

Livet uden ilt

- tilpasning til et liv i koma

Hvordan kan visse arter af skildpadder klare sig flere måneder uden ilt, når de overvintrer nedgravet i mudderet på bunden af isdækkede vandhuller? Svaret findes i nogle ekstraordinære fysiologiske tilpasninger, som forskere med stor interesse studerer.

Af Johannes Overgaard, Hans Gesser og Tobias Wang

■ Ingen hvirveldyr kan overleve uden ilt. I det nordlige USA og sydlige Canada lever der ikke desto mindre nogle arter af skildpadder, der kan klare sig uden ilt i mange måneder. Disse skildpadder, der bl.a. inkluderer den maledede sumpskildpadde (*Chrysemys picta*) og den rødørede terrapin (*Trachemys scripta*), overvintrer i isdækkede vandhuller og småsøer, hvor vandets iltindhold hurtigt opbruges efter overisningen. Her, begravet i det iltfrie mudder på bunden, ligger skildpadderne i en koma-lignende tilstand, indtil isen smelter så de kan genoptage den normale vejrtrækning.

Overlevelse under disse ekstreme forhold stiller store fysiologiske krav, og skildpadderne har da også udviklet en række ekstraordinære tilpasninger, der gør dem i stand til at overleve uden ilt i længere tid end nogen andre hvirveldyr. Disse enestående egenskaber gør skildpadderne interessante for forskere, der gerne vil forstå de generelle fysiologiske mekanismer bag evnen til at overleve iltmangel hos hvirveldyr. I vores forskergruppe har vi specielt været interesseret i at forstå, hvorledes hjerte- og kredsløbsfunktioner er tilpasset, så de kan fungere under disse ugunstige forhold.



Foto: Jørgen Dahlggaard

Et søvnigt eksemplar af den rødørede terrapin, Trachemys scripta, der kan overvintere i isdækkede vandhuller og småsøer uden ilt.

Livet på lavt blus

Ilt bruges normalt i stofskiftet under omdannelsen af fødens kemiske energi til cellernes brændstof: det energirige molekyle ATP. Der findes dog også en anden type stofskifte – mæl-

kesyreforbrænding eller anaerobt stofskifte – der ikke kræver ilt. Ved anaerobt stofskifte produceres ATP uden ilt og mælkesyre akkumuleres som et affaldsprodukt. Dette sænker imidlertid kroppens pH og har dermed

store konsekvenser for kroppens syre-base balance.

Pattedyr og fugle kan kun overleve uden ilt i meget korte perioder (typisk kun i få minutter). Dette skyldes, at varmblodede dyr ikke i længere perioder



Foto: Tobias Wang

Den maledede sumpskildpadde (*Chrysemys picta*) er den skildpaddeart, der er mest tolerant overfor iltmangel. Selvom overvintring i iltfattigt vand under isen er et ekstremt miljø at overleve i, er det muligvis at foretrække frem for de kuldegrader, og den udtørring, de ellers ville blive udsat for, hvis de overvintrede på landjorden.

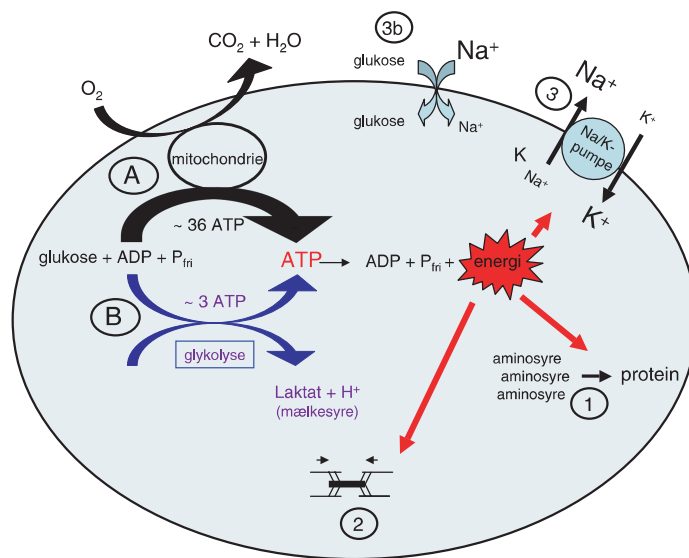
ATP - Cellens "energivaluta" (Boks 1)

ATP (Adenosintrifosfat) kan betragtes som cellens basale energienhed, og den energi, der er lagret i det energirige ATP-molekyle, bruges til cellens mange energikrævende processer. ATP dannes ved forening af ADP (adenosindifosfat) og frit fosfat (P_{fi}) igennem en energikrævende proces, hvor cellernes energilagere, i form af sukker eller fedt, forbrændes.

