

Komparative studier af hvid- og rød-blodede antarktiske fisks fysiologi og kardiovaskulære anatomi

Af projektleder, lic.scient. John Fleng Steffensen, Marinbiologisk Laboratorium, Københavns Universitet

Togtben 12

Øvrige Deltagere: Professor Peter G. Bushnell, (USA), forskningsadjunkt, ph.d. Peter V. Skov (KU), stud.scient. Bjørn Tirsgård (KU) og skipper Benly Thruw (MBL).

Formål

Formålet med projektet var at belyse de hjerte- og kar-mæssige fysiologiske konsekvenser af at mangle respiratoriske pigmenter i blodet og i muskulaturen. Dette blev udført ved at lave komparative fysiologiske undersøgelser mellem rød-blodede antarktiske fisk (der har bevaret deres respiratoriske pigmenter) og en hvidblodet antarktisk fisk, der evolutionært har mistet både myoglobin og hæmoglobin.

Projektets formål blev belyst gennem følgende eksperimentelle arbejde om bord på VÆDDEREN

1. Respirationsmålinger blev udført på hvilende fisk for at vurdere, om manglen på hæmoglobin har medført et lavere iltforbrug under hvile.
2. Der blev foretaget afstøbninger af cirkulationssystemet hos tre forskellige Notothenioider - to rød-blodede og en hvidblodet - for at vurdere, om manglen på et ilttransporterende protein har medført ændringer i blodkarrenes dimensionering og gællernes overfladeareal.
3. Der blev indsamlet væv til histologiske undersøgelser af de centrale og perifere blodkar for at vurdere størrelse og densitet.
4. Der blev indsamlet hjertevæv (atrium og ventrikel) fra samme arter som i punkt 2. Disse blev frosset i flydende kvælstof og transporteret tilbage til Danmark for at måle enzymaktivitet med henblik på at evaluere biokemiske tilpasninger til lave temperaturer.
5. Der blev foretaget kraftpræstationsmålinger af isoleret væv fra ventrikel og atrium fra samme arter for at vurdere effekten af adrenalin og frekvens på hjertets pumpekapacitet.

Baggrund

Manglen på respiratoriske pigmenter menes bl.a. at have medført et usædvanligt stort blodvolumen hos hvidblodede fisk (Acierno et al., 1995). Der er imidlertid ikke nogen plau-

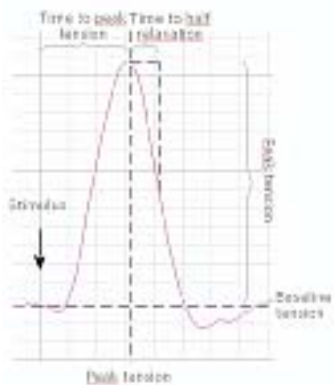
sibel grund til, at blodvolumenet nødvendigvis er større end hos fisk med røde blodlegemer. Vores oprindelige ønske var at undersøge blodvolumen vha. en allerede anvendt teknik (Skov & Steffensen, 2003), men dette krævede en større mængde fisk, end der var til rådighed på togtet. Blodet hos isfisk kan, grundet manglen på røde blodlegemer, kun indeholde omkring 5-15 % af den mængde ilt, som findes i rød-blodede fisk. Derfor skal hjertet pumpe forholdsvis meget mere blod for at kunne opretholde et iltforbrug som andre fisk. Derfor ønsker vi også at undersøge hjertets pumpekapacitet.

Der er flere årsager til, at det er interessant at undersøge og sammenligne iltforbruget hos de hvid- og rød-blodede antarktiske fisk. Rød-blodede fisk er normalt, det man kalder oxyregulatorer - pga. blodets høje affinitet for ilt er de i stand til at opretholde deres iltforbrug selv i perioder med lave iltkoncentrationer (hypoksi). Da de hvid-blodede fisk ikke har iltbindende pigmenter, må det formodes, at deres iltforbrug vil falde i takt med faldende iltkoncentration og altså være såkaldte iltkonformere. Disse forsøg udføres ved at placere fiskene i dertil indrettede kamre og med computerstyret respirimetrisk udstyr automatisk måle deres iltforbrug (Steffensen et al., 1994). Endvidere vil iltforbrugsmålinger fra disse arter forsyne os med et stærkere datasæt til vurdering af, om fisk ved polerne udviser en såkaldt metabolsk kuldeadaptation.

