
Waterademhalende dieren zoals vissen kunnen echter wel op regelmatige basis in situaties komen waarin de zuurstofconcent-

tratie in het water te laag is voor de normale ademhaling. Zeker vissoorten die leven in stilstaande warme wateren komen hier vaak, zelfs dagelijks, mee in aanraking. Een voorbeeld hiervan is onze eigen karper (*Cyprinus carpio*), die van origine een subtropische vis is. Vissen hebben dus een verhoogde kans op zuurstofgebrek en lijken dus, op basis van de kennis bij zoogdieren, veel gevaar te lopen voor vergiftiging door vetzuren. Van Raaij et al. (1994) lieten echter zien dat bij goudvissen, zelfs onder volledige zuurstofloosheid van het water, er geen stijging was van vetzuren in het bloed. In tegendeel zelfs, de concentratie vetzuren daalde met 50%. Glucose vertoonde daarentegen wel een stijging zoals bekend van de zoogdieren; deze stijging vormt geen gevaar aangezien glucose wel zonder zuurstof kan worden afgebroken, namelijk tot melkzuur (lactaat). Later werd hetzelfde fenomeen van dalende vetzuurspiegels ook waargenomen bij de karper, tilapia

(*Oreochromis mossambicus*) en zelfs bij de forel. Concluderend kan dan ook gesteld worden dat de daling van de vetzuren waarschijnlijk een beschermingsmechanisme tegen vetzuurvergiftiging is. Vianen et al. (1999) bewezen onomstotelijk dat het hormoon noradrenaline (NA) verantwoordelijk is voor deze daling. Dat noradrenaline leidt tot een verhoogde concentratie aan glucose in het bloed was bekend van de zoogdier literatuur; een dalende concentratie aan vetzuren was echter een compleet nieuwe ontdekking omdat in de zoogdierliteratuur noradrenaline beschouwd wordt als een sterk vetzuurstimulerend hormoon (Smith, 1983).

Waarom de Afrikaanse meerval

Vanuit het evolutionair oogpunt van onze onderzoeksgroep betekent dit dat de functie van noradrenaline veranderd is in de evolutie. Onze hypothese is dat het onderdrukkende effect van noradrenaline over-



Figuur 1. Een Afrikaanse meerval tijdens de canulatie-procedure.

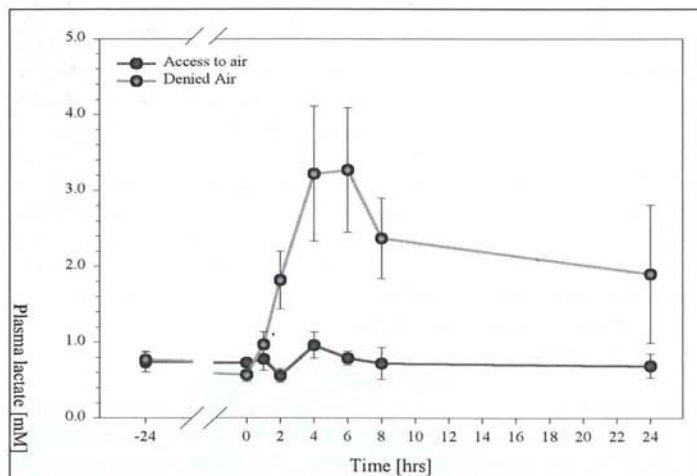
bodig werd bij de switch van waterademhaling naar luchtademhaling. Bij de overgang naar luchtademhaling werd de onderdrukkende rol van noradrenaline overbodig en kreeg zelfs uiteindelijk een stimulerende rol. Om deze stelling te kunnen bewijzen, zijn de luchtademhalende vissen zeer geschikte proefdieren. We verwachten dat deze luchtademhalende vissen geen onderdrukking van de vetzuren laten zien omdat ze altijd de beschikking hebben over zuurstof uit de lucht. Als onderzoeker in Nederland is de eerste vis die in je op komt met betrekking tot luchtademhaling, natuurlijk de Afrikaanse meerval (*Clarias gariepinus*). Wat weten we nu over de luchtademhaling van de Afrikaanse meerval? De meervalsoorten van de familie van de Clariidae hebben een zogenaamd suprabranchiaal of accessoir respiratoir orgaan (SRO of ARO) (Teugels, 1982). Dit orgaan vindt zijn oorsprong in de tweede en vierde kieuwboog. Het bestaat uit "gill fans", het arborescent orgaan (oftewel bloemkoolorgaan) en de

suprabranchiale kamers, allen sterk doorbloed (Moussa, 1957). *Clarias gariepinus* oftewel de Afrikaanse meerval heeft een goed ontwikkeld SRO. Onduidelijk is echter hoe belangrijk dit is voor de vis: is het een facultatieve luchtademhaler zoals Magid (1971) beweert en kan hij dus zonder luchtzuurstof leven of is het toch een obligate luchtademhaler zoals Moussa (1957) beweert en sterft de vis zonder lucht. Zeker is dat de vis geruime tijd in zuurstofarme wateren en zelfs op het droge kan leven. Een eerste stap in ons onderzoek was dan ook een evaluatie betreffende het belang van luchtademhaling voor de Afrikaanse meerval.