I figuren ses, at ATP-produktionen kan foregå i *mitochondrierne*, hvor en iltkrævende (aerob) proces fuldstændigt forbrænder sukker og fedt til kuldioxid og vand, hvorved der produceres 36 molekyler ATP per molekyle sukker (A).

Når der ikke er ilt tilstede, kan ATP produceres via en ufuldstændig og ikke iltkrævende (anaerob) forbrænding af sukker, men her dannes der kun 3 molekyler ATP per sukermolekyle, og ved denne form for forbrænding er slutproduktet mælkesyre (B). Den anaerobe forbrænding har derfor to ulemper. For det første er anaerob forbrænding meget mindre effektiv mht. at omdanne sukker til ATP og for det andet medfører denne type forbrænding også en forsyning på grund af ophobningen af mælkesyre (som spaltes til laktat og brintioner).

Den energi, der er bundet i



ATP-molekylerne, frigøres, når ATP igen spaltes til ADP og frit fosfat, og det er via denne spaltning, at en lang række af cellernes energikrævende processer drives. Således forbruges ATP under dannelsen af nyt protein (proteinsyntese) (1), under muskelcellens sammentrækning (2) og det er også spaltning af ATP, der leverer energi til natrium-kalium-pumpens arbejde med at opretholde en uens fordeling af natrium- og kaliumioner over cellemembra-

nen (3). Da både natrium- og kaliumionerne vil søge tilbage mod ligevægt kan man sige, at energi fra spaltning af ATP er blevet oplagret i den iongradient, som Na-K-pumpen har dannet. Energien i specielt Na^+ -gradienten bruges af cellerne til at transportere stoffer eller udløse elektriske signaler over membranen. Det første er eksemplificeret i figuren ved, at sukker (glukose) transporteres over cellemembranen sammen med Na^+ (3b).

kan erstatte deres høje iltkrævende stofskifte med det mindre effektive anaerobe stofskifte. Uden ilt ville en uforandret produktion af ATP således kræve en forbrænding af mere end 10 gange så meget brændstof i form af sukker (se boks 1). Desuden kan varmblodede dyr ikke tåle den kraftige forsyning, der følger med det anaerobe stofskifte.

Hovedårsagen til, at nogle skildpaddearter kan overleve iltfrie forhold i flere måneder er da også, at de sænker deres energiomsætning drastisk under overvintring. Det lave stofskifte opnås på grund af flere forskellige faktorer. For det første er skildpadderne koldblodede og bruger derfor ikke energi på at oprette en konstant høj kropstemperatur. Selv ved $37^{\circ}C$ har koldblodede dyr således et hvilestofskifte, der ligger ca. 10 gange under varmblodede dyr. For det andet er omgivelsernes, og dermed også skildpadderens, temperatur lav, når de overvintrer. Stofskiftet i koldblodede dyr falder 2-3 gange, når temperaturen nedsættes $10^{\circ}C$. Skildpadderens stofskifte reduceres således omkring 50 gange, når kropstemperaturen falder fra $37^{\circ}C$ til $0^{\circ}C$.

Betydningen af den lave temperatur og dermed det reducerede stofskifte illustreres ved, at maledede sumpskildpadder kun overlever ca. 12 timer uden ilt ved $20^{\circ}C$, mens de overlever mindst 90 dage uden ilt ved $3^{\circ}C$.

Den sidste faktor, der er medvirkende til det lave stofskifte, er, at skildpadderne som en direkte konsekvens af iltmangel, reducerer stofskiftet 10 gange ved at nedregulere en række energikrævende processer i cellerne. Samlet er skildpadderens stofskifte ved $0^{\circ}C$ under iltmangel mere end 200 gange lavere end ved $20^{\circ}C$ under iltede forhold. I sammenligning med et pattedyr af tilsvarende størrelse er skildpadderens stofskifte under overvintring kun ca. en $1/10.000$. (se boks 2)

En sparerunde i stofskiftet

Selvom en stor del af det nedsatte stofskifte i overvintrende

skildpadder kan tilskrives den lave temperatur, så gælder dette ikke for den 90% reduktion, som er forårsaget direkte af iltmangel. Denne reduktion er forbundet med en omorganisering og prioritering af cellernes forskellige energikrævende processer.