Ved ovenstående undersøgelser var det vores ønske at få et bedre indblik i fysiologiske og anatomiske forskelle i hjerte-kar-systemet og den overordnede ilttransport i disse to nært beslægtede, men fundamentalt forskellige arter - vi kan undersøge, hvilke strukturer, der assisterer med at levere ilt, og hvor meget der leveres til vævene, og relatere disse til ændringer i iltens partialtryk i det vand, de lever i. Endvidere kan visse funktioner korreleres til temperatur, hvorved vi kan få en idé om, i hvor stort omfang dette er en begrænsende faktor i deres fysiologi.

Deltagelse i Galathea 3 samt forskningsmæssig status

Fiskefysiologigruppen mødtes i Christchurch og gik om bord på VÆDDEREN den 8. januar 2007. De følgende dage blev brugt til at forberede akvariefaciliteter, så vi kunne holde levende fisk, opstille forskelligt videnskabeligt udstyr i laboratoriet samt forberede forskelligt fiskeudstyr. Togtet startede med afsejling den 11. januar, og kursen blev sat mod Den Antarktiske Halvø. Efter et døgn's tid passerede vi Antipodeerne, hvor der blev fisket med Agazzitrawl og fiskestænger. For den fiskefysiologiske gruppe var det en stor fordel, at der var tid til at stoppe op og fiske, idet fangsten på omkring 20 eksemplarer af arten *Notothenia microlepidota* gav os en uventet mulighed for at starte eksperimentelle forsøg omkring to uger før ventet. Samtidig fik vi en uventet mulighed for at indsamle data om hjertefunktionen og kredsløbet hos

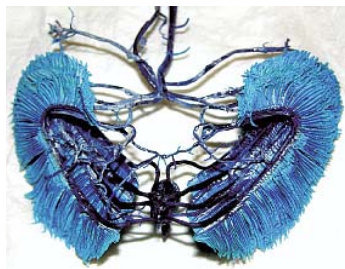


en ikke-antarktisk *Notothenioid* til sammenligning med de eksemplarer, vi senere forventede at fange ved Den Antarktiske Halvø. Endvidere gav det os lejlighed til at optimere forsøgsopstillingen og lave tiltag, der gjorde det muligt at udføre skibsbaserede eksperimentelle forsøg selv under søgang.

På de ca. 14 dages sejlads på åbent hav og dybt vand var vi forberedte på, at der ikke ville komme levende fisk på dækket, som kunne bruges til eksperimentelle forsøg, så vi ventede spændt på at nå frem til Palmer Station. Før togtet havde vi været i forbindelse med en amerikansk kollega, som for ca. 30 år siden havde fanget isfisk i en afstand af få sømil fra stationen. Med nøjagtige positioner og præcise beskrivelser af de anvendte langliner var vi derfor meget optimistiske, da vi fra VÆDDERENS gummibåd udsatte to 400-meter-langliner på mellem 10 og 30 meters dybde. Efter udsættelsen af langlinerne blev den fiskefysiologiske gruppe samt et par deltagere fra antifryseproteinprojektet efterladt på Palmer Station, mens VÆDDEREN sejlede videre bl.a. for at udsætte fiskefælder på dybere vand. Under opholdet på Palmer fangede vi med fiskestang mange eksemplarer af *Notothenia coriiceps*. Personalet på Palmer Station viste sig yderst hjælpsomt og imødekommende, og vi fik lov til at opbevare vores fisk i stationens tanksystem, inden de blev transporteret med gummibåd tilbage til VÆDDEREN.

Da vi blev samlet op af VÆDDERENS gummibåd omkring 12 timer senere og skulle røgte langlinerne, var spændingen stor – var der isfisk i perfekt stand? Lige så stor var skuffelsen, da vi konstaterede, at vi ikke havde fanget en eneste isfisk, på trods af at vi benyttede præcis samme metode som kollegerne 30 år tidligere. På langlinerne var der dog adskillige eksemplarer af andre arter, der indgik i flere af de øvrige forskningsprojekter om bord. Ved vores hjemkomst til skibet blev vi glædeligt overraskede over, at en del af de tilbageværende besætningsmedlemmer og ekspeditionsdeltagere, som havde ligget for svaj et par sømil længere ude på omkring 70 meters dybde, havde fanget adskillige store flotte eksemplarer af den ønskede isfisk, *Chaenocephalus aceratus*, med almindelige fiskestænger.