Canulatie van Afrikaanse meerval

Omdat de huidige wetgeving voorschrijft om zo min mogelijk proefdieren te gebruiken, is besloten om voor deze vissoort een canulatietechniek te ontwikkelen. Canulatietechnieken zijn in essentie zeer eenvoudig: namelijk een dun slangetje wordt in

een groot bloedvat ingebracht. De praktijk is echter stukken lastiger. Het vergt veel ervaring om op gevoel een bloedvat te vinden, je kunt namelijk de bloedvaten van de vis niet zien lopen! Via een aangebrachte canule kan ten alle tijde bloed bemonsterd worden zonder dat de vis op enigerlei wijze verstoord wordt, meestal hebben de vissen zelfs geheel niets door. Door gebruik van antistollingsmiddelen wordt verkomen dat bloed in de canuleslang stolt en daar



Figuur 2. Het verloop van de lactaat concentratie in het bloed van Afrikaanse meerval wanneer de toegang tot lucht wordt ontzegd op $t=0$ uur (rode lijn). Controle dieren (blauwe lijn) hadden ten alle tijden toegang tot lucht.

mee verstopt raakt. Het alternatief van deze techniek is bloedbemonstering via een punctie van de caudale vene na algehele verdoving. Het moge duidelijk zijn dat deze methode veel stress oplevert en dus niet frequent uitgevoerd kan worden door de fysiologische verstoringen als gevolg van deze stress, laat staan dat het geschikt is voor onderzoek naar stresshormonen als noradrenaline.

Voor de Afrikaanse meerval zijn 2 methoden van canulieren getest, namelijk canulatie van de kieuwarterie en van de dorsale aorta (zie figuur 1). De dorsale aorta canulatie heeft de voorkeur om meerdere redenen. Ten eerste was het bloedverlies tijdens de operatie kleiner dan bij canulatie van de kieuwarterie; omdat deze arterie dicht bij het oppervlak ligt, welt er bij het aanprikken vlug en veel bloed op. Bij het aanprikken van de dorsale aorta zorgt het omringende elastische weefsel ervoor dat er weinig bloedverlies is. Ten tweede was het bloedverlies na de operatie via de wond aanzienlijk lager bij canulatie in de dorsale aorta. Ten slotte zijn er indicaties dat canulatie van de dorsale aorta minder stressvol was voor het dier en ook daarom de voorkeur verdient.

Belang van luchtademhaling

Met de canulatietechniek hebben we gekeken hoe belangrijk de luchtademhaling is voor de Afrikaanse meerval door onder gecontroleerde omstandigheden gecanuleerde meervallen te verhinderen lucht te ademen. Door het bloedbeeld te volgen tijdens deze experimenten kregen we een beeld van de veranderingen die de afwezigheid van lucht in het dier bewerkstelligen. De belangrijkste parameter was het melkzuurgehalte omdat dit aangeeft in hoeverre de kieuwademhaling van het dier voldoende is voor de zuurstofbehoefte. Zoals te zien is in figuur 2 liep het melkzuurgehalte sterk op en piekte 4 tot 6 uur nadat de lucht was weggenomen. In een later stadium daalde

de melkzuurconcentratie, hoewel het na 24 uur nog steeds niet op de normale waarden was teruggekeerd. Het is duidelijk dat de Afrikaanse meerval langere tijd kan leven op alleen waterademhaling. Luchtademhaling is voor de vis echter wel een manier om de zogenaamde "scope of activity" uit te breiden, anders gezegd door luchtademhaling kan de meerval meer doen omdat hij niet meer afhankelijk is van water wat van nature relatief weinig zuurstof bevat. De luchtademhaling geeft de meerval dus een voorsprong op andere vissen.