Noget skyldes, at muskelaktiviteten falder drastisk, og skildpadderne overvintrer derfor nærmest i en komaagtig tilstand, hvor de yderst sjældent bevæger sig. Desuden reduceres aktiviteten af en række cellulære processer, som proteinsyntese og aktiviteten af cellemembranens ion-pumper (primært natrium-kalium pumpen). Natrium-kalium pumpen sikrer en uens fordeling af natrium- og kalium-ioner på hver side af cellemembranen. Disse koncentrationsforskelle repræsenterer en form for "opsparret energi", som kan udnyttes af cellerne, når ionerne søger tilbage mod ligevægt (se boks 1). Natrium-kalium-pumpens aktivitet udgør derfor grundlaget for transport af stoffer og elektriske signaler over cellemembraner samt en række andre vigtige cellulære processer. I studier på isolerede cellekulturer af bl.a. leverceller fra skildpadder har man fundet, at proteinsyntesen sænkes mere end 90%, mens aktiviteten af natrium-kalium pumpen i cellemembranen sænkes med 75%. Selvom begge processer er nedregulerede under iltmangel, har opretholdelsen af ion-pumpenes aktivitet altså lidt højere prioritet end proteinstofskiftet, når der skal spares.

Den nedsatte aktivitet af ion-pumperne kan kun lade sig gøre, fordi skildpadderne celler udviser andre tilpasninger. Cellemembranerne bliver simpelt hen mindre gennemtrængelige for ioner og desuden sænkes hjernens og nervesystemets elektriske aktivitet, hvilket bidrager til at opretholde koncentrationsforskellene af ioner. Ikke desto mindre sænkes iongradienterne gradvist efter flere måneder uden ilt. Dette ses bl.a. som en gradvis stigning i koncentrationen af kalium uden for cellerne, hvilket i sidste ende kan med-

føre en livstruende nedsættelse af nerve- og muskelcellernes funktion.

Skildpaddeskjoldets beskyttende rolle

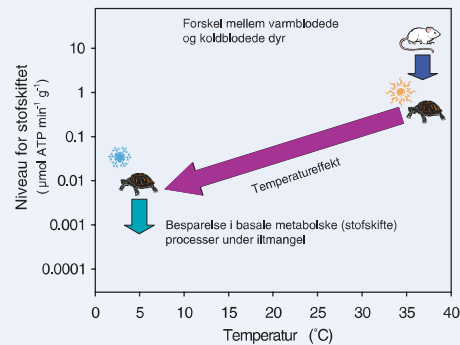
Skildpadderne skjold er sikkert udviklet som beskyttelse mod rovdyr, men skjoldet er tilsyneladende også nøglen til skildpadderne evne til overleve de høje koncentrationer af mælkesyre under iltmangel. Skjoldet fungerer nemlig som en buffer mod den store ophobning af mælkesyre, og medvirker derved til at dæmpe forsyningen. Mælkesyren kan nemlig ikke udskilles fra kroppen og den anaerobe forbrænding resulterer i mælkesyrekoncentrationer, der næsten er 10 gange højere end de maksimale værdier hos mennesker (ca. 200 mmol mælkesyre pr liter blod). Dette medfører naturligvis en enorm nedsættelse af kroppens pH.

Kroppens indhold af bikarbonat (HCO_3^-) fungerer imidlertid som buffer mod forsyning. De brintioner, der dannes med mælkesyren, reagerer således med kroppen bikarbonat (HCO_3^-), som omdannes til CO_2 og vand, der kan transporteres væk fra kroppen (se boks 3). Et dyrs bufferkapacitet, og dermed evne til at dæmpe syrebaser forstyrrelser, er altså i høj grad afhængig af koncentrationen af bikarbonat, om end andre stoffer også kan fungere som buffere.

Skildpadder har en høj bikarbonatkoncentration og dermed også en høj bufferkapacitet, men dette er ikke tilstrækkeligt, når koncentrationen af mælkesyre overstiger 50 mM. Her kommer skildpaddeskjoldet imidlertid ind i billedet, da det indeholder store mængder af calcium- og magnesiumkarbonat (CaCO_3 og MgCO_3). Disse karbonater fungerer som en stor og effektiv buffer mod mælkesyrens forsyning, da de under længevarende forsyning frigøres og reagerer med brintionerne.