Nu var der masser af levende fisk af forskellig art, og tidspresset blev stort, idet vi vidste, at det ville være umuligt at udføre forsøg i mere end 6–7 døgn. Fiskeakvarierne blev forsynet med overfladevand, og vi var forberedte på, at når kursen blev sat nordover fra Den Antarktiske Halvø over Drage Passage, ville vandtemperaturen inden for kort tid stige adskillige grader, hvilket de antarktiske fisk ikke ville kunne tolerere. Den følgende uge inddelte vi os i hold, således at der kunne arbejdes i døgndrift, og udbyttet af de fangne fisk kunne optimeres. Hjertermuskulaturens arbejdskapacitet blev målt ved af spænde tynde muskelstrimler op mellem krafttransducere og et fast punkt (isometrisk) i et termostateret kammer med fysiologisk saltvand svarende til fiskenes plasma og den ønskede adrenalinkoncentration. Musklen



Som en del af projektet blev der med flydende latex lavet afstøbninger af cirkulationssystemet hos forskellige fiskearter for at undersøge blodkarrenes dimensionering og morfologi. Her ses gællernes blodkar fra *Notothenia microlepidota*. Afstøbningerne blev, grundet overgang til et nyt afstøbningsmateriale, ikke fuldt ud tilfredsstillende, men vil på sigt indgå i et større studium af gællers udvekslingsareal. Foto: Peter V. Skov

blev bragt til sammentrækning ved elektrisk stimulering, og frekvensen blev kontrolleret via en pc, der samtidig samlede data op. Dataanalyse blev foretaget manuelt. I princippet får man en kraftkurve, som det fremgår af nedenstående figur. Heraf kan man aflæse tiden for kontraktion og afslapning og maksimal kraft. Ved hjemkomst blev vævene vejet, og efterfølgende er det således muligt at beregne kraften per arealenhed muskel samt den samlede pumpekapacitet for hjertet.

Efter hjemkomsten

De hjertefysiologiske data er blevet analyseret og sammenskrevet til et manuskript, der er blevet indsendt til et internationalt tidsskrift. Kort opsummeret kan vi konkludere, at adrenalins rolle som modulator af hjertefunktionen viser stor interspecifik variation. Således fandt vi, at hos *Notothenia microlepidota* samt *Chaenocephalus aceratus* kunne hjertets pumpekapacitet ændres optimalt ved en kombination af øget adrenalin og øget hjertefrekvens. Overraskende var dette ikke tilfældet for *Notothenia coriiceps*, der ikke udviste en positiv effekt af øget hjertefrekvens, men fuldt ud regulerede sin pumpekapacitet ved hjælp af øgede adrenalinmængder. Ikke overraskende var hjertevæv fra *N. microlepidota* i stand til at udføre væsentligt mere arbejde end de andre arter, et fysiologisk træk, der skyldes den højere temperatur, den lever ved, men som samtidig viser, at de antarktiske arter ikke har udviklet fysiologiske tilpasninger, der fuldt ud kompenserer for de lave temperaturer, de lever i. Interessant er det, at isfisken *C. aceratus*, der som kompensation for manglen på hæmoglobin har udviklet et meget stort hjerte, har et atrium, der er i stand til at generere signifikant højere tryk end ventriklen. Dette viser, at denne art er afhængig af, at atrium kan generere tilstrækkeligt tryk til at fylde den meget store ventrikel.

Med udgangspunkt i undersøgelserne fra Galathea 3 har vi endvidere udført sammenlignende undersøgelser på arktiske polartorsk (*Boreogadus saida*) under et togt til Nordøstgrønland med det norske havundersøgelsesskib Jan Mayen i efteråret 2007.

Idet kombinationen af et gyngende skibsdæk, motorvibrationer og ekstremt tidspres ikke er ideelle betingelser for udførelse af eksperimentelle forsøg på levende, ustressede fisk - som f.eks. hvileiltforbrug og svømmeenergetik - har vi planer om at vende tilbage til den amerikanske Palmer Station for en længere periode og arbejder i øjeblikket på en ansøgning til den amerikanske National Science Foundation. Ligeledes planlægger vi som en naturlig fortsættelse af Galathea 3 flere sammenlignende landbaserede undersøgelser i Grønland.