Vetmetabolisme van de Afrikaanse meerval

Een volgende stap was om te kijken hoe de Afrikaanse meerval zou reageren op toediening van het hormoon noradrenaline. Wederom via de canulatietechniek werd nu niet alleen bloed afgetapt maar via dezelfde weg ook stoffen toegediend aan het dier. Daarvoor werd niet noradrenaline gebruikt maar een farmacologisch vergelijkbare stof, genaamd isoproterenol. Het effect daarvan is te zien in figuur 3 wanneer deze stof geïnfuseerd wordt gedurende 1,5 uur. Het glucosegehalte vertoonde het verloop wat we verwachtten, namelijk een stijging tijdens de gehele infusie. Het vetzuurverloop daarentegen vertoonde vanaf het begin van de infusie op tijdstip 0 een daling tot aan het einde na 1,5 uur. Het moge duidelijk zijn dat dit verloop kenmerkend is voor een waterademer oftewel noradrenaline heeft nog steeds zijn "beschermend" effect.

Conclusie

Kortom, we kunnen concluderen dat de Afrikaanse meerval fysiologisch een waterademer is, zowel wat betreft zijn vermogen om zonder luchtademhaling te leven als wat betreft het onderdrukkend effect dat noradrenaline heeft op het vetzuurgehalte in het bloed.

Is nu de conclusie gerechtvaardigd om te

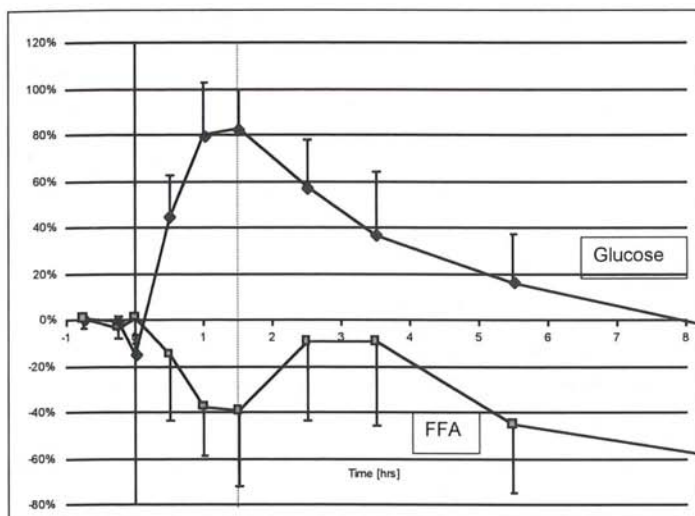
zeggen dat de manier van ademhaling evolutionair gekoppeld is aan de rol van nor-adrenaline? Voor die uitspraak is er tot nu toe nog te weinig ondersteuning. Naar ons idee is de Afrikaanse meerval te veel een wateradempaler en te weinig een luchtadempaler. Een volgende stap in dit onderzoek is dan ook om vergelijkbare experimenten te doen met een vissoort waarvan alom bekend is dat luchtademhaling belangrijker is dan waterademhaling: de Afrikaanse longvis. Van deze soort is bekend dat ze net als wij verdrinken wanneer ze de toegang tot lucht wordt ontzegd. Momenteel zijn er 33 longvissen in ons bezit welke worden opgekweekt tot een grootte van circa 1 kg. Daarmee gaan we dezelfde experimenten nogmaals uitvoeren, tot die tijd weten we niet of er een vissoort is die dezelfde controle over het vetzuurmetabolisme heeft als wij zoogdieren.

Literatuur

1. Magid, A.M.A. (1971). The ability of *Clarias lazera* (Pisces) to survive without air breathing.

Journal of zoology; 163: 63-72.

2. Moore, K.H. (1985). Fatty acid oxidation in ischemic heart. *Molecular Physiology*; 8: 549-563.
3. Moussa, T.A. (1957). Physiology of the accessory respiratory organs of the teleost, *Clarias lazera* (C. &V.). *Journal of Experimental Zoology*; 36: 419-454.
4. Smith, U. (1983). Adrenergic control of lipid metabolism. *Acta medica scandinavica*, suppl. 672; 41-47.
5. Teugels, G. (1982). A systematic outline of the African species of the genus *Clarias* (Pisces, Clariidae), with an annotated bibliography. Publ. by: Tervuren, Koninklijk Museum voor Midden Afrika Thesis: 249 pp.
6. Van Raaij, M.T.M., Breukel, B.J., Van den Thillart, G.E.E.J.M. and Addink, A.D.F. (1994). Lipid metabolism of goldfish, *Carassius auratus*, during normoxia and anoxia. Indications for fatty acid chain elongation. *Comparative Biochemistry and Physiology*; 107B: 75-84.
7. Vianen, G.J., Van den Thillart, G.E.E.J.M., Van Kampen, M., Van Heel, T.I., and Steffens, A.B. (1999). Substrate mobilization and stress hormones in common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic hypoxie. Submitted.



Figuur 3. Verloop van het vetzuur (FFA) en glucosegehalte in Afrikaanse meerval bij infusie van isoproterenol van 0 tot 1,5 uur.