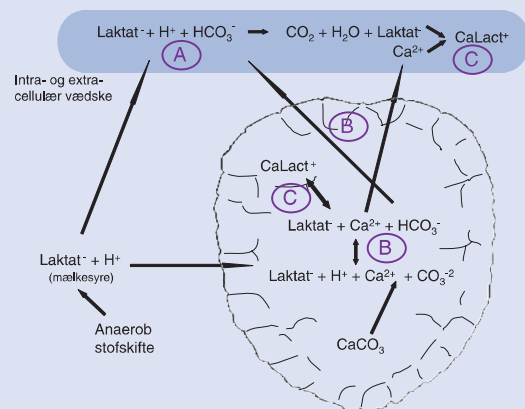
Foruden frigørelse af karbonater dæmper skjoldet også forsyningen ved at indbygge næsten halvdelen af den producerede

Energiomsætning



BOKS 2. En væsentlig årsag til skildpadderne specielle evne til at overleve iltmangel er deres kraftigt reducerede energiomsætning (stofsifte). Ved at sænke behovet for energi (ATP) kan skildpadderne mindske ophobningen af mælkesyre og samtidigt spare på de opsparede ressourcer, de har med under overvintringen. Figuren illustrerer en sammenligning mellem energiomsætningen i en rotte og en skildpadder under forskellige forhold. Af figuren kan det ses, at den overvintrenes skildpaddes stofskifte er lavt pga. 3 faktorer. For det første har koldblodede dyr generelt et stofskifte, der er 10 gange mindre end varmblodede dyr. Dette er bl.a. fordi, koldblodede dyr ikke bruger energi på at hæve deres kropstemperatur over omgivelsernes (blå pil). For det andet falder stofskiftet med temperaturen. Typisk halveres stofskiftet for hver gang temperaturen falder med 10°C , men i skildpadder er denne effekt endda endnu kraftigere (lilla pil). Den sidste årsag til det reducerede stofskifte er en direkte følge af iltmangel. Når der ikke længere er ilt tilstede nedsættes aktiviteten af en række af de mest energikrævende processer i skildpadderne celler (grøn pil) og energiomsætningen falder derfor med yderligere 90%.

Skjoldet som buffer



Boks 3. Skildpadderens skjold fungerer som en vigtig buffer, der dæmper forsyningen af kroppen under de meget høje koncentrationer af mælkesyre, der forekommer under iltmangel. En buffer er et molekyle, som binder brintioner (H^+). F.eks. kan blodets bikarbonat (HCO_3^-) binde de brintioner, der dannes ved mælkesyreforbrændingen under dannelse af CO_2 og vand (A). Skildpadderens skjold indeholder store mængder af calcium- og magnesiumkarbonater (CaCO_3 og MgCO_3). Disse karbonater (CO_3^{2-}) kan reagere med brintioner så de først omdannes til HCO_3^- og siden til CO_2 og vand (B). Da både CO_2 og vand kan udskilles over huden til det omgivende miljø vil forsyningen dermed blive eksporteret væk fra kroppen. Frigivelsen af karbonater fra calcium- og magnesiumkarbonat fra skjoldet medfører at koncentrationerne af calcium og magnesium stiger. De høje koncentrationer af calcium og magnesium kan påvirke en lang række cellulære processer, men i skildpadderne afdæmpes disse stigninger af, at både calcium- og magnesium-ionerne reagerer med laktationerne, hvorved der dannes Ca-Laktat eller Mg-Laktat. Disse komplekser er "inaktive" og oplagres enten direkte i skjoldet eller i blodet (C).



Foto: Johannes Overgaard

Et lille stribe hjertemuskel fra en skildpadde er nedsænket i et bad med en fysiologisk opløsning. Striben er hængt op i kraftmåler og stimuleres elektrisk så den trækker sig sammen, hvilket giver mulighed for at måle kraften ved hver sammentrækning. Væsken gennemluftes med en gasblanding, som kan ændres således at effekterne af ilt og iltmangel kan studeres.

mælkesyre direkte i skjoldet. Via disse mekanismer medvirker skjoldet til at stabilisere syrebase balancen, således at de høje koncentrationer på 200 millimol mælkesyre per liter "kun" medfører et fald i pH i blodet fra pH 8 til pH 7. Uden skildpaddeskjoldets unikke buffer-egenskaber ville blodets pH være faldet til pH 3. Selv ikke en skildpadde kunne overleve så lav pH!