Der arbejdes i øjeblikket på de enzymkinematiske undersøgelser af den hjembragte hjertemuskelatur for at se, om metabolismen af hjertevæv korrelerer med deres præstationssevne og det temperaturregime, de lever ved.

Ud over de ovennævnte aktiviteter deltog fiskefysiologigruppen i følgende formidlingsaktiviteter:



Et kig ind i en af laboratoriecontainerne, hvor flere deltagere på Galathea 3 delte faciliteter. Forrest lektor John Fleng Steffensen, til højre lektor Peter G. Bushnell, bagest forskningsadjunkt Peter V. Skov. Foto: Bjørn Tirsgård



Fisken *Notothenia microlepidota*, som blev fanget ved Antipodeøerne, var en af de arter, hvis hjertefunktion blev undersøgt. Som det ses af slægtsnavnet er den i familie med fisken fra Palmer Station, men den lever i varmere (7 grader) vand uden for den antarktiske polarstrøm. Foto: Peter V. Skov



Den amerikanske forskningsstation Palmer Station på Den Antarktiske Halvø (64.70° S, 64.00° V). Her fik såvel forskere som journalister lov til at besøge faciliteterne. Forskere, der skulle bruge fisk, fik lov til at fiske fra stationen og bruge stedets akvariefaciliteter under besøget. Foto: Peter V. Skov



Indersiden af hjertekamrene hos den antarktiske fisk *Notothenia coriiceps* - en af de arter, der blev brugt til at måle hjertemusklaturens præstationsevne ved frysepunktet. Foto: Peter V. Skov



Fiskefysiologi-teamet umiddelbart før ankomsten til Valparaiso. Fra Venstre John Fleng Steffensen, Peter V. Skov, Bjørn Tirsgaard, Peter G. Bushnell og Benly Thru. Foto: VÆDDERENS Doc.

1. Peter G. Bushnell, Peter V. Skov og John Fleng Steffensen holdt hver et foredrag om bord på Galathea 3 for Søværnets besætning og ekspeditionsbesætningen.
2. Peter G. Bushnell skrev weblog og rejsebeskrivelser til et amerikansk outreach-projekt og bidrog til en artikel i South Bend Tribune, USA.
3. Vores projekt figurerede i flere avisartikler samt forskellige web-baserede artikler, mens vi var om bord.
4. Peter V. Skov skrev weblog til Jyllands-Posten.
5. Efter hjemkomsten har skipper Benly Thru holdt omkring 15 foredrag på skoler, i foreninger og i forbindelse med Galathea Danmark om dagligdagen og oplevelser om bord.
6. Undertegnede har på opfordring af det Europæiske Miljøagentur holdt oplæg til filmen Pingvinmarchen, som blev vist på det Danske Filminstitut i efteråret 2007.

For økonomisk støtte takkes Knud Højgaards Fond og Carlsbergfondet

Supplerende litteratur:

- DeVries, A. & Steffensen, J. F. (2005). The Arctic and Antarctic Polar Marine Environment. Side 1-24 i Academic Press *Fish Physiology Series*, vol. 22 "Polar Fish". Eds.: A. P. Farrell & J. F. Steffensen.
- Skov, P. V. and Bennett, M. (2005). Branchial vascular pathways in two species of Tetraodontiformes and the concept of secondary vessels and nutrient arteries. *Zoomorphology* 124, pp. 79-88.
- Skov, P. V. & Steffensen, J. F. (2003). The blood volumes of the primary and secondary circulatory system in the Atlantic cod *Gadus morhua* L., using plasma bound Evans blue and compartmental analysis. *J. exp. Biol.* 206; 591-599.
- Steffensen, J. F. & Lomholt, J. P. (1992). The secondary vascular system. Chapter in *Fish Physiology Vol. XIII A*. Eds. Hoar, W. S. Randall, D. J. & Farrell, A. P. Academic Press. p. 185-217.
- Steffensen, J. F. (2002). Metabolic cold adaptation: Fact or artefact? *Artefact! Comp. Biochem. Physiol. Comparative Physiology & Biochemistry.* 132; 789-795.
- Steffensen, J. F. (2005). Respiratory systems and metabolic rates. In *Academic Press Fish Physiology Series*, vol. 22 "Polar Fish". Eds.: A. P. Farrell & J. F. Steffensen.