Hjertet arbejder mod alle odds

På grund af skildpaddernes utrolige tolerance mod længerevarende iltmangel, har adskillige forskningsgrupper været interesserede i, hvordan deres organer opretholder funktionen under iltmangel. Især har man været interesseret i hjernen og hjertet, da disse to organer er specielt følsomme overfor iltmangel hos andre dyr og hos mennesker. Iltmangel i netop disse organer forårsager hvert år mange dødsfald hos mennesker.

Vores egen forskning har hovedsagligt været koncentreret om, hvordan hjertet arbejder uden ilt, og hvordan det påvirkes af den medfølgende forsurening

og de kraftigt forøgede koncentrationer af calcium- og kaliumioner. Selvom blodet ikke transporterer ilt under disse forhold er hjertet stadig livsnødvendigt, da det søger for blodets transport af nærings- og affaldsstoffer, hormoner osv. Hjertets aktivitet er dog, som resten af dyrets stofskifte, kraftigt reduceret under iltmangel, og man har målt hjertehæftelser helt ned til et slag hver tiende minut.

Vores studier har vist, at skildpaddehjerterne udviser en enorm tolerance overfor både forsurening og iltmangel, mens de er mere følsomme overfor de høje koncentrationer af kalium, der opstår efter langvarig iltmangel. Selv når alle disse ugunstige forhold kombineres fortsætter skildpaddehjerterne med at arbejde, mens tilsvarende ændringer ville få de fleste andre dyrs hjerter til at stoppe totalt. Hjertet arbejder altså videre mod alle odds, om end med en reduceret kapacitet.

I forbindelse med sænkningen af hjerterate og dermed hjertets arbejde har vi vist, at der sker en prioritering af fordelingen af blod til de forskellige orga-

ner. Således reduceres blodgennemstrømningen mindre til de "vitale" organer som hjerte, hjerne, lever og skjold, mens reduktionen er størst til nyren samt fordøjelses- og reproduktionsorganer. Mens det var forventeligt, at organer til fordøjelse og reproduktion har lav prioritet, og at hjerne, hjerte og lever har høj prioritet, var det overraskende, at blodgennemstrømningen til skjoldet også havde en høj prioritet. Men set i lyset af skjoldets vigtige rolle som buffer for mælkesyren, virker en sådan prioritering hensigtsmæssig. En reduktion af hjertets arbejde medfører selvfølgelig også en mindre energetisk udgift, og vi har desuden vist, at energiomkostningen af hjertets sammentrækning også effektiviseres under iltmangel.

Fra det ekstreme til det generelle

Den berømte danske fysiolog August Krogh formulerede i sin tid princippet om, at der »til et hvert (biologisk) problem er et dyr, der er specielt velegnet at studere«. Ud fra dette princip vil det være mest hensigtsmæssigt at studere tilpasninger til dykning i en sæl eller hval, tilpasninger til overvintring kan med fornuft studeres hos en bjørn eller et pindsvin, mens tilpasninger til lille størrelse studeres på mus osv.

Studierne af skildpaddernes fysiologi illustrerer da også dette princip, idet disse dyr i ekstrem grad udviser netop de tilpasninger, der er mest nødvendige for at kunne tolerere længerevarende iltmangel. Således har studier på alt fra hele skildpadder til isolerede organer eller celle-kulturer igen og igen fundet de to samme tilpasninger i disse dyr: Evnen til at reducere stofskiftet og evnen til at tolerere ophobningen af mælkesyre. Studier af disse skildpadder giver dermed ikke blot et indblik i den mangfoldighed, der udspringer af evolutionen – de hjælper også til en bedre forståelse af de centrale fysiologiske mekanismer, der er vigtige for tolerance overfor iltmangel, også hos mennesket. ■



Om forfatterne

Johannes Overgaard, ph.d. og forsker ved Afdeling for Terrestrisk Økologi, Danmarks Miljøundersøgelser
Tlf.: 8920 1481
e-mail: jov@dmu.dk



Hans Gesser er docent Zoofysiologisk Afdeling Aarhus Universitet
Tlf.: 8942 2588
e-mail:

hans.gesser@biology.au.dk



Tobias Wang er lektor Zoofysiologisk Afdeling Aarhus Universitet
Tlf.: 8942 2694
e-mail:

tobias.wang@biology.au.dk

Videre læsning:

Jackson, D.C. 2002. Hibernating without oxygen: the painted turtle. *J. Physiol.* 543: 731-737

Jackson, D.C. 2000. Living without oxygen: lesson from the freshwater turtle. *Comp. Biochem. Physiol.* 125A: 299-315